ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUT OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture Agriculture Alimentation Food Biologie Biology Environnement Environment Santé Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Sciences de la Vie et Santé

présentée et soutenue publiquement par

Jérémy CHERET

Le 29 avril 2013

Le rôle du système nerveux dans la cicatrisation cutanée

Directeur de thèse : **Pr Laurent MISERY**
Co-encadrement de la thèse : **Dr Christelle LE GALL-IANOTTO**

Jury

Mr Laurent MISERY, Professeur, Brest	Directeur de thèse
Mme Christelle LE GALL-IANOTTO, Docteur, Brest	Co-encadrant de thèse
Mme Agnès FICHARD-CARROLL, Professeur, Montpellier	Rapporteur
Mr Alexis DESMOULIERE, Professeur, Limoges	Rapporteur
Mr Daniel TOME, Professeur, Paris	Examinateur
Mme Marielle Bouschbacher, Docteur, Chenôve (Laboratoires URGO)	Invité

Laboratoire de Neurosciences de Brest EA 4685
Faculté de Médecine
22, avenue Camille Desmoulins
29200 BREST

Résumé

Il existe des interactions étroites entre le système nerveux périphérique (SNP) et la peau. En effet, le SNP intervient dans le maintien de l'homéostasie de la peau mais également dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques. La cicatrisation est un processus complexe qui regroupe différents mécanismes biologiques comme l'hémostase, l'inflammation, la ré-épithélialisation et la synthèse matricielle. Les mécanismes par lesquels le SNP agit sur les différentes étapes de la cicatrisation demeurent encore assez obscurs. Nous avons donc entrepris d'analyser plus précisément les effets du SNP et de certains neuromédiateurs dans les phases de prolifération et de remodelage du processus de cicatrisation. Pour cela, nous avons utilisé dans un premier temps, un modèle de co-culture entre un explant de peau humaine lésée et des neurones issus de ganglions rachidiens dorsaux (GRD) de rats nouveau-nés et analysé leurs effets sur la prolifération des cellules dermiques et épidermiques, sur l'activité des métalloprotéases matricielles 2 et 9 (MMP-2 et MMP-9), et sur la balance d'expression des collagènes de type I et III au cours du temps. Dans un second temps, nous avons analysé plus précisément l'effet de la Substance P (SP), du Calcitonin-Gene Related Peptide (CGRP) et du Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) ainsi que celui du facteur de croissance neuronale, Nerve Growth Factor (NGF-β) sur les mêmes mécanismes et ajouté à cette étude, l'effet de ces neuromédiateurs sur la capacité d'adhérence et la différenciation des fibroblastes dermiques primaires humains en myofibroblastes. Ainsi, ce modèle nous a permis de mettre en évidence que les neurones sensoriels influençaient la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes en favorisant celle-ci, et qu'ils agissaient aussi sur le remodelage tissulaire en augmentant l'activité des MMP-2 et -9 ainsi qu'en modulant le ratio d'expression entre les collagènes I et III en faveur du collagène de type I. De plus, nous montrons que les neuropeptides étudiés ainsi que le NGF- β favorisent également ces différents mécanismes de manière dose-dépendante. De plus, les neuromédiateurs testés favorisent la différenciation myofibroblastique des fibroblastes dermiques humains et augmentent leur capacité d'adhérence sur une matrice de fibronectine humaine. L'utilisation de notre modèle peut ouvrir de nouvelles études fondamentales mais également participer au développement de nouvelles molécules favorisant la cicatrisation. Nous avons également identifié pour la première fois la neuroserpine, un inhibiteur du système fibrinolytique, dans la peau.

Mots Clés : Cicatrisation cutanée humaine, Système nerveux, Neuropeptides, Neuroserpine.

Abstract

There are close interactions between the peripheral nervous system (PNS) and the skin. Indeed, the SNP is involved in maintaining the homeostasis of the skin but also in many physiological and pathophysiological processes. Skin wound healing is a complex process which includes various biological processes such as hemostasis, inflammation, re-epithelialization and matrix synthesis. The mechanisms by which the SNP is on the different stages of healing are still rather obscure. We therefore undertook to analyze more precisely the effects of SNP and several neuromediators in the phases of proliferation and remodeling of the healing process. For this, we used as a first step, a model of co-culture between an injured human skin explant and sensory neurons from dorsal root ganglia (DRG) of neonatal rats and analyzed their effects on the proliferation of skin cells and epidermal, on the enzymatic activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9), and the balance of expression of collagens type I and III during time of culture. In a second step, we analyzed more precisely the effect of substance P (SP) of Calcitonin-Gene Related Peptide (CGRP) and Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) as well as nerve growth factor, Nerve Growth Factor (NGF-β) on the same mechanisms, and added to this study, the effect of these neurotransmitters on the adhesion and differentiation of primary human dermal fibroblasts into myofibroblasts. Thus, this model allowed us to demonstrate that sensory neurons influenced the proliferation of keratinocytes and fibroblasts in promoting it, and they also acted on tissue remodeling by increasing the activity of MMP-2 and - 9 as well as modulating the expression ratio between collagens I and III, in favor of collagen type I. In addition, we show that the studied neuropeptides and NGF-β also promote these mechanisms dose-dependent manner. In addition, neurotransmitters tested promote myofibroblast differentiation of human dermal fibroblasts and increase their ability to adhere to human fibronectin matrix. Using our model can open new fundamental studies but also participate in the development of new molecules promoting healing. We also identified for the first time neuroserpin, an inhibitor of the fibrinolytic system in the skin.

Key words: Human skin wound healing, Nervous system, Neuropeptides, Neuroserpin.

Remerciements

Tout d'abord je souhaite remercier le Professeur Laurent Misery, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein du Laboratoire de Neurosciences de Brest et m'avoir permis de mener mon travail jusqu'au bout mais également pour sa disponibilité et son encadrement.

Je remercie également la fondation LE LOUS pour nous avoir fait confiance ainsi que pour le financement qui nous a permis de mener à bien ce travail ainsi que Marielle Bouschbacher avec qui j'ai pu échanger soit par téléphone, soit directement lors de rencontres.

Je remercie plus particulièrement le docteur Christelle Le Gall-Ianotto pour son encadrement tout au long de ma thèse ainsi que sa bonne humeur, sa disponibilité, pour tous les conseils qu'elle a pu me donner mais également pour les différentes discussions professionnelles et tous les bons moments passés au laboratoire.

Je remercie Nicolas Lebonvallet pour son aide et son expérience qui m'ont permis d'avancer au cours de ces années ainsi que pour tous les bons moments de rire au laboratoire ainsi que sa bonne humeur. Je remercie Virginie Buhé pour sa bonne humeur et son animation au laboratoire.

Je remercie Delphine Breton et Julien Leboucher pour leur sontient au cours de ces années ainsi que pour leur bonne humeur et tous les moments de bonheur.

Je remercie également les équipes de l'INSERM U613 et du LATIM pour leurs dépannages occasionnels.

Je remercie tous les amis (et rugbymans) et les rencontres que j'ai pu avoir lors de ces 3 années et qui m'ont soutenu et pour tous les bons moments.

Enfin, je remercie mes parents et ma sœur pour m'avoir toujours soutenu et supporté mais aussi accepté que je sacrifie certains moments pour mener à bien mon projet. Je remercie aussi le reste de famille pour leur soutien.

Résumé…….. **I**

Abstract……. **II**

Remerciements…….. **III**

Sommaire ……...…….. **IV**

Liste des abréviations……..…….. **IX**

Liste des Figures…… **XII**

Liste des Tableaux…… **XIV**

Chapitre I. La cicatrisation cutanée…….. **2**

A. La Peau……... **2**

1. Ses fonctions……..... 2

2. Son organisation……..…… 2

2.1 L'épiderme..... 3

2.2 La jonction dermo-épidermique……. 5

2.3 Le derme…… 5

2.3.1 Les cellules du derme……. 6

2.3.2 La Matrice Extracellulaire (MEC)…….. 7

a) Les collagènes…… 8

b) Les fibres élastiques…… 10

c) La fibronectine…… 11

2.4 L'hypoderme……..... 12

2.5 Le réseau vasculaire dermique cutané…… 12

2.6 L'innervation cutanée…… 14

B. La cicatrisation cutanée…… **14**

1. La cicatrisation des plaies dermiques…… 14

1.1 La formation du caillot de fibrine…… 15

1.1.1 La formation du clou plaquettaire…….. 16

1.1.2 Le caillot fibrino-plaquettaire…….. 16

1.1.3 La fibrinolyse …… 18

1.2 La phase inflammatoire…… 20

1.3 La phase de ré-épithélialisation……. 23

1.3.1 Migration…….. 24
1.3.2 Prolifération…….. 25
1.3.3 Protéases régulatrices de la ré-épithélialisation…… 26
1.3.4 Le néo-épiderme…….. 30
1.4 La formation du tissu de granulation……. 31
1.4.1 Une nouvelle matrice extracellulaire…… 31
1.4.2 La néo-vascularisation…… 35
1.5 Réapparition de la jonction dermo-épidermique……. 35
1.6 La phase de remodelage……. 36
1.7 Réapparition des glandes sudoripares et des bulbes pileux…….. 37
2. La cicatrisation des plaies épidermiques…….. 38

Chapitre II: Le système neuro-cutané…… 39

A. Structure de l'innervation cutanée…….. 39

1. Le système nerveux autonome…… 39
1.1 Structure…….. 39
1.2 Fonction…….. 40
2. Le système nerveux sensoriel…… 42
2.1 Structure et fonction…….. 42
2.2 Distribution anatomique des terminaisons nerveuses libres…… 43

B. Interactions neuro-cutanées…… 44

C. Le système nerveux cutané et la cicatrisation (Article 1)…….. 47

Chapitre III. Objectifs du travail…….. 111

Chapitre IV. Matériels et méthodes…… 112

A. Culture primaire tissulaire et cellulaire…… 112

1. Préparation des tissus et des cellules…… 112
1.1 Les explants de peau humaine…… 112
1.1.1 Lieu d'obtention et suivi…… 112
1.1.2 Analyse de l'expression de la neuroserpine (NSP) dans la peau humaine…….. 113
1.1.3 Traitement avant la culture et création de la lésion cutanée…… 113

1.2. Les fibroblastes dermiques humains…… 115
1.3 Les neurones issus de ganglions rachidiens dorsaux de rat (GRD)…. 115
2. Le modèle de culture organotypique 3D…… 115
2.1 Culture d'explant humain seul…….. 115
2.2 Co-culture avec les cellules nerveuses primaires de rat…….. 116
3. Tests des neuromédiateurs…… 116
3.1 Avec les explants lésés…….. 116
3.2 Avec les fibroblastes dermiques primaires humains…… 117
3.2.1 Préparation de la matrice de fibronectine humaine……. 117
3.2.2 Test d'adhérence sur une matrice de fibronectine humaine…….. 118
3.2.3 Différenciation des fibroblastes en myofibroblastes……..... 119
B. Histologie…… 120
1 Coupe des explants lésés…….. 120
2. Colorations histologiques…… 121
2.1 Trichrome de Masson…… 121
2.2 Hématoxyline-éosine (HE)…… 121
3. Immuno-histochimie (IHC)…….. 121
C. Etudes biochimiques et biomoléculaires…… 123
1. Le western-blot (étude NSP)…….. 123
1.1 Extraction protéique et dosage…….. 123
1.2 Dénaturation des protéines et Western-blot……. 124
2. Dosage des surnageants de culture par une technique immuno-enzymatique…… 125
3. La PCR en temps réel……. 126
3.1. Extraction des ARNs…… 126
3.1.1 A partir d'explants de peau non lésés (Etude NSP)…… 126
3.1.2 A partir des cultures de fibroblastes dermiques humains……. 127
3.2 Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc)……... 128
3.3 PCR en temps réel……... 128
3.3.1 Principe…….. 128

3.3.2 Protocole…… 129

4. Evaluation de l'activité des métalloprotéinases matricielles 2 et 9 par zymographie…….. 130

4.1 Principe……... 130

4.2 Migration sur gel, coloration et décoloration…….. **131**

D. Comptages et mesures…… 131

1. Analyse histologique des explants humain lésés……. 131

1.1 Ratio d'expression des collagènes de type I et de type III……. 131

1.2 Mesure de la longueur moyenne des languettes de ré-épithélialisation 132

1.3 Evaluation de la prolifération moyenne des cellules de la peau…….. 132

1.3.1 Des fibroblastes dermiques…… 133

1.3.2 Des kératinocytes……. 133

2. Statistiques et représentations graphique…….. **134**

Chapitre V. Résultats…… 134

A. Mise en place du modèle : détermination du milieu de culture…… 134

1. Analyse histologique……. 136

2. Evaluation de la prolifération cellulaire……. 138

3. Choix final du milieu de coculture……. 138

3.1 Effet de la substance P…….. 141

3.2 Culture des neurones sensoriels primaires de rat (GRD)…….. 141

3.3 Conclusion…… **141**

B. Effets des neurones sensoriels primaires et de certains neuromédiateurs sur le processus de cicatrisation d'un explant de peau humaine. (Article 2) **172**

C. Effet du NGF et des neuropeptides sur la longueur des languettes de ré-épithélialisation…… 174

D. Expression d'un acteur important du système fibrinolytique, la neuroserpine, dans la peau humaine (Article 3)…….. 178

Chapitre VI. Discussion…… 178

A. Les différents modèles d'étude de la cicatrisation cutanée…… 180

B. Détermination du milieu de culture…… 181

C. L'effet des neurones primaires sur la cicatrisation cutanée…… 185

D. Expression de la neuroserpine, un inhibiteur des activateurs du plasminogène, dans la peau…….. 188

Chapitre VII. Conclusion et Perspectives…… 188

Conclusions…… 188

Perspectives…… 190

Chapitre VIII. Bibliographie…… 190

Bibliographie de la thèse…… 209

Bibliographie correspondant au Tableau 8……... 222

Annexe

Liste des abréviations

3D/2D	3 dimensions/2 dimensions, tridimensionnel/bidimensionnel
α-SMA	«alpha-Smooth Muscle Actine»/ actine de muscle lisse de type alpha
α2-AP	« alpha2-antiplasmine »/ anti-plasmine de type alpha 2
β-E	« beta-endorphin »/endorphine beta
ACTH	« Adrenocorticotropic Hormon »/ hormone adrénocorticotropique
ADN/ADNc	Acide désoxiribonucléique/ADN complémentaire
ARN/ARNm	Acide ribonucléique/ARN messager
BSA/ASB	« Bovine Sera Albumin »/ Albumine de sérum bovin
BDNF	« Brain-Derived Neurotrophic Factor »/ Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BPE	« Bovine pituary extract », extrait de glande pituitaire bovine
Ca^{2+}	Calcium
CGRP	« Calcitonin gene related peptide »/ peptide lié au gène de la calcitonine
CK-6	Cytokeratine-6
CRH	« Corticotropin Releasing Hormon »/ hormone libérant la corticotropine
CTGF	« Connective Tissue Growth Factor »/ Facteur de croissance du tissu conjo
Da, kDa	Dalton, kiloDalton
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DMEM	Dulbecco's Minimum Essentiel Medium
DMEM/F12	DMEM/Ham's F12
DO	Densité optique
DPBS	« Dulbecco's Phosphate Buffered Salin»/ tampon phosphate
DRG/GRD	« Dorsal root ganglia »/ganglion de la racine dorsale
EDTA	« Ethylendiaminetetraacetic acid »/Ethylène diamine tetraacétique
EGF	« Epidermal Growth Factor »/ Facteur de croissance épidermique
EIA	«Enzyme Immunometric assay»/ technique immuno-enzymatique
FGF	« Fibroblaste Growth Factor »/ facteur de croissance des fiboblastes
g	Gravité
g, mg, µg, ng, pg	Gramme, milligramme, microgramme, nanogramme,picogramme
GPIb	« Glycoprotein Ib»
GM-CSF	« Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor »/Facteur stimulant la formation des colonies des granulocytes macrophages
Gro-α	« Growth Related Oncogene-alpha »/
GRP	« Gastrin releasing peptide »
H, h	Heure(s)

HB-EGF	« Heparin Binding-EGF »/ Facteur de croissance épidermique liant l'héparine
HC	Hydrocortisone
HE	« Hematoxylin/Eosin »
HRP	«Horse radish peroxydase»/ peroxydase extraite de radis noir
IFN-γ	Interféron-gamma
IGF	« Insulin-like Growth Factor »/ facteur de croissance semblable à l'insuline
IgG	Immunoglobuline G
IHC	Immuno-histochimie
ILs	« Interleukins »
INS	Insuline
IP-10	« Interferon gamma-induced protein 10 » / Protéine 10 induite par l'interféron gamma
J	Jours
KGF	« Keratinocyte Growth Factor »/ Facteur de croissance kératinocytaire
KSFM	"Keratinocyte Serum-Free Medium»/ milieu de culture pour kératinocytes sans serum
l, ml, µl	litre, millilitre, microlitre
M, mM, µM	mol/L, millimol/L, µmol/L
MAGP	« Microfibril-Associated Glycoprotein »/glycoprotéine associé au microfibrille
MCP-1	« Monocyte Chemoattractant Protein-1 »/ protéine chimioattractive des monocytes
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	« Matrix metalloproteinases »/Métalloprotéases matricielles
NAP-2	« Neutrophil Activating Peptide-2 »/peptide activant les neutrophiles
NK A/B	« Neurokinin A/B »
NP-Y	« Neuropeptide Y »
NGF	« Nerve Growth Factor », facteur de croissance nerveux
NT-3	« Neurotrophin-3 »/neurotrophine-3
NSP	Neuroserpine
PAF	Paraformalhédyde
PAI-1	« Plasminogen Activator Inhibitor-1 »/ inhibiteur des activateurs du Plasminogène
pb	Paires de bases
PDGF	« Platelet-derived Growth Fcator »/ Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PHM/PHI	« Peptide Histidine Methionin/ Peptide Histidine Isoleucine »
POMC	« Pro-Opiomelanocortin »/proopiomélanocortine
PRL	« Prolactin »/prolactine

QPCR	“Quantitative Polymerase Chaine Reaction »/ réaction en chaine de polymérisation quantitaitve
RGB/RVB	« Red Green Blue »/ Rouge vert bleu
RT-PCR	«Reverse transcriptase-PCR»/ Transcritption reverse – réaction en chaine de polymérisation
SCF	« Stem Cell Factor »/ facteur des cellules souches
SDS	«Sodium Dodecyl Sulfat»/laurylsulfate de sodium
SERPINs	« SERine Proteases INhibitors »/ Inhibiteurs des sérines protéases
SNEIC	Système neuro-endocrino-immuno-cutanée
SNP	Système nerveux périphérique
SST	Somatostastin
SP	Substance P
SVF	Sérum de veau fœtal
tPA	« Tissue type-Plasminogen Activator » /Activateur tissulaire du plasminogène
TAFI	«Thrombin-Activated Fibrinolysis Inhibitor»/ Inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine
TGF-	« Transforming Growth Factor »/ Facteur de croissance transformant
TIMP	«Tissular Inhibitor Metalloproteinase»/ Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases
TNF-	«Tumor Necrosis Factor»/ facteur nécrosant des tumeurs
TRITC	Tetra methyl Rhodamine IsoThioCyanate
uPA	« Urokinase Plasminogen Activator » /Activateur de type urokinase du plasminogène
uPAR	« Urokinase Plasminogen Activator Receptor » /récepteur de l’activateur de type urokinase du plasminogène
VEGF	« Vascular Endothelium Growth Factor »/ Facteur de croissance de l’endothélium vasculaire
VIP	« Vasoactive Intestinal Peptide »
vWF	« vonWillebrand Factor »/facteur de von Willebrand

Liste des Figures

Figure 1. La composition de la peau ……...3

Figure 2. La composition de l'épiderme……4

Figure 3. La composition du derme……6

Figure 4. Les fibres dermiques……..……..…10

Figure 5. La structure de la Fibronectine……..11

Figure 6. Le réseau vasculaire cutané……...13

Figure 7. Le réseau vasculaire dermique ……14

Figure 8. Les différentes étapes de la cicatrisation……...15

Figure 9. La fibrinolyse……...19

Figure 10. La phase inflammatoire……..…21

Figure 11. La phase de prolifération…….…..24

Figure 12. Le clivage des MMPs par le système fibrinolytique……....27

Figure 13. Régulation de l'expression et de l'activité des MMPs……..….29

Figure 14. La différenciation myofibroblastique…….……34

Figure 15. La phase de maturation…….……36

Figure 16: Histologie de l'innervation cutanée……....41

Figure 17: Photographies de coupes de peaux…….…43

Figure 18. Le système neuro-immuno-endocrino cutané……45

Figure 19. Elaboration des explants de peau humaine lésés……..114

Figure 20. Zones de coupes des explants lésés pour nos différentes études histologiques……..…120

Figure 21. Exemple de mesure de languette de ré-épithélialisation sur une coupe d'explant de peau humaine lésée, colorée au Trichrome de Masson……132

Figure 22. Exemple représentatif des photos obtenues après coloration à l'hématoxyline/éosine ou au Trichrome de Masson des zones lésées après 10 jours de culture dans chaque milieu de culture testé……..…135

Figure 23. Exemple représentatif des photos des zones lésées obtenues après marquage au Ki67 (IHC) et coloration des noyaux au DAPI pour chaque milieu de culture testé après 10 jours de culture……..137

Figure 24. Exemple représentatif des immunomarquages Ki67 et coloration au DAPI obtenus au niveau des zones lésées, après 3, 7 et 10 jours de culture dans du K-SFM 1.6M de Ca^{2}+ seul (contrôle) ou en présence de SP à 10^{-6} M……139

Figure 25. Exemple représentatif des immunomarquages Ki67 et coloration au DAPI obtenus au niveau des zones lésées, après 3, 7 et 10 jours de culture dans du K-SFM 1.6M de Ca^{2}+ seul (contrôle) ou en présence de SP à 10-6 M……..…140

Figure 26. Effet des neuromédiateurs sur la longueur de la languette de ré-épithélialisation sur des explants de peau lésée au cours du temps de culture (J3, J7 et J10)……172

Figure 27. Exemple représentatif des photos obtenues des zones lésées après coloration au Trichrome de Masson pour chaque condition aux trois temps de culture……..…173

Figure 28. Représentation des rôles hypothétiques de la neuroserpine dans le processus de cicatrisation cutanée……187

Liste des Tableaux

Tableau 1. Collagènes présents dans la peau……...9

Tableau 2. Liste des facteurs de croissance et cytokines impliquées dans la cicatrisation cutanée……..…..17

Tableau 3. Champs à remplir pour le traitement et le suivi des échantillons de peau prélevés à la clinique et utilisés dans notre laboratoire……..…..112

Tableau 4. Liste des neuromédiateurs, fournisseurs et concentrations testés……..……117

Tableau 5. Volume des différentes solutions pour l'utilisation du Kit de dosage de la phosphatase acide…….…… 119

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés en immunochimie……122

Tableau 7. Séquence des « primers » utilisés pour la PCR en temps réel…..129

Tableau 8. Modèles d'étude……179

INTRODUCTION

L’objectif de l’équipe dans laquelle j’ai effectué ma thèse est d’étudier les interactions entre le système nerveux et la peau. La peau est densément innervée par le sytème nerveux périphérique. Une communication étroite existe entre les terminaisons nerveuses libres qui innervent le derme et l’épiderme, et les cellules qui constituant la peau. Pour communiquer, les terminaisons nerveuses et les cellules de la peau partagent un langage commun composé de neuromédiateurs (neuropeptides, neurohormones et neurotrophines) et de récepteurs spécifiques exprimés à la surface des cellules. Ainsi, l’innervation cutanée participe au maintien de l’homéostasie de la peau, à l’organisation de l’épiderme et au renouvellement des kératinocytes. A l’inverse, la peau émet de nombreux facteurs de croissance qui influencent l’innervation cutanée. Ces différentes interactions montrent que le système nerveux périphérique peut moduler les fonctions de la peau.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse s’incrivent par conséquent dans une démarche ayant pour but de mettre en évidence l’implication du système nerveux dans le processus de cicatrisation cutanée.

Chapitre I. La cicatrisation cutanée

La cicatrisation cutanée est un processus biologique complexe dont le but est de rétablir le plus rapidement possible l'intégrité et l'homéostasie de la peau. Elle nécessite la collaboration de plusieurs types cellulaires, et met en jeu de nombreux médiateurs chimiques. Avant de décrire de façon détaillée les différentes étapes de ce processus, nous allons faire quelques rappels important sur la fonction de la peau, sa structure, et ses différents constituants.

A. La Peau

1. Ses fonctions

La peau est le plus grand organe du corps humain en termes de surface. Elle est constituée de plusieurs couches de cellules et recouvre l'ensemble du corps. Sa fonction principale est de protéger l'organisme contre les agressions extérieures mais c'est également un organe de communication et d'échange. Ce tissu très souple et très résistant est une véritable barrière protectrice entre l'organisme et l'environnement extérieur (infections, écarts de température, UVs…). La présence de glandes sudoripares et d'un réseau vasculaire cutané dense, joue un rôle dans la thermorégulation et l'élimination de déchets métaboliques. La sécrétion du sébum par les glandes sébacées présentes en grand nombre évite le dessèchement de la peau et joue également un rôle bactéricide. Enfin, les récepteurs nerveux permettent le toucher.

2. Son organisation

La peau est composée de 3 zones (Figure 1). L'épiderme constitue la couche la plus superficielle. Sous l'épiderme, le derme représente le tissu de soutien richement innervé et vascularisé où se situent également les annexes cutanées. L'épiderme et le derme sont séparés par la jonction dermo-épidermique. Et enfin, dans la partie la plus profonde, se trouve l'hypoderme.

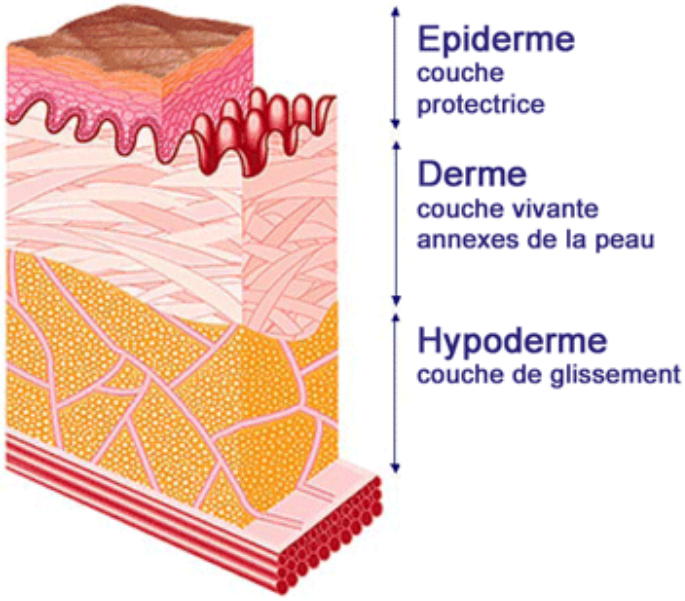


Figure 1. La composition de la peau (Source : adapté du site www.urgomedical.fr/index.php/Physiopathologie/La-peau-et-les-plaies/La-peau)

2.1 L'épiderme

L'épiderme est constitué d'un épithélium pavimenteux qui contient différents types de cellules : principalement des kératinocytes (environ 90% des cellules de l'épiderme), mais également des mélanocytes, des cellules de Langerhans et de Merkel (Figure 2). Il est constitué de plusieurs couches (de la surface à la profondeur : cornée, granuleuse, épineuse et basale) qui protègent l'organisme des attaques extérieures et permettent un renouvellement permanent des couches supérieures. Toutes les cellules de l'épiderme sont reliées entre elles par des ponts d'union appelés desmosomes. Certaines cellules sont reliées à la lame basale par un autre système d'ancrage appelé cette fois-ci hémidesmosome.

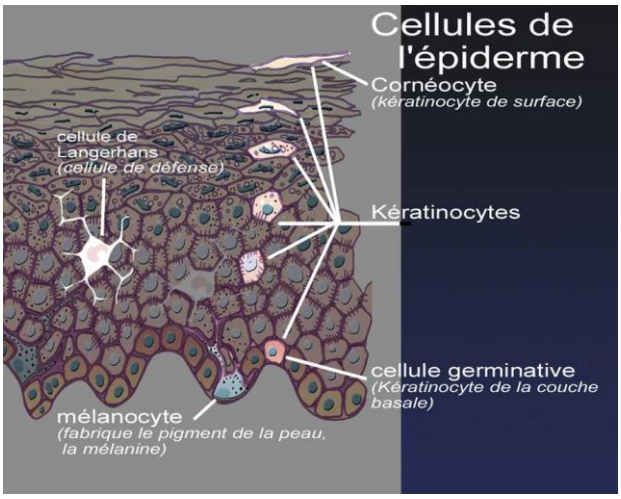


Figure 2. Composition cellulaire de l'épiderme (Source : adapté du site www.dermato-info.fr/article/Un_organe_multifonction)

✓ Les kératinocytes produisent une protéine structurale majeure, fibreuse et insoluble dans l'eau : la kératine.

Cette protéine fibreuse, qui aide à imperméabiliser et protéger la peau ainsi que les tissus sous-jacents, est à l'origine de la formation de polypeptides fondamentaux appelés filaments intermédiaires composant le cytosquelette des kératinocytes. Ces combinaisons de kératines émanent d'un anneau périnucléaire s'étendant à travers le cytoplasme et se terminant au niveau des desmosomes et hémidesmosomes. Les épithéliums simples sont caractérisés par les paires de kératines K8/K18, et l'épithélium pavimenteux stratifié par la paire K5/K14. De plus, l'épithélium pavimenteux stratifié peut également exprimer quatre autres paires de kératine au cours de la différentiation de l'épiderme. Dans la peau, les kératines suprabasales K1/K10 sont caractéristiques de la différenciation épidermique. Lorsque l'épiderme est hyperprolifératif, comme c'est le cas dans la cicatrisation ou le psoriasis, l'expression des kératines suprabasales K6/K16/K17 est rapidement induite.

✓ Les mélanocytes constituent environ 8% des cellules de l'épiderme et produisent de la mélanine. Cette dernière est transmise aux kératinocytes par des dendrites minces et allongées appartenant aux mélanocytes. Après avoir infiltré les kératinocytes, les grains de mélanine (pigment brun-noir) se regroupent et forment un voile protecteur au-dessus du noyau. Ils protègent ainsi l'ADN des cellules épidermiques des effets des rayons ultraviolets et offrent à la peau sa couleur, caractéristique de chaque individu.

✓ Dans l'épiderme profond, outre les kératinocytes et les mélanocytes, on retrouve également les cellules de Langerhans qui interagissent avec les lymphocytes T auxiliaires au cours des réponses immunitaires.

✓ Enfin, les cellules de Merkel qui se localisent dans la couche basale. Elles sont en contact avec les terminaisons nerveuses sensorielles et joueraient un rôle de mécanorécepteurs dans la peau (Boulais N et al, 2009).

2.2 La jonction dermo-épidermique

L'épiderme et le derme sont séparés par une membrane basale, qu'il vaut mieux appeler jonction dermo-épidermique (JDE) du fait de son organisation complexe. Elle est composée entre autres de laminine, de nidogène, de collagène IV, et de perlecan. Elle assure des fonctions fondamentales. Ainsi, elle joue un rôle de support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme au derme et un rôle de barrière sélective permettant le contrôle des échanges moléculaires et cellulaires entre les deux compartiments. Elle constitue également, à travers les glycoprotéines qui la constituent- en particulier les laminines - le support de l'adhésion et de la migration des kératinocytes lors de la restauration de l'intégrité épidermique (Zhang K et Kramer RH, 1996), étape fondamentale de la cicatrisation cutanée.

Enfin, la JDE permet aux kératinocytes basaux de déterminer leur polarité, de s'organiser dans l'espace et donc de structurer l'épiderme. Lors de la stratification de l'épiderme, les kératinocytes qui prolifèrent restent attachés à la membrane basale et les cellules-filles générées migrent dans les couches supérieures de l'épiderme vers l'extérieur.

2.3 Le derme

C'est la deuxième partie importante de la peau. C'est un tissu conjonctif constitué de fibres de collagène et d'élastine dans un gel de glycoprotéines (matrice extracellulaire ou MEC) entourant les différents types cellulaires du derme. Contrairement à l'épiderme, il contient des vaisseaux sanguins. De part sa nature,

c’est le tissu de soutien de la peau. Il se compose de 2 parties distinctes : le derme papillaire et le derme réticulaire (Figure 3).

✓ Le derme papillaire situé en surface, est une couche mince (environ 1/5 du derme), riche en fibres fines de collagènes et en fibres élastiques. Sa surface est augmentée par sa disposition en petites crêtes allongées, les papilles dermiques. Il est riche en cellules, en substance fondamentale, en petits vaisseaux ainsi qu’en terminaisons nerveuses notamment au sein des papilles dermiques.

✓ Le derme réticulaire, lui, est situé dans la partie la plus profonde du derme et occupe environ 80% du derme. Il est formé par des fibres de collagène enchevêtrées généralement parallèlement à la surface de la peau et de grosses fibres élastiques qui forment un réseau dense. Les espaces laissés libres par les fibres de collagène sont occupés par des follicules pileux, des glandes sébacées ainsi que des terminaisons nerveuses corpusculaires. Contrairement au derme papillaire, il contient peu de cellules.

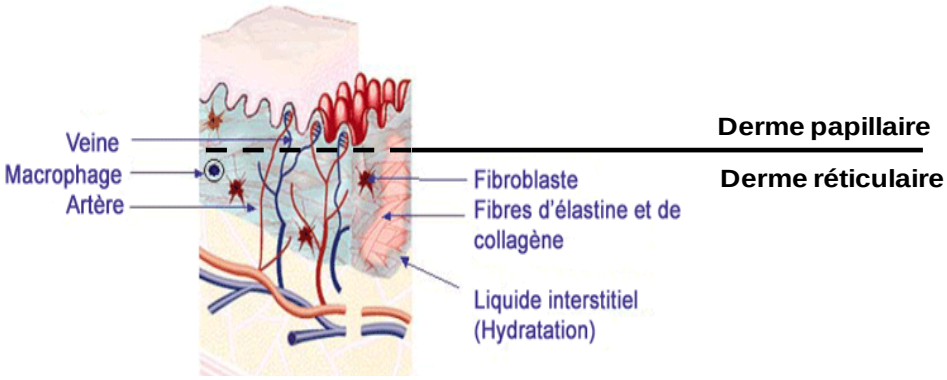


Figure 3. La composition du derme (Source : adapté du site www.urgomedical.fr/index.php/Physiopathologie/La-peau-et-les-plaies/La-peau)

2.3.1 Les cellules du derme

✓ Les mastocytes sont des cellules immunitaires connues pour leur rôle dans les processus inflammatoire et allergique (Sismanopoulos N et al, 2012). Ils s'accumulent près des cellules musculaires lisses et les follicules pileux.

✓ Les fibroblastes constituent le principal type cellulaire présent dans le derme. Ils sont majoritairement localisés au niveau du derme papillaire, très peu au niveau du derme réticulaire. D'un point de vu métabolique, ils sont spécialisés dans la synthèse et la sécrétion des macromolécules protéiques et de la matrice extracellulaire. Alors que leur implication dans la synthèse des fibres de collagènes et de fibronectine semble établie, leur rôle dans la synthèse de l'élastine apparaît moins évident. Cependant, des tests menés *in vitro* ont montré que les fibroblastes avaient la capacité de synthétiser des tissus élastiques suggérant qu'ils sont probablement la principale source d'élastine dans le derme mais que le renouvellement de l'élastine est beaucoup plus rare que celui du collagène (Hinek A et al, 2005).

Il y a beaucoup d'hétérogénéité dans la population fibroblastique et il a été démontré que le rapport de synthèse entre les collagènes de types I et III ou l'expression de la fibronectine dans la population fibroblastique entière peut être variable. En effet, une étude a démontré que des fibroblastes provenant du derme papillaire par rapport à ceux du derme réticulaire, synthétisaient plus de collagène de type III que de type I et que les niveaux d'expression pour la fibronectine pouvaient être jusqu'à 30 fois plus élevé (Sorrell JM et al, 2007).

2.3.2 La Matrice Extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire composant le derme est un maillage complexe de différentes macromolécules. Cette matrice mésenchymateuse fournit aux cellules l'organisation et la composition d'un environnement propice à leur survie, leur prolifération et leur migration.

Quatre grandes classes de protéines composent la MEC:

(a) les fibres de collagène qui fournissent la résistance et la force de tension pour permettre à la peau de servir d'organe de protection contre les traumatismes externe,

(b) les structures élastiques qui confère à la peau son élasticité,

(c) les glycoprotéines non collagéniques, telles que les fibrillines, les fibulines et les intégrines, qui servent souvent d'organisateurs de la matrice et facilitent les interactions cellule-matrice, et enfin,

(d) les protéoglycanes/glycosaminoglycanes, qui assurent l'hydratation de la peau.

L'homéostasie du derme dépend du maintien des interactions appropriées entre les différents composants de la matrice extracellulaire.

a) Les collagènes

Le collagène est une famille de protéines étroitement liées mais distinctes génétiquement qui représente 70% des protéines totales du derme (Kuivaniemi H et al, 1997 ; Franzke CW et al, 2005 ; Shaw LM and Olsen BR, 1991 ; Myllyharju J and Kivirikko KI, 2004). Il fournit au tissu la structure et la résistance mécanique le protégeant contre les fortes tensions (Alberts B et al, 2002). Comme nous l'avons dit précédemment, le collagène est synthétisé par les fibroblastes.

Les molécules de collagène sont composées de 3 chaînes formant des structures fibrillaires s'associant linéairement en fibrilles. Ces fibrilles s'agrègent entre elles et forment les fibres de collagène de 0,5 à 3 µm de diamètre (Figure 4) (Alberts B et al, 2002, Bassaglia Y, 2001).

Actuellement, 29 collagènes distincts ont été identifiés dans les tissus des vertébrés et ont été désignés par des chiffres romains (I à XXIX) en fonction de l'ordre de leur découverte et de leur caractérisation. Parmi tous ces collagènes, seul un certain nombre sont présents dans la peau (Tableau 1).

Type de collagène	Assemblage supramoléculaire	Distribution tissulaire
I	Fibrillaire	Derme, os, tendons
III	Fibrillaire	Derme fœtal, vaisseaux sanguins, tractus gastrointestinal
IV	Membrane basale	Ubiquitaire
V	Fibrillaire	Ubiquitaire
VI	Microfibrillaire	Ubiquitaire
VII	Membrane basale épithéliale	Membrane basale épithéliale
VIII	Formation de réseaux	Endothéliale
XIII	Transmembranaire	Ubiquitaire, incluant l'épiderme
XIV	Fibrilles associés aux collagènes avec des triples hélices interrompues	Peau, cornée
XV	Membrane basale	Ubiquitaire
XVII	Transmembranaire	Hémidesmosomes
XXIX	Inconnu	Epiderme

Tableau 1. Collagènes présents dans la peau (Source : Traduit et adapté de Rook's Textbook of Dermatology, 8ème Edition, ed by Tony Burns, Stephen Breathnach, Neil Cox, Christopher Griffiths, 2010).

Le collagène de type I a été identifié comme étant le composant majeur du derme (Mélissopopoulos A and Levacher C, 1998, Alberts B et al, 2002, Bassaglia Y, 2001) puisqu'il représente environ 80% du collagène total présent. Il est associé au collagène de type III pour former de larges fibres extracellulaires dans le derme humain. Ce dernier représente environ 10% de la masse totale des collagènes retrouvés dans le derme humain adulte.

Lors du développement embryonnaire, le collagène de type III prédomine mais assez rapidement et ceci dès le début de la période post-natale, la synthèse du collagène de type I s'accélère pour atteindre dans la peau humaine un rapport de 8:1 en faveur du collagène de type I.

Les fibres de collagènes, une fois matures par les mécanismes de réticulations, deviennent stables et peuvent rester dans les tissus en condition physiologique pendant de longues périodes.

Afin de maintenir une bonne homéostasie, les niveaux d'expression des différents collagènes ainsi que leurs ratios doivent être strictement contrôlés et régulés. Une synthèse incontrôlée peut entrainer une accumulation excessive de collagène responsable des maladies fibreuses, telles que les sclérodermies, les chéloïdes ou les cicatrices hypertrophiques (Uitto J, Kouba DJ, 2000 ; Karsenty G, Park RW, 1994).

Pour cela, le collagène peut être dégradé par des enzymes spécifiques, les collagénases appartenant à la famille des métalloprotéases matricielles (« Matrix MetalloProteinases » ou MMPs). Cette famille de protéinases comporte également des gélatinases, des stromélysines, des matrilysines, et des MMP de type-membranaire (« Membrane Type-MMP » ou MT-MMP) capables de dégrader tous les composants de la MEC (Nagase H, Woessner JF, 1999; Lemaitre V, D'Armiento J, 2006; Flannery CR., 2006). Une description plus précise de ces protéases fera l'objet d'un paragraphe un peu plus loin dans le manuscrit.

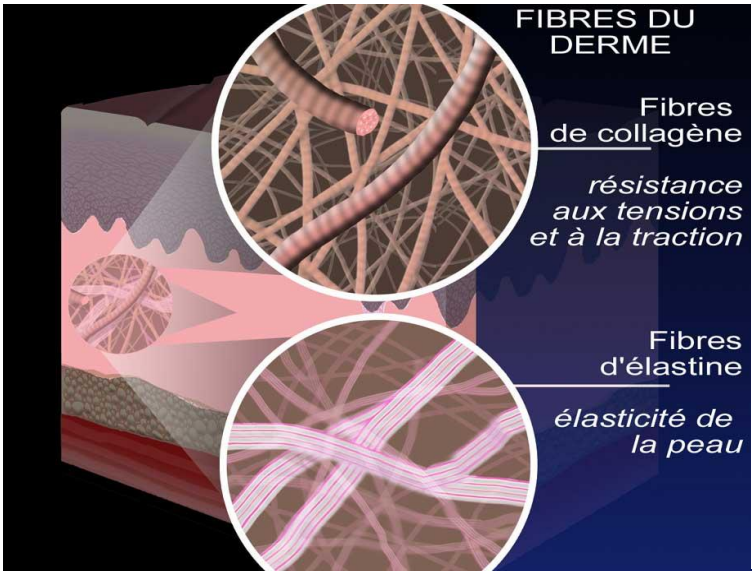


Figure 4. Les fibres dermiques

(Source : www.dermato-info.fr.articel/Un_organe_mutlifonction)

b) Les fibres élastiques

Contrairement au collagène qui assure la résistance de la peau, les fibres élastiques offrent à celle-ci une élasticité lui permettant de retrouver sa forme initiale après avoir subi une certaine tension.

Les fibres élastiques sont produites par les fibroblastes et se composent de deux parties distinctes : un réseau constitué de molécules d'élastine liées entre elles

par des liaisons covalentes entourées par un feuillet de microfibrilles principalement formé de fibrilline et de glycoprotéines associées à des microfibrilles ou MAGP (« Microfibril-Associated Glycoprotein ») (Midwood KS and Schwarzbauer JE, 2002) (Figure 4).

c) La fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine d'adhérence très importante puisqu'elle est au cœur de l'assemblage de la MEC. Elle existe sous deux formes, la forme plasmatique et la forme cellulaire mais seule la forme cellulaire est présente dans la peau (Norton PA and Hynes RO, 1987 ; Van Der Straaten et al, 2004 ; White ES et al, 2008). La fibronectine cellulaire se présente sous forme insoluble et est produite principalement par les fibroblastes, les cellules endothéliales et les adipocytes (Van Der Straaten et al, 2004).

Cette protéine possède plusieurs sites d'adhérence lui permettant de se lier simultanément aux molécules de la MEC comme le collagène, la fibrine ou les protéoglycanes, mais aussi aux cellules *via* les intégrines. Cette dernière propriété lui permet de réguler à la fois l'adhérence, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire (Norton PA and Hynes RO, 1987 ; Van Der Straaten et al, 2004) (Figure 5).

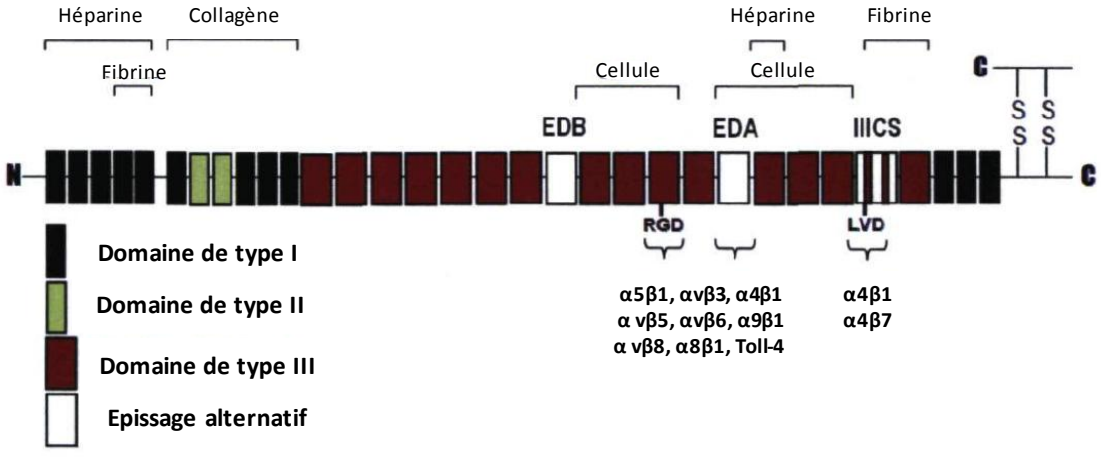


Figure 5. La structure de la Fibronectine (Source : Image traduite et adaptée de White *et al*, 2008).

Elle joue un rôle à la fois dans des processus physiologiques comme la réparation tissulaire mais est également impliquée dans des processus physiopathologiques comme dans certaines fibroses (Van Der Straaten et al, 2004). Bien qu'il ait été démontré que le domaine EDB (« Extra Domain-B ») de la fibronectine ait une fonction biologique, probablement au niveau du dépôt de la protéine dans la matrice extracellulaire, son rôle nous est encore peu connu et ne semble pas associé à la fibrose (White ES et al, 2008). Par contre, l'absence du domaine EDA au cours de la réparation tissulaire entraîne des problèmes de cicatrisation et de l'inflammation (White ES et al, 2008).

2.4 L'hypoderme

L'hypoderme est le compartiment le plus profond et le plus épais de la peau. Il s'invagine dans le derme et est rattaché au derme sous-jacent par des fibres de collagène et d'élastine. L'hypoderme est un tissu fibro-adipeux composé d'adipocytes, cellules permettant le stockage des lipides, regroupés en lobules, et séparés par du tissu conjonctif. L'hypoderme joue le rôle de réserve énergétique de la peau et participe, au moins passivement, à la thermorégulation du fait de la capacité d'isolant thermique de la graisse.

2.5 Le réseau vasculaire dermique cutané

La peau présente une architecture vasculaire très organisée qui lui permet de fournir efficacement les nutriments ainsi que l'oxygène essentiels à sa survie (Figure 6). Cette structure est très importante, car le réseau vasculaire du derme doit également assurer la survie de l'épiderme qui lui, n'est pas vascularisé. (Ryan TJ, 1983; Braverman IM and Yen A, 1977; Braverman IM and Yen A, 1982). Par ailleurs, ce réseau joue un rôle important dans la régulation de la température corporelle.

Au niveau anatomique, les artères entrent dans la peau pour former un plexus profond, à partir duquel les différents vaisseaux remontent à la frontière entre le tissu adipeux sous-cutané et le derme pour former un réseau vasculaire «cutané». Ces vaisseaux se ramifient vers les différents appendices cutanés et offrent des artérioles

ascendantes formant un plexus sub-papillaire d'où sont issues les boucles capillaires pénétrant dans le derme papillaire, entre les crêtes épidermiques.

Au niveau de la peau, les capillaires sont des vaisseaux continus (Tortora GA, 2005) entourés de péricytes, importants pour le développement, le remodelage et la stabilité des capillaires (Allt G and Lawrenson JG, 2001). Ces vaisseaux sont très nombreux, comportant beaucoup d'embranchements optimisant ainsi les échanges gazeux, de nutriments et de déchets entre le sang et la peau.

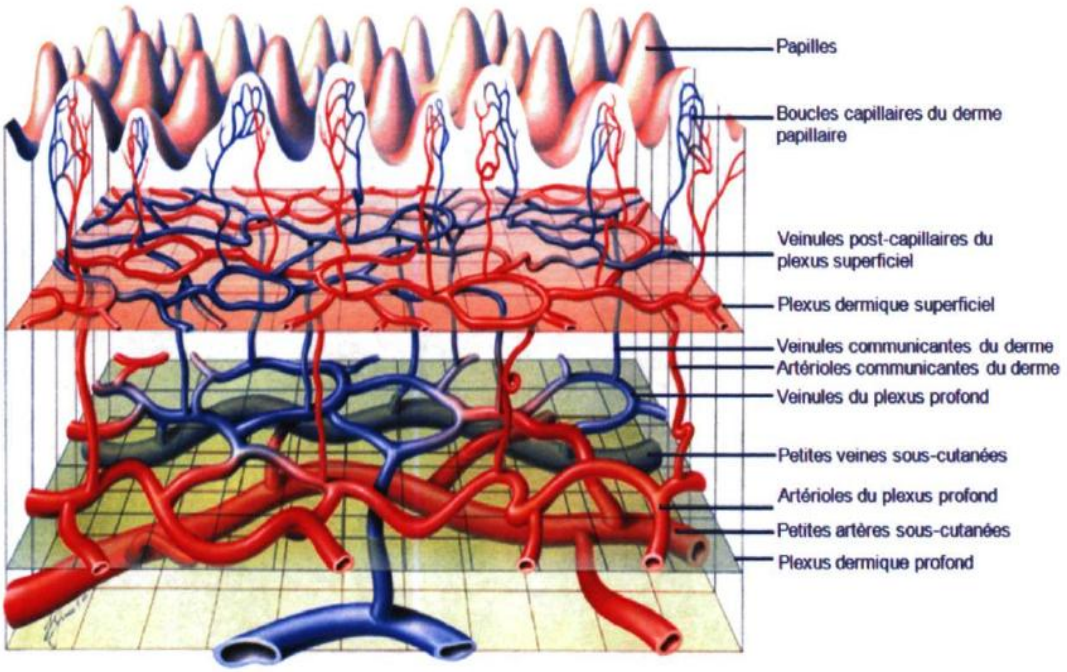


Figure 6. Le réseau vasculaire cutané (Source: Image traduite de Geras et al, 1990).

Le sang arrive du cœur par les artères localisées dans la région sous-cutanée située juste sous l'hypoderme (Figure 7). Il circule ensuite par de petites artères collatérales qui traversent les cloisons conjonctives de l'hypoderme et atteignent le plexus artériel profond (Mélissopopoulos A and Levacher C, 1998). Comme son nom l'indique, le plexus profond se situe dans la partie profonde du derme. Il est relié au plexus artériel superficiel par des artérioles communicantes. A partir du derme superficiel, ces dernières se prolongent dans chacune des papilles dermiques et se subdivisent en plusieurs petits capillaires qui deviennent progressivement de petites veinules post-capillaires rejoignant alors le plexus veineux superficiel.

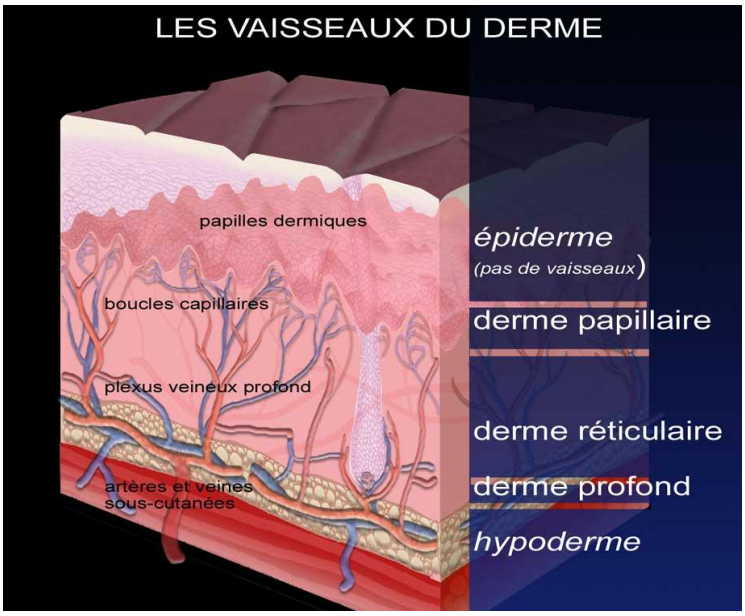


Figure 7. Le réseau vasculaire dermique (Source: Adapté du site http://dermato-info.fr/article/Un_organe_multifonction)

2.6 L'innervation cutanée

La peau est un organe sensoriel et son innervation est donc très dense. Nous donnerons plus de détails dans le chapitre II.

B. La cicatrisation cutanée

1. La cicatrisation des plaies dermiques

Les causes responsables de la perte d'intégrité de la peau peuvent être de différentes origines. Il peut s'agir de traumatismes ponctuels comme les brûlures, les coupures, les éraflures ou encore les piqûres, mais également être consécutives à une intervention chirurgicale.

Il convient alors de distinguer 2 types de plaies :

- Les plaies épidermiques où seul l'épiderme est atteint, la lésion ne saigne pas.
- Les plaies dermiques, plus profondes puisque le derme est atteint, la lésion saigne.

La cicatrisation des plaies profondes est classiquement divisée en 4 étapes se regroupant spatialement et temporellement (Figure 8) :

- La formation du caillot de fibrine
- La phase inflammatoire et la réponse immunitaire
- La phase proliférative et de ré-épithélialisation
- La phase de maturation cicatricielle ou de remodelage.

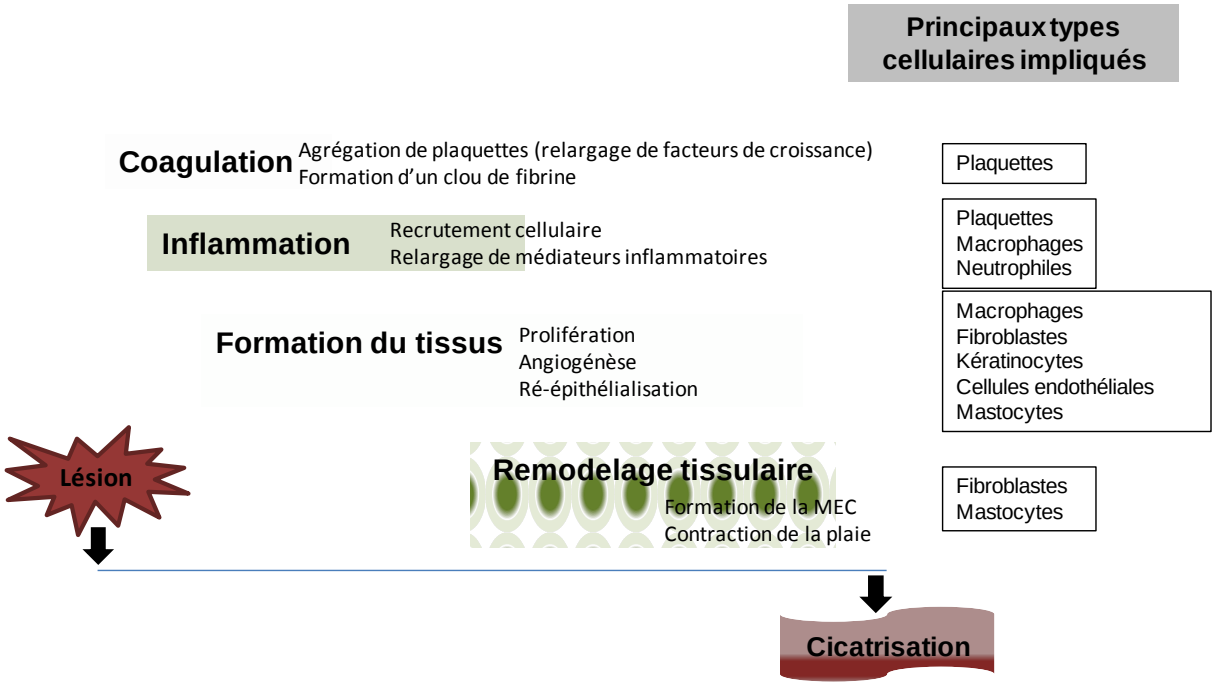


Figure 8. Les différentes étapes de la cicatrisation (Source : Traduit et adaptée de Kawamoto K and Matsuda H, 2004).

1.1 La formation du caillot de fibrine

Lors de plaies profondes, il y a saignement. Cette atteinte du réseau vasculaire doit être rapidement réparée afin de stopper l'épanchement de sang et limiter l'entrée de pathogènes. C'est la première étape de la cicatrisation. Elle consiste en deux processus principaux : la formation du clou plaquettaire (hémostase primaire) et la formation du caillot de fibrine (hémostase secondaire).

1.1.1 La formation du clou plaquettaire

Le clou plaquettaire est une barrière imperméable qui empêche le sang de s'écouler. Il est formé de plaquettes activées, de fibronectine, de vitronectine et de fibrinogène. Les plaquettes réagissent très rapidement, et lorsqu'elles atteignent la lésion, elles s'agrègent en périphérie de la plaie en adhérant au sous endothélium via le facteur de von Willebrand (« von Willebrand Factor » ou vWF) libéré par les cellules endothéliales. Cette liaison entre la glycoprotéine membranaire plaquettaire (« Glycoprotein Ib » ou GPIb) et le facteur vWF active la plaquette qui dégranule et libère de nombreux médiateurs comme les thromboxanes, les prostaglandines et la sérotonine, des glycoprotéines adhésives comme le fibrinogène, la fibronectine et la thrombospondine ainsi que des facteurs de croissance, tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (« Platelet-Derived Growth Factor » ou PDGF), le facteur de croissance épidermique (« Epidermal Growth Factor » ou EGF) et le facteur de croissance transformant-β1 (« Transforming Growth Factor- β1 » ou TGF-β1). Ces différents médiateurs vont permettre l'agrégation et l'activation d'autres plaquettes ainsi que la vasoconstriction temporaire des vaisseaux par la sérotonine et le thromboxane A2 diminuant ainsi le flux sanguin et facilitant l'agrégation plaquettaire. De plus, l'activation des plaquettes permet le recrutement de cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles, lymphocytes T, cellules dendritiques et monocytes/macrophages) qui vont pouvoir combattre les pathogènes mais surtout jouer un rôle dans la dégradation et la formation du tissu cicatriciel.

Le clou plaquettaire est rapidement consolidé par la formation d'un réseau de fibrine pour former le caillot fibrino-plaquettaire.

1.1.2 Le caillot fibrino-plaquettaire

En parallèle de la formation du clou plaquettaire, la transformation du fibronogène soluble en monomères de fibrine insoluble par la thrombine, permet la formation d'un réseau dense qui consolide le clou hémostatique. Cet ensemble formé de plaquettes activées, de fibrine mais également de fibronectine, de vitronectine et de thrombospondine est appelé : caillot fibrino-plaquettaire ou caillot de fibrine.

Il permet de fermer la plaie et sert surtout de matrice provisoire indispensable à l'adhésion, la migration et la prolifération des différents types cellulaires impliquées dans le processus de cicatrisation.

C'est en outre, un réservoir à cytokines et facteurs de croissance important (Tableau 2).

	Source	**Cellules cibles/*Effets***	**Références**
CTGF	Fibroblastes Endothélium	Fibroblastes *Régulation négative du TGF-β1*	Igarashi A et al, 1992
EGF	Plaquettes	Kératinocytes *Mitogène et Motogène*	Nanney LB and King LE, 1996
FGF 1, 2 et 4	Macrophages Cellules endothéliales endommagées	Cellules endothéliales Fibroblastes *Mitogène et angiogénique*	Werner S et al, 1992 Abraham JA and Klagsbrun M, 1996
HB-EGF	Macrophages	Kératinoctes et Fibroblastes *Mitogène*	Marikovsky M et al, 1993
IGF-1	Plaquettes Plasma	Cellules endothéliales et Fibroblastes *Mitogène*	Rappolee DA et al, 1988 Mueller RV et al, 1994
IL-1α et β	Neutrophiles	Macrophages, Kératinocytes et Fibroblastes *Activateurs de facteurs de croissance*	Hubner G et al, 1996
KGF	Macrophages Fibroblastes dermiques	Kératinocytes *Mitogène et Motogène*	Werner S et al, 1992 Abraham JA and Klagsbrun M, 1996
PDGF	Macrophages Kératinocytes Plaquettes	Macrophages et Fibroblastes *Chimiotactisme* *Activation des macrophages* *Mitogène et production de MEC par fibroblastes*	Eriksson A et al, 1992
TGF-α	Macrophages Kératinocytes	Kératinocytes *Mitogène et Motogène*	Nanney LB and King LE, 1996 Rappolee DA et al, 1988
TGF-β1 et TGF-β2	Macrophages Plaquettes	Kératinocytes, Macrophages et Fibroblastes *Migration des kératinocytes,* *Chimiotactisme pour les macrophages et les fibroblastes,* *Synthèse et remodelages de la MEC par les fibroblastes*	Roberts AB and Sporn MB, 1996 Frank S et al, 1996
TGF-β3	Macrophages	Anticicatrisant	Roberts AB and Sporn MB, 1996 Frank S et al, 1996
TNF-α	Neutrophiles	Comme les IL-1	Hubner G et al, 1996
VEGF	Macrophages Kératinocytes	Cellules endothéliales *angiogénèse*	Brown LF et al, 1992 Berse, 1992

Tableau 2. Liste des facteurs de croissance et cytokines impliquées dans la cicatrisation cutanée (Source : Traduit et adapté de Martin P, 1997). CTGF=Connective Tissue Growth Factor; FGF=Fibroblast Growth Factor; HB-EGF=Heparin-Binding Growth Factor; IGF=Insulin-like Growth Factor; KGF= Keratinocyte Growth Factor; TNF= Tumor Necrosis Factor

1.1.3 La fibrinolyse

Cette première étape est clôturée par une étape essentielle à la bonne fermeture de la lésion : la dégradation du caillot de fibrine. Ce processus est nommé fibrinolyse et est initié par la plasmine.

Le système fibrinolytique est un système protéolytique multifonctionnel qui a pour but de dégrader les dépôts de fibrine ainsi que la matrice extracellulaire. Dans ce système, le plasminogène, une sérine protéase plasmatique présent dans le caillot au moment de sa formation et ayant une grande affinité pour la fibrine, est activé en plasmine par deux autres enzymes à activité sérine protéases, l'activateur tissulaire du plasminogène (« tissue-type Plasminogen Activator » ou t-PA) et l'urokinase (« urokinase-type Plasminogen Activator » ou u-PA).

Ce système est régulé par :

- Les antiplasmines dont l'α2-antiplasmine (α2-AP)
- Les inhibiteurs des sérines protéases, les SERPINs (« SERine Proteases INhibitors ») que sont l'inhibiteur des activateurs du plasminogène-1 ou PAI-1 (« Plasminogen Activators Inhibitor-1 »), et la neuroserpine (NSP),
- L'inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine (« Thrombin-Activated Fibrinolysis Inhibitor » ou TAFI).

L'ensemble de ces composants est regroupé sous la Figure 9.

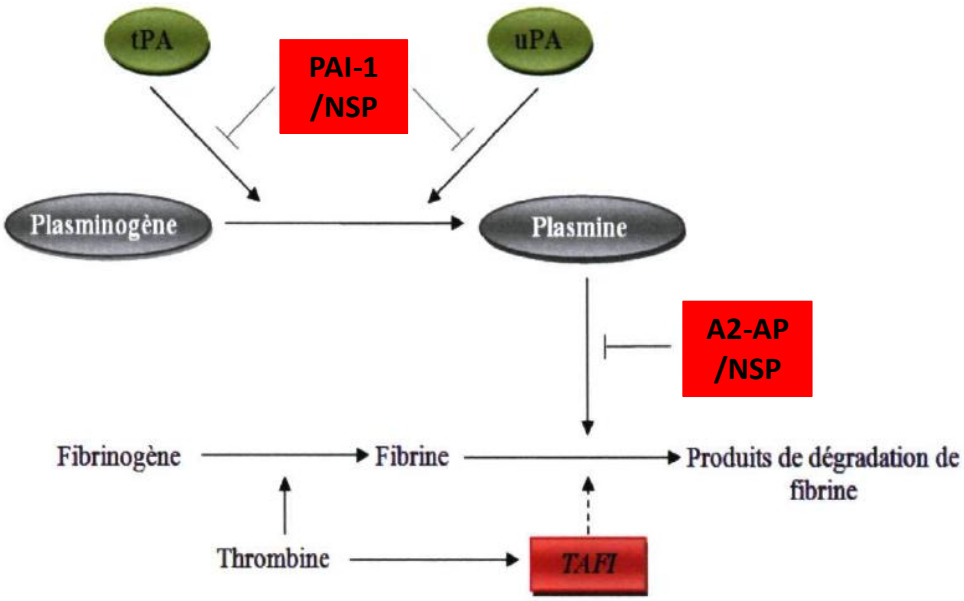


Figure 9. La fibrinolyse (Source: Image traduite et adaptée de Rijken *et al*, 2009).

✓ l'α2-antiplasmine (α2-AP) est produite par le foie et dans les granules alpha des plaquettes. Sa concentration plasmatique est élevée. Elle se lie au plasminogène et à la plasmine pour former un complexe qui sera éliminé par le foie. Cependant, la plasmine est protégée de l'action inhibitrice de l' α2-AP alors qu'elle est liée à la fibrine. Le PAI-1 est le principal inhibiteur de l'u-PA et du t-PA et a une très forte affinité pour ces activateurs du plasminogène. Il appartient à la famille des Serpines. Cependant, parallèlement à son activité anti-protéolytique, il participe également aux phénomènes d'adhésion et de migration cellulaire lors de la réparation tissulaire du fait de sa capacité à lier la vitronectine. Cette liaison lui assure d'autre part sa stabilité. De nombreux types cellulaires sont capables de produire et sécréter cette glycoprotéine et son expression est surtout induite et peu constitutive. Ainsi, dans des conditions particulières comme l'inflammation et la réparation tissulaire, les cellules endothéliales, les monocytes/macrophages ou encore les plaquettes libèrent le PAI-1.

✓ La neuroserpine ou NSP est un inhibiteur typique des sérines protéases appartenant à la famille des serpines tout comme PAI-1, qui agit comme un substrat suicide (Osterwalder T et al. 1998). Principalement exprimée au niveau du système nerveux central, dans les cellules gliales et neuronales, son expression a depuis été démontrée dans d'autres tissus (pancréas, cœur, rein et testicules). Cependant, elle n'a jamais fait l'objet d'études dans la peau (Miranda E and Lomas DA, 2006 ; Osterwalder T et al, 1998 ; Docagne F et al, 1999). Tout comme PAI-1, elle a la capacité de bloquer à la fois le tPA et l'uPA mais a aussi la particularité d'inhiber la plasmine (Osterwalder T et al. 1998). Ainsi, en agissant à la fois sur les trois acteurs du système fibrinolytique, la neuroserpine est un régulateur important du système fibrinolytique.

✓ Le TAFI ou procarboxypepetidase B est une protéine plasmatique, inhibant directement la fibrinolyse. Il empêche la fixation du plasminogène et du t-PA sur la fibrine en supprimant de cette dernière les résidus lysine en position C-terminale exposés à sa surface. Elle est activée durant la coagulation par le système thrombine/thrombomoduline.

1.2 La phase inflammatoire

La phase inflammatoire débute au cours de la formation du caillot de fibrine. En effet, les divers fragments produits au cours de la coagulation ainsi que les nombreuses cytokines, facteurs de croissance et protéines adhésives libérés par les plaquettes activées vont favoriser le recrutement et la migration des cellules immunitaires au niveau du site de la lésion. Le bon déroulement de la phase inflammatoire est caractérisé par une coopération spatio-temporelle de ces différents acteurs (Figure 10).

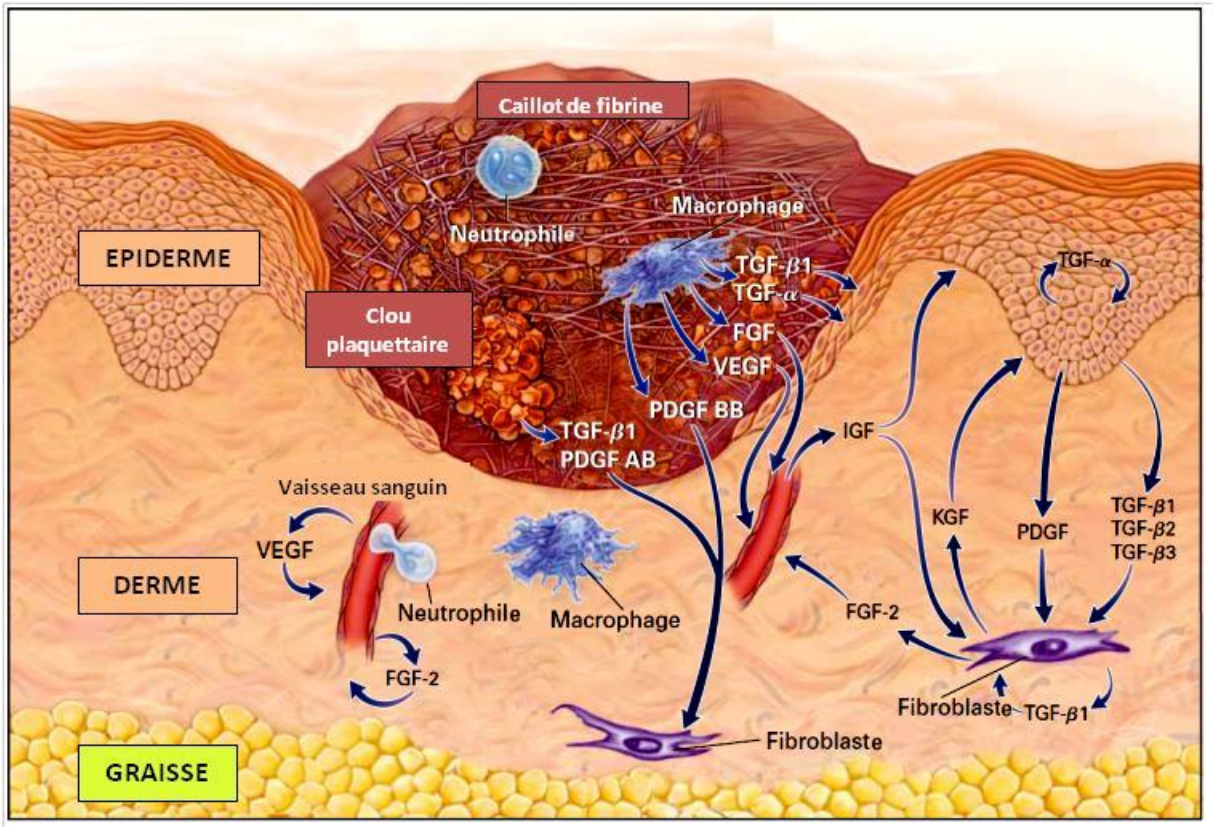


Figure 10. La phase inflammatoire (Source: Image traduite et adaptée de Singer AJ and Clark RA, 1999).

✓ <u>Les polynucléaires neutrophiles</u>

Les polynucléaires neutrophiles sont les premières cellules inflammatoires recrutées à infiltrer la plaie. Ils sont piégés avec les plaquettes dans le caillot et libèrent un mélange complexe de cytokines et de facteurs de croissance dont ENA-78 (CXC15) permettant de recruter d'autres cellules inflammatoires, amplifiant ainsi la réponse inflammatoire et l'agrégation. De nombreux facteurs participent au recrutement des neutrophiles au site de réparation. Parmi ceux-ci, on retrouve le PDGF, l'IL-8, la MCP-1 (« Monocyte Chemoattractant Protein »), la NAP-2 (« Neutrophil Activating Peptide 2 »), le GROα (« Growth Related Factor α») sécrétés par les cellules endothéliales mais également les produits de dégradation bactériens (lipopolysaccharides), l'activation des voies classiques et alternes du complément ou encore les produits de dégradation de la fibrine. Au site de lésion, les neutrophiles participent au nettoyage de la plaie en éliminant les débris cellulaires et tissulaires ainsi que les pathogènes présents.

Au bout de quelques jours, les neutrophiles ne sont plus attirés vers la plaie sans doute à cause d'une désensibilisation de leur récepteur aux chémo-attractants et/ou à la libération de cytokines par les kératinocytes lésés qui inhiberaient leur migration (Gillitzer R and Goebeler M, 2001 ; Sato Y et al, 1999). Ils vont attirer et activer d'autres cellules immunitaires comme les monocytes/macrophages par les cytokines qu'ils libèrent. Plus tard, ces derniers les phagocyteront (Singer AJ and Clark RA, 1999 ; Eming SA et al, 2007 ; Meaume S et al, 2005).

- ✓ Les macrophages

Les monocytes circulants sont recrutés en grand nombre au niveau de la lésion lorsque le nombre de neutrophiles commence à diminuer. Arrivés au site de lésion, ils sont activés et se différencient en macrophages.

Les macrophages sont les seules cellules à supporter l'hypoxie aux bordures de la plaie. Ces cellules participent au débridement par lyse enzymatique (production de protéases, élastases, et collagénases) ainsi que par phagocytose mais également à l'amplification de la réponse immunitaire en sécrétant des cytokines et facteurs de croissance, attractants pour les autres cellules de l'infiltrat inflammatoire et en présentant les antigènes aux lymphocytes. Ce sont des cellules très actives de la réparation tissulaire qui favorisent l'angiogénèse, la migration et la prolifération cellulaires ainsi que la production de matrice extracellulaire afin de former le tissu de granulation.

Les études classiques de Leibovich SJ and Ross R, 1975 ont démontré l'importance de ces cellules dans la cicatrisation cutanée, puisqu'une déplétion expérimentale de macrophages « cicatriciels » prolonge l'inflammation et entraine des retards dans la prolifération des fibroblastes, le dépôt de la matrice et par conséquent de la cicatrisation.

✓ Les mastocytes

Les mastocytes sont déjà présents dans la peau non lésée. Ils vont dégranuler quelques heures après le traumatisme en périphérie de la lésion et participer au recrutement des neutrophiles et des macrophages. L'activation des mastocytes semble être induite par des interactions entre le SCF (« Stem Cell Factor ») et le c-Kit ligand, tous deux exprimés à leur surface. Par ailleurs, ils sécrètent des médiateurs tels que l'histamine, le PAF (« Platelet Activating Factor »), des protéoglycanes ou des protéases et vont également favoriser la prolifération ultérieure des fibroblastes via la production d'IL-4.

✓ Les Lymphocytes T et les cellules dendritiques

La dernière vague des cellules de l'inflammation est celle des lymphocytes T et des cellules dendritiques. Elle intervient plus tard, lorsque la plaie est rebouchée, au moment du remodelage. L'attraction de ces cellules se fait grâce au MCP-1 et à l'Interféron Ɣ (IFN-Ɣ) sécrétés principalement par les macrophages et peut être amplifiée sous l'effet de certaines molécules pro-angiogéniques. Par ailleurs, leur production cytokinique favorise la réparation tissulaire.

1.3 La phase de ré-épithélialisation

Le processus de ré-épithélialisation commence environ 24 heures après la lésion avec la migration et la prolifération des kératinocytes situés en périphérie de la plaie mais également des cellules situées plus en profondeur, autour des follicules pileux, riche en cellules souches. C'est une phase essentielle de la cicatrisation qui va permettre de restaurer l'intégrité de la peau avec la formation d'un nouvel épiderme. Elle peut se diviser en trois étapes : la migration, la prolifération et la formation du nouvel épiderme (Figure 11).

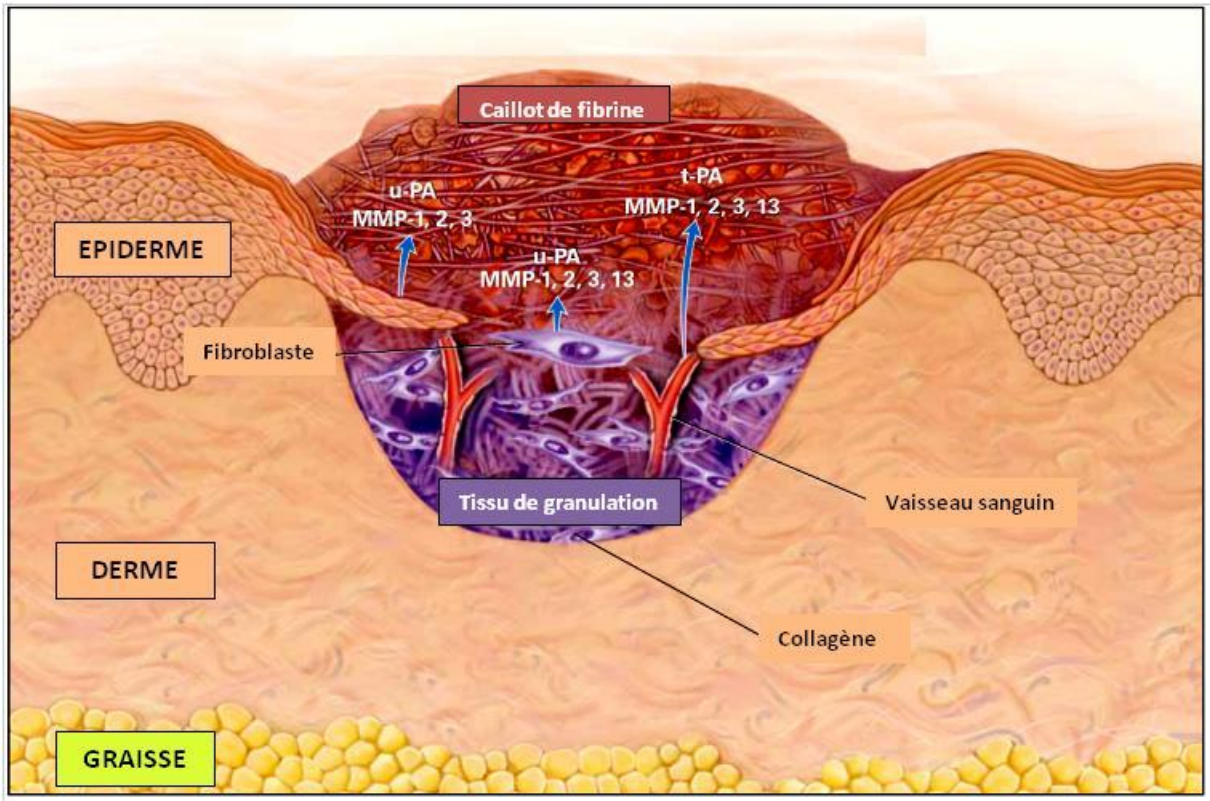


Figure 11. La phase de prolifération (Source: Image traduite et adaptée de Singer AJ and Clark RA, 1999).

1.3.1 Migration

Dans la peau non lésée, les kératinocytes basaux adhérent à la laminine de la lame basale grâce à l'intégrine α6β4 située sur leur membrane, cette liaison est nommée hémidesmosome. Ces hémidesmosomes sont en contact étroits avec le réseau de cytosquelette de kératine. Après une blessure, les kératinocytes lésionnels doivent perdre leurs interactions et exprimer de nouvelles molécules d'adhérence afin de faciliter leur migration sur la néo-matrice. Ainsi, l'α5β1 et αvβ6, ainsi que l'αvβ5 sont exprimés leur permettant d'interagir respectivement avec la fibronectine, la ténascine et la vitronectine. Par ailleurs l'α2β1, récepteur au collagène, est relocalisé, permettant aux cellules de créer de nouveaux contacts avec les collagènes de la membrane basale (de type IV et VII) et les collagènes interstitiaux (de type I, III et VI).

Lorsque les kératinocytes migrent, leur morphologie change, ils s'aplatissent, s'allongent et forment des lamellipodes. Ces modifications impliquent un

réarrangement des filaments d'actinomyosine du cytosquelette sur les nouvelles molécules d'adhérence et la contraction du cytosquelette permet la migration des kératinocytes.

Ces contacts semblent favoriser la production kératinocytaire de MMPs, ainsi que l'activité de ces enzymes, indispensables à la régénération épidermique. Durant cette phase, les cytokératines suprabasales K1 et K10 sont remplacées par les cytokératines flexibles K6 et K16, dont l'expression est régulée par des facteurs de croissance tels que l'EGF, le TGF-α et le TGF-β présents à des niveaux élevés dans la matrice provisoire (Jiang CK et al, 1993). Lors de la ré-épithélialisation, ces kératines 6 et 16 sont majoritairement exprimées par les kératinocytes suprabasaux de la zone cicatricielle.

D'autres composants de la matrice extracellulaire et de la jonction dermo-épidermique sont connus pour inhiber la migration des kératinocytes et favoriser leur attachement, en particulier la laminine 5 qui pourrait donc également jouer un rôle dans leur différenciation.

Le stimulus initiateur de la migration kératinocytaire reste à définir mais étant donné que l'état d'hypoxie favorise la disparition de la jonction dermo-épidermique, il pourrait s'agir du facteur déclencheur.

1.3.2 Prolifération

Les kératinocytes de la couche basale, situés loin du bord de la lésion (environ 300 à 400 cellules), prolifèrent abondamment; le pic de prolifération se situe 1-2 jours après la lésion, puis retombe pour atteindre des niveaux de base 14 jours environ après la blessure. Les cellules suprabasales dérivées de cette prolifération extensive, s'étendent sur les cellules basales liées, pour former de nouvelles cellules basales au niveau des bords de la lésion. Ce processus est répété jusqu'à ce que la ré-épithélialisation soit complète.

La migration des kératinocytes, tout comme la direction de leur déplacement ou leur prolifération, est favorisée par les boucles autocrines EGF/EGFR. La production autocrine de GM-CSF (« Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor ») favorise la prolifération des kératinocytes. L'IL-8 et GRO-α semblent

également favoriser la migration kératinocytaire. Les kératinocytes migrants représentent une source importante de facteur de croissance et de chimiokines, dont la plupart jouent un rôle dans le processus inflammatoire, en particulier le TNF-α, l'IL-1, et le GM-CSF. De cette manière, le maintien de l'état inflammatoire est favorisé tout comme par la suite la formation du tissu de granulation et la néo-vascularisation.

1.3.3 Protéases régulatrices de la ré-épithélialisation

Afin de pouvoir migrer à travers le caillot de fibrine et entre le clou hémostatique et le tissu sain, les kératinocytes doivent dissoudre la barrière de fibrine. Pour cela, ils libèrent des enzymes protéolytiques tels que les enzymes du système fibrinolytique et les MMPs (Morris VL and Chan BM, 2007 ; Romer J et al, 1991).

- ✓ <u>Le système fibrinolytique</u>

Nous avons déjà décrit ce système (cf. partie 1.1.3) et ses différents composants. Le rôle crucial de ce système a été démontré dans un modèle de souris transgénique où le gène codant pour le plasminogène était déficient. Les auteurs démontraient ainsi que l'étape de ré-épithélialisation était totalement bloquée (Grondahl-Hansen J, 1988). Par ailleurs, la sur-expression de l'u-PA et du t-PA mais aussi du récepteur à l'u-PA a été démontrée chez les kératinocytes migrant (Grondahl-Hansen J, 1988).

De plus, PAI-1 est un inhibiteur indirect de la dégradation matricielle par sa capacité à limiter l'activation dépendante des MMPs par la plasmine. Les serpines semblent jouer un rôle pivot entre le système fibrinolytique et les MMPs en limitant la formation de plasmine (Figure 12).

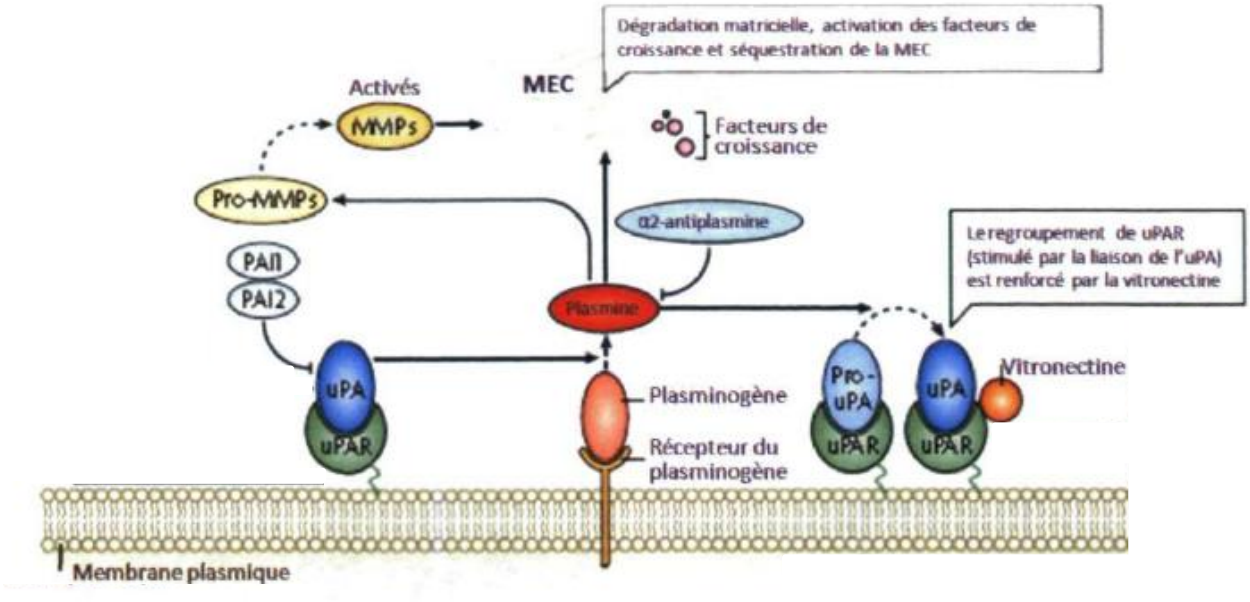


Figure 12. Le clivage des MMPs par le système fibrinolytique (Source: Image traduite et adaptée de Smith HW and Marshall CJ, 2010).

✓ Les MétalloProtéases Matricielles (MMPs)

Les MMPs sont une famille de métalloenzymes dépendante du zinc capables de dégrader tous les composants de la matrice extracellulaire. Elle est divisée en quatre sous-groupes en fonction de leur substrat spécifique et de leur structure primaire:

- les collagénases (MMP-1, -8, -13),
- les gélatinases (MMP-2, -9),
- les stromélysines (MMP-3, -10, -11, -12, -7), et
- les MMPs de type membranaire (MT-MMPs) (MMP-14, -15, -16, -17).

En général, la structure des MMPs est caractérisée par un peptide signal, un propeptide, un domaine catalytique contenant un site de liaison zinc très conservé, une zone charnière, et un domaine hemopexine tronqué dans les matrilysines. De plus, les gélatinases (MMP-2 et -9) contiennent un insert fibronectine de type II à l'intérieur du domaine catalytique. Ces enzymes ont également besoin de calcium pour leur activité.

Hormis les MT-MMPs, la plupart des MMPs sont sécrétées sous forme d'un zymogène latent (pro-MMP) qui est activé par protéolyse libérant un pro-domaine. Le site actif est ainsi accessible.

Dans la peau, plusieurs types différents de cellules sont capables de produire des MMPs : les kératinocytes migrant bien sur mais également les fibroblastes, les cellules endothéliales, et les cellules inflammatoires (mastocytes, polynucléaires éosinophiles et neutrophiles).

A l'exception des MMP-7, -8 et -9, les MMPs ne sont pas constitutivement exprimées mais temporairement induites en réponse à des signaux exogènes, comme des cytokines ou des facteurs de croissances, des interactions cellules-matrice (Saarialho-Kere UK et al, 1993; Heino J, 1996; Vaalamo M, 1997) et des altérations de contacts entre cellules (Lacraz S, 1997). Les MMPs peuvent être impliquées dans diverses tâches au cours de la cicatrisation cutanée comme: 1) l'élimination des tissus dévitalisées; 2) les interactions épiderme-mésenchyme au cours de la migration des kératinocytes, 3) l'angiogenèse, 4) le remodelage des tissus conjonctifs nouvellement synthétisé au cours de la maturation, et 5) la régulation des activités de certains facteurs de croissances (Risau W, 1995). Ainsi elles jouent un rôle important dans le détachement et la migration des cellules de la peau, indispensables à une bonne réparation tissulaire mais également dans l'étape de ré-épithélialisation et l'angiogenèse (Lemaître V and D'Armiento J, 2006). De plus, plusieurs MMPs (MMP-1, -2, -3, -7, -9, -10, -14 et -28) sécrétées au niveau de la plaie régulent l'inflammation en modulant l'activité des chémokines (pour revue Gill SE and Parks WC, 2008 ; Toriseva M and Kähäri VM, 2009).

Un nombre croissant d'études indique que la dégradation contrôlée de la matrice extracellulaire par les MMPs joue un rôle crucial dans la cicatrisation cutanée. Ainsi, il existe un équilibre fragile entre les concentrations présentes au niveau de la plaie de MMPs et de leurs inhibiteurs, les inhibiteurs tissus spécifiques des métalloprotéinases ou TIMPs (« Tissue Inhibitor of Metalloprotease »). Ils se lient au site catalytique de la MMP, empêchant ainsi le substrat de se fixer. Une rupture d'équilibre protéases/inhibiteurs entraine la perte de l'homéostasie et le développement de processus dégénératif comme un retard de cicatrisation voire aucune cicatrisation, favorisant la formation de plaies chroniques (Figure 13). Ainsi,

des taux élevés de MMPs et des concentrations faibles de TIMP-1 sont retrouvés dans les plaies chroniques.

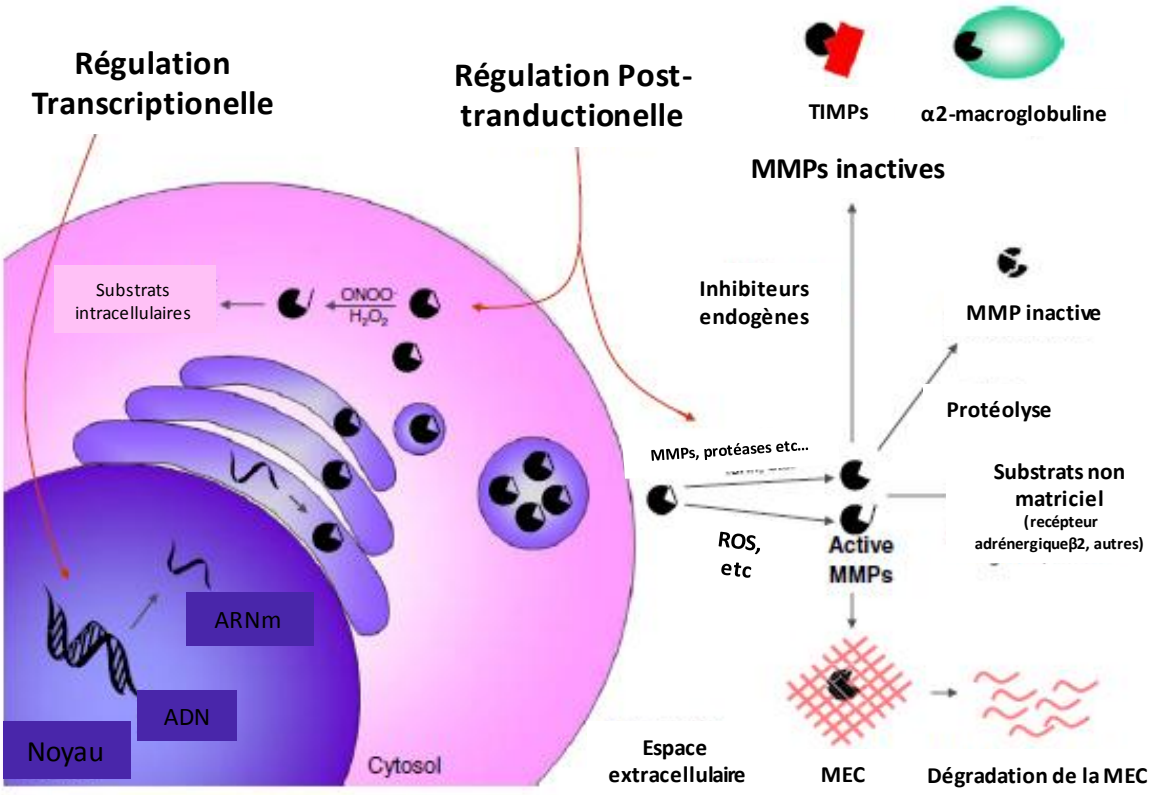


Figure 13. Régulation de l'expression et de l'activité des MMPs (Source : Traduite de Fontana V *et al*, 2012).

Vingt-trois MMPs ont été décrites chez l'homme mais seules quelques-unes d'entre elles sont particulièrement impliquées dans la cicatrisation cutanée. Nous nous sommes particulièrement intéressés à deux d'entre elles : la MMP-2 et la MMP-9.

Les MMP-2 et MMP-9 sont des gélatinases de 72 et 92 kDa respectivement. Dans la peau normale adulte, la MMP-2 est constitutivement exprimée par les fibroblastes dermiques et occasionnellement par les kératinocytes basaux. La MMP-9 est exprimée dans l'épiderme inférieur par les kératinocytes et elle est également stockée dans les granules des polynucléaires neutrophiles et des éosinophiles, mais elle n'est pas exprimée par les fibroblastes. Cependant, une étude menée sur des co-cultures de kératinocytes et fibroblastes primaires humains a démontré que l'expression de la MMP-9 pouvait être induite chez les fibroblastes en présence de kératinocytes. L'activité de la MMP-2 était également augmentée (Sawicki G et al,

2005) dans la co-culture suggérant une boucle de régulation paracrine/autocrine de l'expression de ces deux gélatinases par ces deux types cellulaires.

Au cours de la cicatrisation cutanée, le taux d'expression de la MMP-9 est fortement augmenté alors que celui de la MMP-2 reste stable au cours des jours suivant la lésion (Salo T, 1994). Malgré ces différences d'expression, ces deux protéases jouent un rôle important dans le processus de cicatrisation cutanée. En effet, ces deux gélatinases possèdent une activité collagénolytique. La MMP-2 clive le collagène natif de type I en deux fragments, ¾ N-terminal et ¼ C-terminal, ces deux fragments étant identiques à ceux générés par les collagénases (Aimes RT and Quigley JP, 1995). La MMP-9 peut aussi cliver le collagène de type I, le collagène de type IV de la lame basale et le collagène de type V (Okada Y et al, 1995). Cette activité collagénolytique leur confère un rôle crucial dans la ré-épithélialisation en libérant les kératinocytes de leurs attaches à la membrane basale, favorisant ainsi leur migration. L'utilisation d'anticorps bloquant ou d'inhibiteurs spécifiques de l'activité de la MMP-9 ont clairement démontré son rôle dans la migration cellulaire (McCawley LJ, 1998). Cette action sur la migration ne se limite pas aux kératinocytes mais permet à d'autres types cellulaires impliqués dans la cicatrisation de migrer dans la matrice cicatricielle comme les fibroblastes. De plus, cette capacité à initier et continuer la dégradation des fibres de collagènes font des MMP-2 et -9 des acteurs essentiels dans le remodelage du tissu de granulation.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'activité de ces deux protéases est finement régulée par leurs inhibiteurs spécifiques, les TIMPs. Il apparait que les membres TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4 sont capables d'inhiber la MMP-2 et la MMP-9. Il semble que TIMP-1 se lie préférentiellement à la pro-MMP-9 alors que TIMP-2 et -4 agisse sur la pro-MMP-2.

1.3.4 Le néo-épiderme

Une fois que la plaie est recouverte par une monocouche de kératinocytes, la migration s'arrête et une nouvelle lame basale est formée. Les cellules se différencient à partir des bords de la languette de ré-épithélialisation vers le centre jusqu'à former un épiderme différencié et fonctionnel. La différenciation kératinocytaire peut être suivie par l'expression de marqueurs de différenciation comme la filaggrine ou les kératines supra-basales.

Au cours de la ré-épithélialisation, les kératinocytes sécrètent des facteurs de croissance dont certains ont une action directe sur la formation du tissu de granulation tels que le TGF-β1, le KGF, le VEGF ou encore l'EGF (Darby IA, Hewitson TD).

1.4 La formation du tissu de granulation

La formation du tissu de granulation débute dans les 3 à 4 jours qui suivent la blessure et constitue l'étape de reconstruction du derme ou fibroplasie. Elle se caractérise par la prolifération et la migration des cellules impliquées dans la synthèse de la MEC définitive (les fibroblastes) et dans la néo-angiogénèse (les cellules endothéliales). Ces cellules migrent et prolifèrent en réponse à des stimuli (facteurs de croissance, cytokines) libérés au cours des premières étapes de la cicatrisation tels que le PDGF, l'IL-6, le TGF-β1, le bFGF et le VEGF. La richesse en fibronectine et en vitronectine de la MEC provisoire rend possible la migration des cellules (Singer AJ and Clark RA, 1999 ; Toriseva M and Kähäri VM, 2009).

1.4.1 Une nouvelle matrice extracellulaire

La synthèse de cette nouvelle MEC est assurée par les myofibroblastes. Les myofibroblastes sont des fibroblastes spécialisés activés qui participent à la réparation tissulaire en élaborant et en réorganisant efficacement la matrice. Par ailleurs, leurs puissantes forces contractiles exercées sur la matrice permettent de réduire rapidement la taille de la lésion, diminuant ainsi le temps de ré-épithélialisation.

En migrant au sein de la matrice provisoire, les myofibroblastes sécrètent et assemblent une matrice extracellulaire complexe. Au départ, il s'agit principalement de fibronectine et de protéoglycanes ce qui favorise le déplacement des cellules (Singer AJ and Clark RA, 1999 ; Toriseva M and Kähäri VM, 2009, Goldman R, 2004). Ensuite, ils synthétisent des faisceaux de collagène de type I et III dont le rapport d'expression varie au cours de la cicatrisation. Ainsi, dans la peau normale, le collagène de type I et le collagène de type III constituent respectivement 80% et 10% du collagène présent. En cas de blessure, les étapes précoces de la cicatrisation sont caractérisées par des niveaux élevés de collagène de type III, qui

est progressivement remplacé par du collagène de type I, plus résistant (Abercrombie M et al, 1956). Le renouvellement de la MEC est facilité par une gamme de protéases libérée par les myofibroblastes au cours de leur migration, tels que la plasmine, l'uPA, les élastases, la hyaluronidase et les MMPs (Mignatti P et al, 1996). L'activité de ces protéases est finement contrôlée par des inhibiteurs protéolytiques tels que les TIMPs qui inhibent l'activité des MMPs, mais également par des facteurs de croissance, comme l'IL-6 (Young PK and Grinell F, 1994 ; Luckett LR and Gallucci RM, 2007). L'IL-10 et le bFGF peuvent tous deux réguler le remodelage de la MEC au cours de la cicatrisation cutanée (Moroguchi A et al, 2004; Xie J et al, 2008).

Les myofibroblastes ont été initialement identifiés par microscopie électronique en 1971. Au sein du tissu de granulation, ils apparaissent comme des fibroblastes modulés, présentant des caractéristiques identiques à celles des cellules du muscle lisse (« Smooth Muscle » ou SM), telles que les faisceaux de microfilaments, avec des corps denses dispersés et la formation de complexes jonctionnels spécialisés avec l'ECM (Gabbiani G et al, 1971). De nombreux travaux ont ensuite contribué à définir morphologiquement et biochimiquement ce type de cellule, en montrant que ces structures contractiles étaient représentés par des fibres de stress exprimant l'isoforme d'actine spécifique des cellules du muscle lisse (« α-Smooth Muscle Actine » ou α-SMA) (Darby I et al, 1990).

L'origine des myofibroblastes est encore largement méconnue. Pendant très longtemps, leur origine était attribuée aux fibroblastes provenant de la périphérie des plaies. Cette hypothèse provient d'observations faites sur des coupes histologiques de plaies cutanées montrant une forte concentration de fibroblastes en périphérie de la lésion. Ces fibroblastes présentaient un taux prolifératif élevé et produisaient des MMPs suggérant que ces cellules étaient impliquées dans un processus de migration (Desmouliere, A et al, 2004). Plus tard, il a été observé *in vivo* que l'inhibition du PDGFR-P réduisait le nombre de myofibroblastes dans la plaie en affectant la prolifération et la migration des fibroblastes localisés en périphérie de la plaie (Rajkumar VS et al 2006). Bien que l'origine fibroblastique des myofibroblastes soit toujours acceptée, plusieurs études leur attribuent une origine multiple : fibrocytes, cellules épithéliales, cellules endothéliales, péricytes et bien d'autres encore (Bellini

A and Mattoli S, 2007; Yang J and Liu Y, 2001; Li J et al, 2009 ; Lin SL et al, 2008 ; De Wever O et al, 2008). Des données récentes ont mis en cause les cellules circulantes, appelé fibrocytes, dans le processus de réparation des tissus. Les fibrocytes entrent dans le site de lésion en même temps que les cellules inflammatoires et acquièrent un phénotype myofibroblastique (Bucala R et al, 1994).

Il est toutefois accepté, surtout au niveau de la cicatrisation des plaies cutanées, que les fibroblastes et les précurseurs de la moelle osseuse soient la principale source des myofibroblastes (Desmouliere, A et al, 2004 ; De Wever O et al, 2008).

Bien que la modulation vers le protomyofibroblaste ne soit actuellement pas bien explorée, le passage du protomyofibroblaste au myofibroblaste différencié a été lié à la production par les cellules inflammatoires et, éventuellement, par les cellules fibroblastiques, au facteur de croissance TGF-β1, le stimulateur le plus reconnu de la différentiation myofibroblastique (Desmoulière A et al, 1993). La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes est régulée par un ensemble de facteurs. Différentes cytokines comme le bFGF, le PDGF et le TNF-α vont induire la migration et la prolifération des fibroblastes de la périphérie de la plaie (Serini G and Gabbiani G, 1999). La différenciation est induite par le TGF-β1 en présence de fibronectine cellulaire (isoforme ED-A) et de tensions mécaniques dans le tissu (Hinz B et al, 2003, Tomasek JJ et al, 2002). Le TGF-β1 induit l'expression de l'α-SMA qui, via les points focaux d'adhésion, exerce une force contractile sur la matrice extracellulaire. *In vitro*, lorsque la force contractile est maintenue, le phénotype de myofibroblaste est également maintenu alors que dans le cas inverse, le phénotype disparaît (Figure 14) (Tomasek JJ et al, 2002).

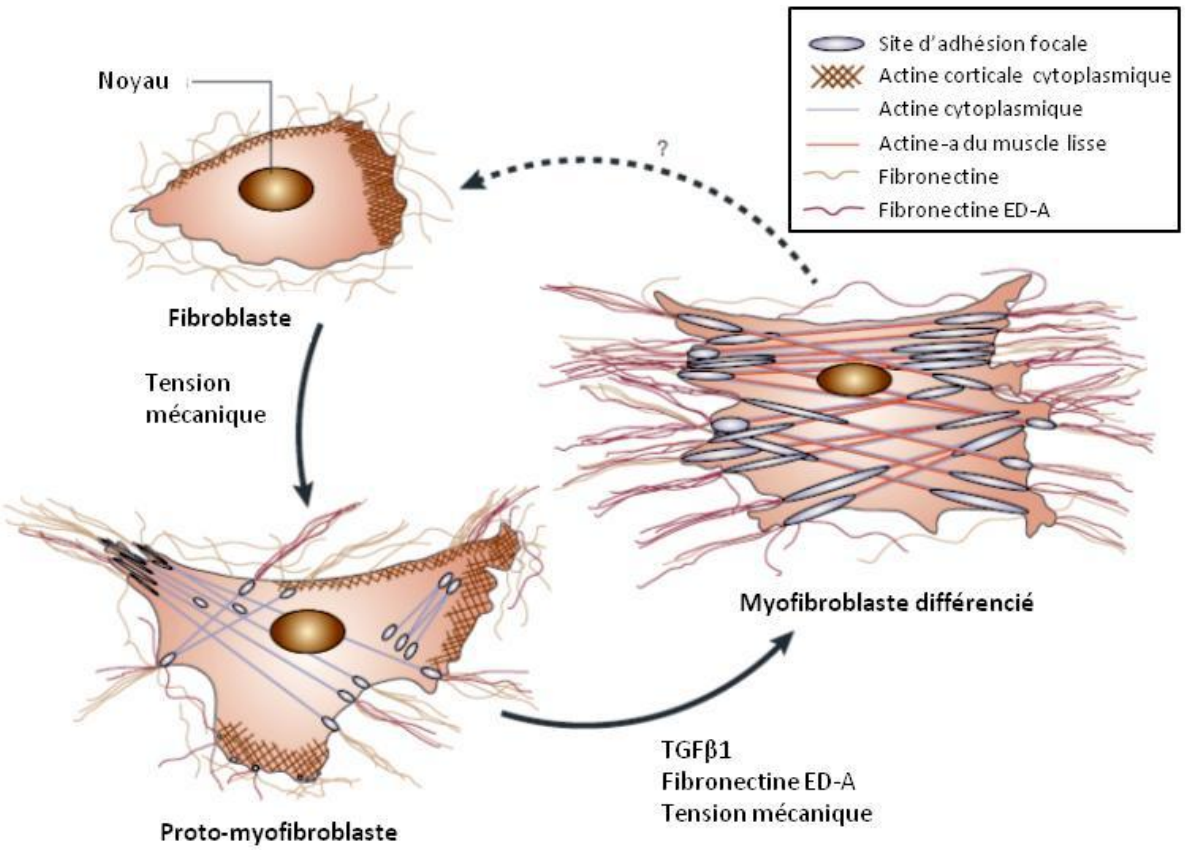


Figure 14. La différenciation myofibroblastique (Source: Image traduite et adaptée de Tomasek JJ *et al*, 2002).

Des molécules d'origine neuronales peuvent également favoriser la différenciation des fibroblastes dermiques en myofibroblastes. En effet, le facteur de croissance neuronale (« Neuronal Growth Factor » ou NGF) favorise cette différenciation en induisant l'expression de l'α-SMA et en réduisant la production de MMP-2. Les myofibroblastes vont sécréter plus de collagène de type I que les fibroblastes et le NGF est connu pour réduire la sécrétion de ce type de collagène dans les myofibroblastes (Marconi A et al, 2004). Le NGF et la neurotrophine 3 (« neurotrophin-3 » ou NT-3) peuvent également stimuler la migration des fibroblastes, qui pourrait être modulée par des tensions mécaniques dans le derme (Kim M et al, 2009). En effet, le stress mécanique stimule les nocicepteurs mécanosensibles des fibres sensorielles de la peau qui libèreront les neuropeptides impliqués dans l'activation des fibroblastes (Akaishi S et al, 2008).

Une complication du processus cicatriciel est le développement fibrotique tel qu'observé au cours de la cicatrisation hypertrophique. La cicatrisation hypertrophique survient fréquemment suite à un traumatisme important comme une

brûlure à la peau ou une intervention chirurgicale. La fibrose se caractérise par une persistance du tissu de granulation riche en myofibroblastes et une production anormalement élevée de matrice extracellulaire provoquant un durcissement du tissu.

Lorsque la blessure est refermée, les myofibroblastes sont éliminés par apoptose (Desmoulière A et al, 2005 ; Tomasek JJ et al, 2002).

1.4.2 La néo-vascularisation

La néo-vascularisation du tissu en cours de formation est une étape importante de la cicatrisation puisqu'elle va favoriser l'élimination des débris cellulaires et tissulaires, le recrutement des cellules inflammatoires ainsi que permettre l'approvisionnement du tissu de granulation en éléments nutritifs et en oxygène. Ce processus est assuré par les cellules endothéliales et des péricytes qui migrent et prolifèrent au travers de la matrice de fibrine à partir des vaisseaux sains situés en périphérie de la plaie. L'activation des cellules endothéliales est favorisée par l'état d'hypoxie mais surtout par un certains nombre de facteurs pro-angiogéniques (VEGF, fFGF, TGF-β, NGF, PDGF, FGF-2, GM-CSF) produits par les macrophages, les plaquettes et les kératinocyte présents dans ce nouvel environnement. De plus, il semble que la production de ces molécules pro-angiogéniques peut être régulée de manière autocrine par les cellules endothéliales elles-mêmes, notamment celle d'IL-8, de VEGF, GRO-a, IP-10 (« Interferon Ɣ-induced peptide 10 ») ou mig. Les vaisseaux néo-formés représentent ainsi plus de 50% de la masse du tissu de granulation au sein des jeunes cicatrices ce qui lui confère un aspect rougeâtre et granuleux d'où son nom.

1.5 Réapparition de la jonction dermo-épidermique

La reconstruction de la membrane basale débute 7 à 9 jours après le début de la ré-épithélialisation. Elle se caractérise par une réapparition progressive et centripète (des berges au centre de la plaie) des protéines spécifiques de la jonction dermo-épidermique dépendante de la migration de kératinocytes. Elle est régulée par l'environnement moléculaire des différentes populations cellulaires. Cette réapparition, en particulier celle du collagène de type IV, permet d'inhiber l'infiltration

des kératinocytes dans le derme ainsi que leur production de MMPs. La lame basale mature permet de fixer l'épiderme au derme sous-jacent pendant que la fibrine et la fibronectine disparaissent progressivement.

1.6 La phase de remodelage

La phase de remodelage ou dite de maturation débute 2 à 3 semaines après la lésion et peut durer de quelques mois a plusieurs années. Elle se caractérise par un remaniement de la matrice extracellulaire, une disparition de certains types cellulaires dont les myofibroblastes et une régression du réseau vasculaire (Figure 15).

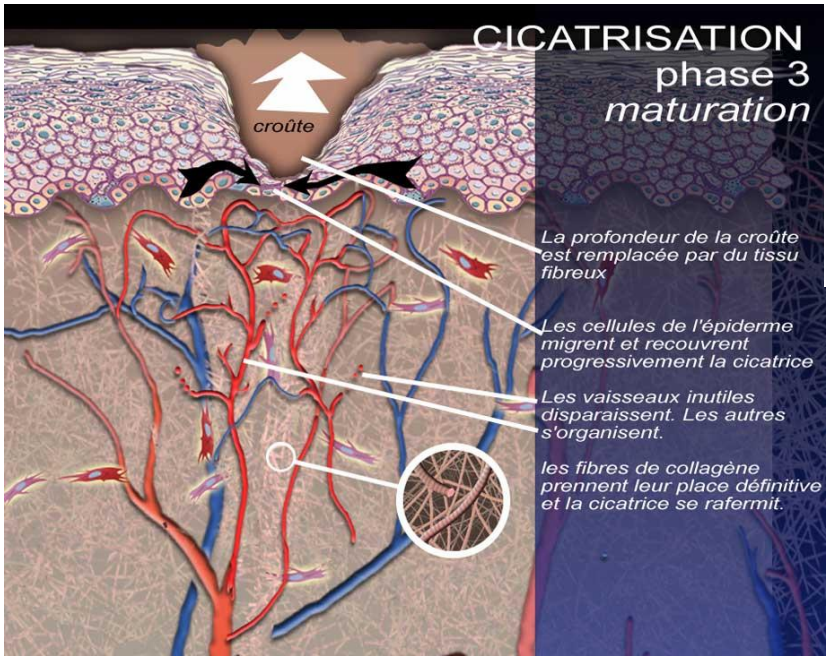


Figure 15. La phase de maturation (Source: Adapté du site http://dermato-info.fr/article/Un_organe_multifonction).

Le remaniement de la MEC consiste essentiellement au remplacement progressif du collagène de type III par le collagène de type I, plus résistant. Le diamètre des fibres de collagène, qui sont de plus en plus réticulées, devient plus important (Singer AJ and Clark RA, 1999). Ce processus mêlant synthèse et dégradation des collagènes est possible grâce à un équilibre fin entre l'action des MMPs et de leurs inhibiteurs, les TIMPs. Au final, ces modifications structurelles des collagènes vont leur permettre de supporter les forces de tension exercées par la peau.

Parallèlement au remodelage de la matrice extracellulaire, l'état inflammatoire diminue progressivement. Dans ce contexte, la production de chimiokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et l'IL-4 est assurée par les mastocytes et pourrait également être régulée par les autres cellules de l'infiltrat inflammatoire.

Au cours de cette phase**,** les fibroblastes, myofibroblastes et cellules vasculaires (cellules musculaires lisses, péricytes et cellules endothéliales) voient leur nombre et/ou leur activité réduite. Cette baisse de cellularité est classiquement expliquée par l'entrée en apoptose des cellules. Les mécanismes déclenchant l'entrée des cellules dans ce processus de mort programmée restent encore assez mal connus. Cependant, un certain nombre de données montrent qu'une mauvaise régulation de l'apoptose des myofibroblastes pourrait être à l'origine de certaines fibroses comme la cicatrisation hypertrophique et les chéloïdes (Moulin V et al, 2004; Larochelle S et al, 2004; Chodon T, 2000). Une perte provisoire de contact avec la matrice extracellulaire, le changement de composition de cette dernière ou encore la modification de l'environnement cytokinique pourraient expliquer l'apoptose des capillaires et des myofibroblastes. L'apoptose des capillaires, nombreux dans le tissu de granulation, va laisser place à une structure moins dense mais permettant une vascularisation efficace du tissu cutané.

1.7 Réapparition des glandes sudoripares et des bulbes pileux

La régénération des bulbes pileux est dépendante de la profondeur de la lésion. Ainsi, si la blessure est plus profonde que la racine du poil, la peau reconstruite lors du processus de cicatrisation sera dépourvue de poil. Il en va de même pour les glandes sudoripares.

En règle générale, la nouvelle peau ne régénère pas ses annexes non pas parce qu'elle est incapable de répondre aux signaux induits par des molécules telles que le FGF ou l'EGF, mais parce qu'elle ne reçoit pas les informations du derme profond.

2. La cicatrisation des plaies épidermiques

Une plaie épidermique est très superficielle. L'exemple le plus représentatif des lésions épidermiques est l'usure de la surface épidermique ou abrasion, comme des écorchures du genou ou du coude ou encore la brûlure du 1er ou du 2ème degré.

Le processus de cicatrisation n'est alors limité qu'à une reconstruction de l'épiderme ou ré-épithélialisation que nous avons très largement décrit précédemment. Brièvement, au moment de la plaie, les kératinocytes lésés libèrent de l'EGF qui va initier la prolifération et la migration des kératinocytes de la couche basale. La migration des cellules s'arrête alors par un mécanisme cellulaire, l'inhibition de contact. Ainsi, quand tous ses côtés sont en contact avec d'autres cellules épidermiques, le kératinocyte cesse de migrer. La migration se poursuit jusqu'à ce que la plaie soit complètement cicatrisée. Par la suite, les kératinocytes se divisent et forment de nouvelles couches jusqu'à reconstituer un nouvel épiderme.

Les différentes étapes de la cicatrisation se déroulent dans les 24 à 48H suivant le traumatisme.

Chapitre II: Le système neuro-cutané

A. Structure de l'innervation cutanée

La peau est innervée par une partie du système nerveux périphérique nommé classiquement système nerveux cutané. Il est composé d'une voie efférente (système nerveux autonome) et d'une voie afférente, sensitive (système nerveux sensoriel somatique), ces deux voies innervant les trois compartiments de la peau, l'hypoderme, le derme et l'épiderme (Reznik M, 1996) (Figure 16).

La peau est le support des sensations cutanées. Dans son sens le plus large, une sensation désigne un état de conscience des stimuli internes et /ou externes. Si le stimulus est assez intense, il va être converti en influx électrique ou potentiel d'action qui se propage le long des fibres nerveuses afférentes jusqu'au système nerveux central. C'est à ce niveau que la perception sensorielle est identifiée, interprétée et localisée. Au niveau cutané, plusieurs modalités sensorielles peuvent être identifiées : les sensations thermiques, les sensations tactiles (pression, toucher, vibration), la douleur et le prurit. Ces sensations naissent au sein de récepteurs plus ou moins complexes et distribués de façon inégale le long du corps. Cette inégalité conduit à des zones plus sensibles que d'autres comme la paume des mains ou l'extrémité des doigts (Kelly EJ and Terenghi G, 2005). A cette fonction afférente de transmission d'informations sur l'environnement extérieur, s'ajoute une fonction efférente des nerfs cutanés par le contrôle des fonctions eccrines, du flux sanguin et de l'érection pilaire.

1. Le système nerveux autonome

1.1 Structure

Le système nerveux autonome est divisé en 2 parties :

- le système nerveux sympathique (ou orthosympathique) et
- le système nerveux parasympathique.

Dans la peau, les fibres nerveuses du système autonome représentent une minorité des fibres nerveuses présentent dans la peau et dérivent majoritairement des neurones sympathiques et rarement des neurones parasympathiques. Il s'agit

d’efférences non myélinisées provenant des chaines para-vertébrales. Elles sont localisées dans le derme et l’hypoderme où elles innervent les vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que les annexes cutanées comme les muscles arrecteurs des poils, les glandes apocrines, les glandes eccrines et les follicules pileux.

Deux types de fibres nerveuses autonomes peuvent être distingués par histochimie: les fibres adrénergiques qui synthétisent et stockent des cathécholamines et de la noradrénaline, et les fibres cholinergiques contenant de l’acétylcholine généralement co-localisée avec certains neuropeptides tels que le « Vasoactice Intestinal Peptide » (VIP) et le « Peptide Histidine Methionine » (PHM).

1.2 Fonction

Le système nerveux autonome joue un rôle important dans la thermorégulation de la peau de part son action sur la régulation de la fonction sécrétrice des glandes sudoripares, la vasomotricité, et le flux sanguin. Cependant, même si la majorité des nerfs innervant les glandes sébacées, et les vaisseaux sanguins contiennent de l’acétylcholine, le régulateur majeur de la sudation, un nombre significatif de ces fibres nerveuses expriment également des protéines nécessaires à la fonction adrénergique (tyrosine hydroxylase, norépinephrine, dopamine beta-hydroxylase) et de nombreux neuropeptides comme le VIP, le PHM, le neuropeptide Y (NPY), la galanine, ou le « Calcitonin Gene-Related Peptide » (CGRP). Ces molécules, de part leur faible efficacité d’action directe sur la production de sueur, agissent probablement en synergie avec l’acétylcholine en amplifiant l’accumulation induite par celle-ci d’ « adenosine 3’-5’ cyclic monophasphate » (cAMP), second messager important dans la production de sueur.

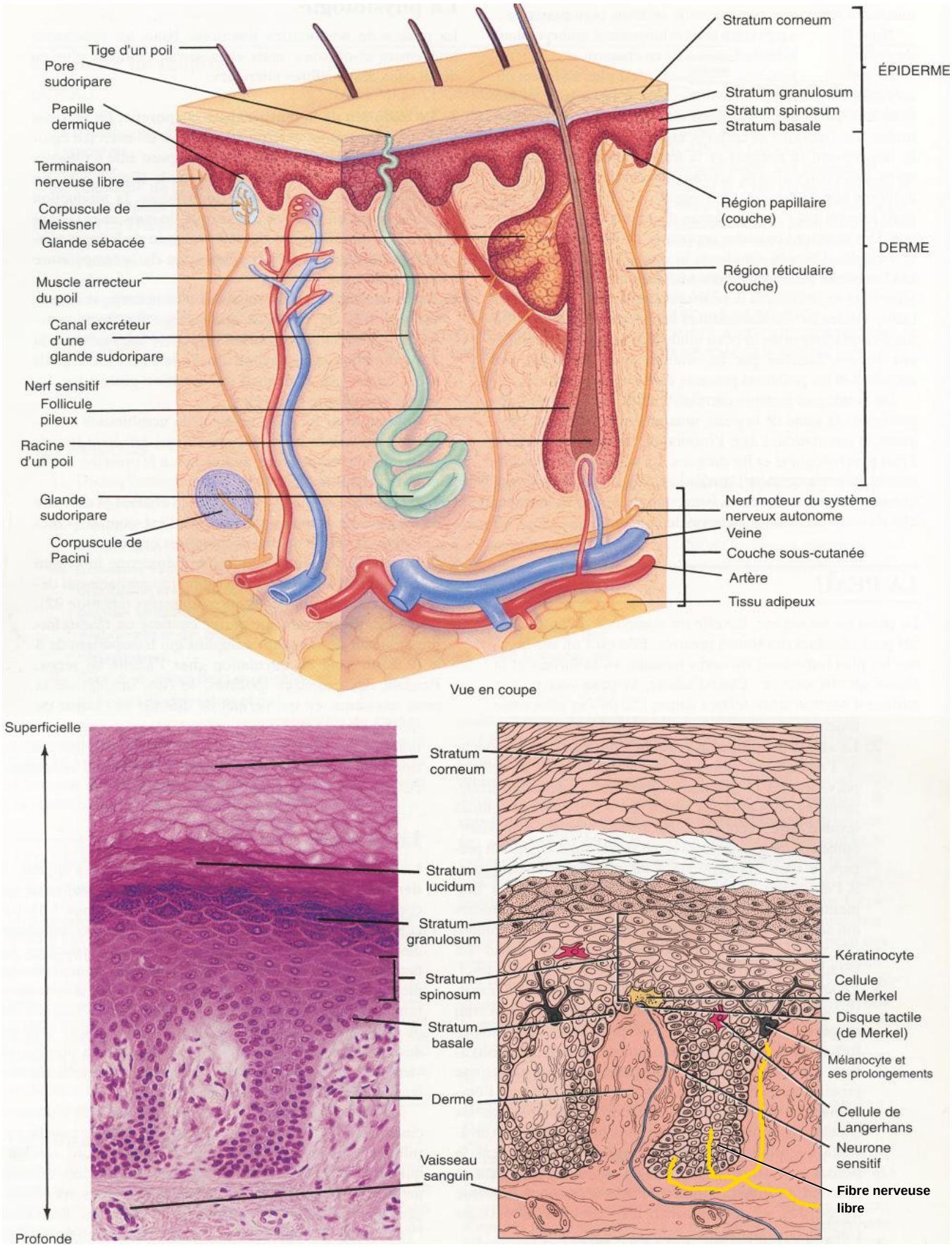


Figure 16: Histologie de l'innervation cutanée (DeBoeck, Principe d'anatomie et de physiologie, 2eme édition française).

2. Le système nerveux sensoriel

2.1 Structure et fonction

L'innervation sensorielle est composée de fibres issues des ganglions rachidiens dorsaux (GRDs) qui s'organisent en structures plus ou moins complexes : elles peuvent être dilatées, corpusculaires ou libres. L'ensemble de ces fibres nerveuses assurent les fonctions de sensibilité thermo-algique, épicritique fine et proprioceptive.

✓ Les terminaisons dilatées sont représentées par des terminaisons lancéolées et les corpuscules de Merkel. Constituées de fibres sensitives myélinisées de type Aβ, elles participent aux sensations du toucher et de vibration. Elles sont localisées dans la couche basale épidermique au contact avec les cellules de Merkel.

✓ Les terminaisons corpusculaires forment des corpuscules spécialisés dits de Meisner, de Ruffini et de Pacini. Ils sont constitués de fibres myélinisées de type Aβ et sont localisés dans le derme. Les corpuscules de Meissner sont particulièrement impliqués dans les sensations vibratoires et sont localisés dans le derme papillaire. Les corpuscules de Ruffini participent en plus à la sensation de pression et sont présents dans le derme réticulaire. Enfin, les corpuscules de Pacini, situés dans le derme profond et l'hypoderme, transmettent les sensations de pression et de vibration.

Terminaisons corpusculaires et dilatées forment le groupe des mécanorécepteurs.

✓ Les terminaisons nerveuses libres se distribuent dans le derme, l'épiderme et les gaines épithéliales des annexes cutanées. A l'approche de l'épiderme, peu avant la jonction dermo-épidermique, elles forment un plexus pour s'organiser en terminaisons libres qui vont pour certaines traverser l'ensemble des couches vivantes de l'épiderme (Figure 17). Elles peuvent être des fibres myélinisées de type Aδ ou des fibres amyéliniques de type C. Ces fibres sont le support des sensations telles que la thermoception, la nociception et la

pruritoception. En plus de ces sensations, elles peuvent transduire des stimuli mécaniques qui sont souvent associés à une pression douloureuse.

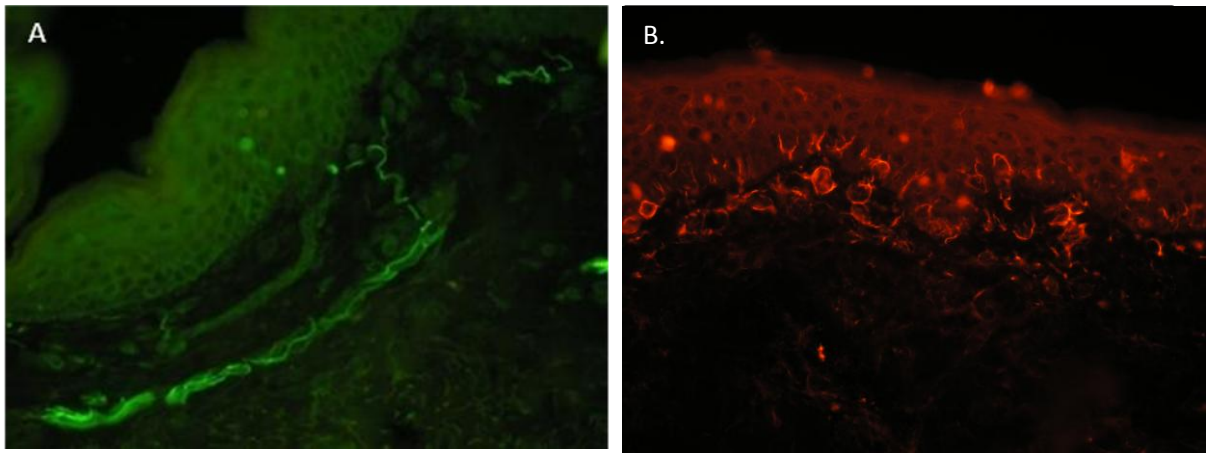


Figure 17: Photographies de coupes de peaux. L'innervation (vert) dermique (A) et épidermique (B) est décelée en immuno-histofluorescence à l'aide d'anticorps dirigés contre les neurofilaments (NF) et la protéine « protein gene product » 9.5 ou PGP9.5 respectivement (photo A issue de Lebonvallet N *et al*, 2012, photo B donnée personnelle).

2.2 Distribution anatomiques des terminaisons nerveuses libres.

Bien que les terminaisons nerveuses libres soient présentes sur toute la surface du corps, elles ne sont pas réparties de manière homogène au sein de l'épiderme et leur densité varie en fonction des parties du corps. Leur nombre diminue depuis le tronc vers la partie distale des membres, le dos étant innervé de manière beaucoup plus dense que le bout des doigts. Cette répartition hétérogène serait à l'origine d'une différence de sensibilité aux stimuli thermiques et douloureux. Ainsi, les parties du corps glabres (paume des mains, plante des pieds) ont un seuil de douleur à la chaleur plus élevé que les zones pileuses (abdomen, dos des mains, dessus des pieds…) (Saterö P et al, 2000). En revanche, les seuils de douleur au froid semblent identiques entre peau glabre et peau pileuse mais les sensations de picotements sont plus souvent rapportées au niveau des zones pileuses (Davis KD, 1998). En ce qui concerne les terminaisons nerveuses connectées aux cellules de Merkel ainsi que les corpuscules spécialisés dans la mécanoréception, ils sont plus

nombreux dans les zones glabres que les zones pileuses, rendant ces zones beaucoup plus sensibles aux stimuli mécaniques (Crivellato E et al, 1994 ; Nolano M et al, 2003).

Cependant, outre la différence de répartition, de densité et de propriétés des terminaisons nerveuses libres qui innervent les zones glabre et pileuse, la différence d'épaisseur entre ces deux types de peau, influençant donc directement la profondeur de localisation des récepteurs, n'est pas à exclure pour expliquer cette différence de sensibilité.

Enfin, au sein même de l'épiderme, il semble que des fibres de nature différentes innervent les différentes couches de l'épiderme. Zylka et al ont ainsi montré que les fibres peptidergiques (CGRP+) innervaient la couche basale et se terminaient dans la couche épineuse, alors que les fibres non-peptidergiques (CGRP-) se terminaient dans la couche granulaire (Zylka MJ et al, 2005). Ce résultat, associé à l'expression de récepteurs différents par les kératinocytes en fonction des couches épidermiques, suggère un traitement de l'information cutanée différent en fonction de couches épidermiques.

B. Interactions neuro-cutanées

Des contacts étroits entre fibres nerveuses, cellules cutanées et cellules des systèmes endocrinien, lymphatique et immunitaire ont été observés. Ces observations ont conduit à la définition d'un système neuro-immuno-endocrino-cutané ou « Neuro-Immuno-Endocrino-Cutaneous system » (NIECS) (Brazzini B et al, 2003 ; Misery L, 1997). Les grandes fonctions de la peau (fonction sensorielle, thermorégulation, renouvellement de la peau, fonction de barrière…) sont sous le contrôle de ce système. Pour fonctionner ce système nécessite le partage d'un langage commun constitué de molécules de différentes natures (neuromédiateurs, cytokines, facteurs de croissance) synthétisées et libérées par les cellules de ce système et de leurs récepteurs spécifiques présents sur les cellules (Figure 18) (Boulais N and Misery L, 2007).

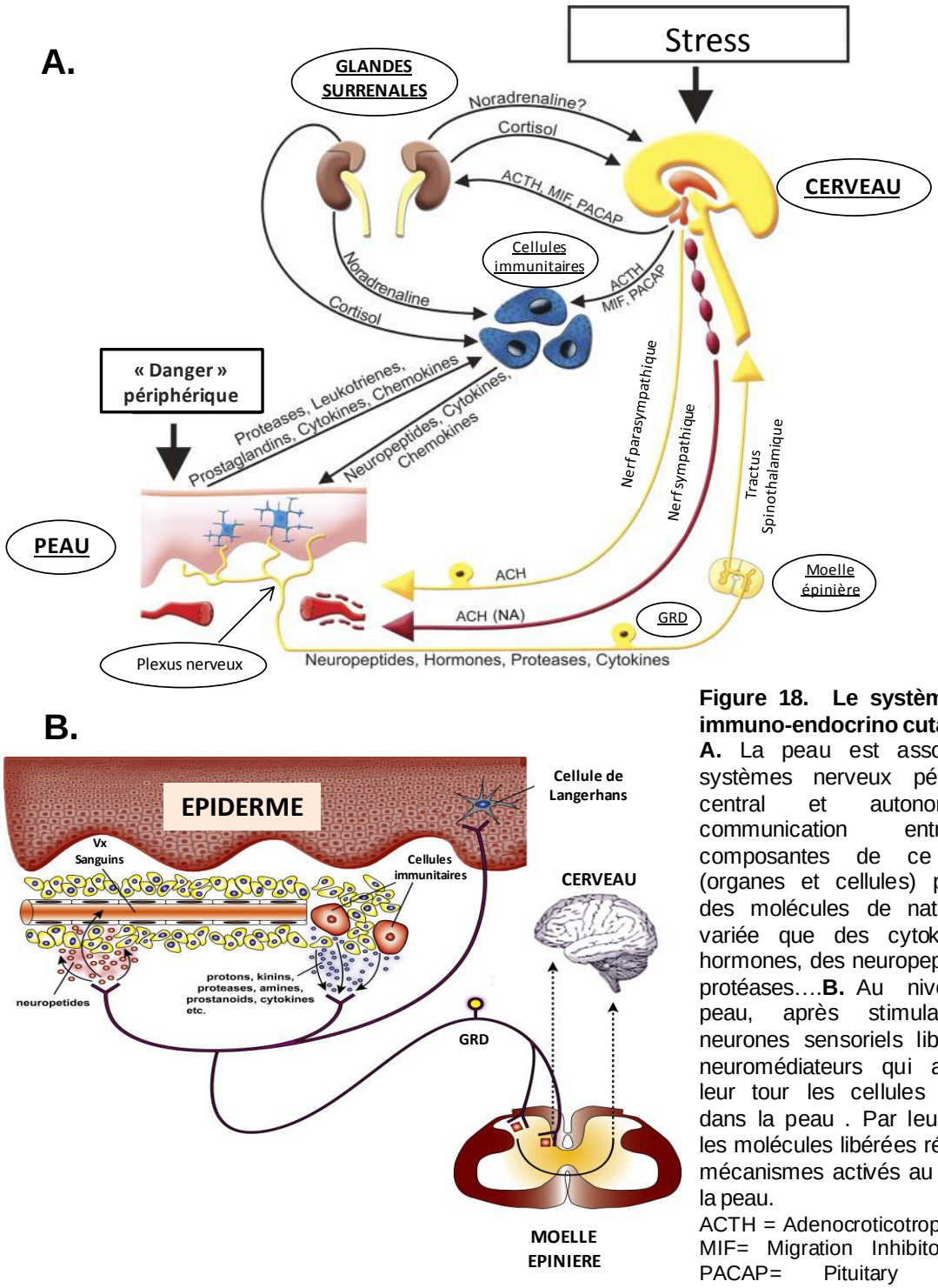


Figure 18. Le système neuro-immuno-endocrino cutané.
A. La peau est associée aux systèmes nerveux périphérique, central et autonome. La communication entre les composantes de ce système (organes et cellules) passe par des molécules de nature aussi variée que des cytokines, des hormones, des neuropeptides, des protéases….**B.** Au niveau de la peau, après stimulation, les neurones sensoriels libèrent des neuromédiateurs qui activent à leur tour les cellules présentes dans la peau . Par leur fonction, les molécules libérées régulent les mécanismes activés au niveau de la peau.
ACTH = Adenocroticotropic hormon; MIF= Migration Inhibitory Factor; PACAP= Pituitary Adenylase Cyclase Activating Polypeptide; GRD= Ganglion Rachidien Dorsal
(adapté d'après Roosterman et al., *Physiol Rev* 2006)

Ainsi, les fibres nerveuses synthétisent et libèrent au sein de la peau des neuromédiateurs (substance P, neurokinines A et B, CGRP, VIP, somatostatine, « Gastrin-Releasing Peptide » (GRP), neuropeptide Y, PHM, neurotensine, bradykinine, acétylcholine, catécholamines, endorphines, enképhalines), des neurohormones (prolactine, mélanotropine ou « Melanocyte Stimulating Hormone » (MSH), corticotropine ou « AdrenoCorticocoTropic Hormone » (ACTH)) et des neurotrophines (« Nerve Growth Factor » (NGF), Neurotrophine 3 et 4 (NT-3, NT-4), « Brain Derived Neurotrophic factor » (BDNF)) qui joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie de la peau et dans l'organisation et le renouvellement de l'épiderme (Roosterman D *et al*, 2006 ; McCarthy *et al*, 1995 ; Hsieh ST *et al*, 1997).

De même, les cellules dermiques et épidermiques produisent des neurotrophines, facteurs de croissance neuronale, qui influencent l'innervation cutanée comme la repousse nerveuse, la densité de l'innervation, son maintien, la survie des neurones ou encore la formation de l'arbre dendritique. Ainsi, le NGF a un rôle majeur dans la croissance et l'arborisation des terminaisons nerveuses sensorielles, alors que le NT-3 joue un rôle dans la formation de ces terminaisons (Montano JA et al, 2010).

Enfin, les cellules immunitaires présentes constitutivement dans la peau ou infiltrant celle-ci en cas d'inflammation, peuvent s'activer sous l'action de ces neuromédiateurs. La libération induite des cytokines mais également de neuromédiateurs participe aux boucles d'amplification de processus engagés comme l'inflammation ou au maintien de l'homéostasie.

Le maintien de l'équilibre entre ces différents systèmes reste cependant fragile et un dérèglement de l'un de ces systèmes entraine des perturbations conséquentes responsables de nombreuses, si ce n'est la plupart, maladies cutanées (Botchkarev VA et al, 2006 ; Roosterman D et al, 2006 ; Slominski NA et al, 2005 ; Arck PC et al, 2006).

C. Le système nerveux cutané et la cicatrisation (Article 1)

Comme nous venons de le voir, en plus de leur fonction sensorielle, les fibres nerveuses sensorielles participent activement à l'homéostasie de la peau et plus particulièrement à celle de l'épiderme.

Il a ainsi été montré par des expériences *in vivo* de ligature de nerfs sciatiques de rat ou de souris que l'absence de nerf influait directement sur l'intégrité du tissu cutané et notamment sur l'épaisseur de l'épiderme (Hsieh ST et al, 1996 ; Huang IT et al, 1999 ; Li Y et al, 1997 ; Hsieh ST et al, 1997 ; Chen WP et al, 1999). Chez l'homme certaines dermatoses telles que le psoriasis ou la dermatite atopique ont pu mettre en évidence le rôle des nerfs sur la structure de la peau (Tominaga M et al, 2009 ; El-Nour H et al, 2009). En effet, une innervation dense a tendance à provoquer une augmentation de la prolifération de kératinocytes de la couche basale de l'épiderme, accompagnée d'une augmentation de l'épaisseur de celui-ci (Huang IT et al, 1999). A l'inverse, les personnes atteintes de neuropathies périphériques principalement liées au diabète (Dyck PJ et al, 1992), mais pouvant être la conséquence d'une infection au VIH (McCarthy BG et al, 1995) ou à la suite d'un cancer (Wen GY et al, 1994) présentent des caractéristiques de peau différentes de la population générale, associées à des problèmes de cicatrisation. Chez ces patients, la cicatrisation est très longue. Le cas le plus classique est celui du pied diabétique.

Les mécanismes exacts et les facteurs impliqués dans ce ralentissement de la cicatrisation ne sont pas encore totalement connus. Ceci est principalement dû aux difficultés d'investigations puisque ces études nécessitent de travailler sur des modèles 3D, car les études sur les animaux ou l'homme posent des problèmes au moins éthiques (Lebonvallet N et al, 2010).

Cependant, le rôle du système nerveux périphérique et des neuromédiateurs dans le processus de cicatrisation cutanée a fait l'objet de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus sur le rôle des différents neuropeptides, neurotrophines et neurohormones favorisant ou non les différents mécanismes de la cicatrisation cutanée ont été repris dans un article de revue accepté dans **Wound Repair and Regeneration (WRR-12-12-0385)**.

Role of neuropeptides, neurotrophins and neurohormones in skin wound healing

Jérémy Chéret, MA[1]; Nicolas Lebonvallet, PhD[1]; Laurent Misery, MD, PhD[1,2]; Christelle Le Gall-Ianotto, PhD[1, 2]

[1] Laboratory of Neurosciences of Brest (EA4685), University of Western Brittany, Brest, France

[2] Department of Dermatology, University Hospital, Brest, France

Short running title: The neuro-cutaneous network in healing

Key words: skin wound healing, neuropeptides, neurohormones, neurotrophins

Correspondence and reprint requests: Pr. Laurent Misery, Department of Dermatology, University Hospital of Brest, 5 avenue Foch, F-29200 Brest (tel: +33 298 22 33 15; fax: +33 298 22 33 82; e-mail: laurent.misery@chu-brest.fr)

Abstract

Due to the close interactions between the skin and peripheral nervous system, there is increasing evidence that the cutaneous innervation is an important modulator of the normal wound healing process. The communication between sensory neurons and skin cells involves a variety of molecules (neuropeptides, neurohormones, and neurotrophins) and their specific receptors expressed by both neuronal and non neuronal skin cells. It is well established that neurotransmitters and nerve growth factors released in skin have immunoregulatory roles and can exert mitogenic actions; they could also influence the functions of the different skin cell types during the wound healing process.

Introduction

Cutaneous wound healing is a generic term that defines a range of mechanisms (coagulation, inflammation, re-epithelialisation, neovascularisation, matrix component synthesis and remodeling) that operate in an orderly and timely manner to restore the skin's integrity and function. Briefly, cutaneous wound healing can be divided into 4 time-dependent phases: 1) haemostasis, 2) inflammation, 3) proliferation, and 4) remodeling. The second phase during which inflammatory and repair cells are recruited, is the most metabolically active phase. Tissue integrity is restored during the fourth phase. All the cellular and biochemical events observed during these phases are under the control of mediators that orchestrate cell-cell and cell-matrix interactions during cutaneous wound healing.

The skin has constant interactions with the nervous, immune and endocrine systems (1-4). These 4 components form the "neuro-endocrino-immuno-cutaneous system» or NEICS (5-6). The actors in this system are closely linked anatomically and physiologically, which for their common function in the maintenance of skin homeostasis and in the response to various diseases. Thus, skin is densely innervated by sensory nerves and by post-ganglionic parasympathetic and sympathetic nerves derived from the dorsal root ganglia and trigeminal ganglia. This three-dimensional network of unmyelinated fine nerve fibres forms the subepidermal plexus from which some fibres cross the dermo-epidermal junction to innervate epidermal cells. Anatomical contacts between nerve endings and several types of cutaneous cells (Langerhans cells, Merkel cells, keratinocytes) as well as dermal cells (fibroblasts and dermal dendritic cells) (7, 8) have been previously described (9-13).

The communication among the different cell types of the NEICS is possible thanks to a variety of molecules (neuropeptides, neurohormones and neurotrophins) and their specific receptors which are expressed by both neuronal and skin cells. These molecules are directly synthesised and released by nerves fibres or by skin cells (keratinocytes, melanocytes, Merkel cells, Langerhans cells and fibroblasts) and immune cells (granulocytes, lymphocytes, monocytes-macrophages and masts cells). Nonetheless, the presence of neurosecretory granules has only been described in nerve endings and Merkel cells.

The mechanisms by which neuropeptides, neurohormons and neurotrophins participate in cutaneous wound healing remain poorly understood and published

studies have reported conflicting results. Furthermore, that fact that impaired or delayed wound healing is classically observed in patients with diabetic, ethylic, congenital, or other neuropathies suggest that the role of nerve endings is crucial in skin wound healing (14).

This review aims to discuss the role(s) of the neuropeptides, neurohormones and neurotrophins of the NEICS in the skin wound healing process.

Neuropeptides

Tachykinins

"Tachykinins" are named as such because they act in opposition to "bradykinins"; these peptides induce a rapid contraction of the smooth muscle fibres (15). In mammals, several peptides have been described: substance P (SP), neurokinin A (NKA) also known as substance K, neurokinin B (NKB), hemokinin and neuropeptides K and Y (NPK and NPY respectively).

These peptides are encoded by three different genes (PPT-I or TAC-1 for the SP, NKA, NPK and NPY; PPT-II or TAC-3 for NKB and PPT-III or TAC-4 for hemokinin) but share the same carboxy terminal sequence: Phe-X-Gly-Leu-Met-NH2, where X could be an aliphatic (isoleucine or valine) or aromatic (phenylalanine, tryptophan or tyrosine) amino acid (16).

While there are many studies concerning the effect of SP, NKA and NPY in the skin, there is no or very few data describing the biological roles of NKB and hemokinin.

Substance P (SP)

SP is an undecapeptide that signal through the neurokinin receptor family with a higher affinity for the NK-1R (17). SP is released from unmyelinated C-fibres in the skin where it contributes to the neurogenic inflammatory process (18). The expression of its receptor has been detected on human keratinocytes, endothelial cells and fibroblasts (19, 20).

After injury, nerve fibres containing SP are absent from the epidermis and extracellular matrix and are localized in the upper granulation tissue near cutaneous blood vessels and sweat glands in human skin and burn wounds (21, 22).

It has been proposed in several mammal models of skin wound healing that this process can be accelerated by exogenous administration of sensory peptides, such as SP, or by stimulating the release of SP at the site of injury (23-26). Rook *et al* have also shown that the delay of cutaneous wound closure induced by morphine was due to the inhibition of SP release peripherally into the wound; this inhibition was associated with a decreased expression of NKR in inflammatory and parenchymal cells involved in this process (27, 28).

Then, SP stimulates neurite outgrowth (24, 29); it also induces vascular permeability, local vasodilatation, plasma extravasation and angiogenesis (30-35). Additionally, in some *in vivo* models and many *in vitro* models, SP was shown to stimulate endothelial cell differentiation, proliferation and tube formation *via* a neurokinin receptor mechanism (33, 36-38). Furthermore, SP induces endothelial cells production of cytokines and neurotrophins such as NGF which promotes keratinocyte proliferation (39, 40). SP is capable of stimulating the proliferation of human and murine cultured keratinocytes (41-43).

In addition to its pro-angiogenic ability, SP plays a crucial role in the granulation tissue remodeling process by promoting the proliferation and the migration of dermal fibroblasts (33, 44, 45) by stimulating the expression of the epidermal growth factor/ epidermal growth factor receptor (EGF/EGFR) system (46).

Another interesting property of SP is its capacity to modulate the synthesis and release of pro-inflammatory cytokines by the different cell types present in the skin. Additionally, SP is known as the key mediator of cutaneous neurogenic inflammation (47). Thus, SP has been shown to upregulate the synthesis and the release of IL-1, IL-6 and TGF-α by keratinocytes (48); to stimulate mast cells degranulation and release of the pro-inflammatory cytokine as TNF-α; and to enhance the release of the neutrophil chemoattractive cytokine, IL-8 by endothelial cells (40) and IL-1-β, TNF-α, IL-2 and IL-6 by subpopulations of leukocytes (49). Interestingly, many of the effects of SP described previously (plasma extravasation, cytokines production) are dependent on the nitric oxide (NO) pathway, a molecule shown to play a crucial role for adequate wound healing and repair (50). Several authors have shown that SP enhanced skin wound healing by upregulating NO production, at the site of injury (51, 52).

The role of SP in impaired wound healing such as in the diabetic population has been the subject of numerous studies. Wound healing in diabetic mammal tissues is

characterised by decreased nerve numbers and elevated neutral endopeptidase (NEP) activity, an enzyme expressed in human skin known to degrade SP (26, 53-56). These data demonstrate that there are diminished levels of proinflammatory neuropeptides such as SP, in impaired wound healing (57, 58). The crucial role of SP in the diabetic wound healing process has been assessed through diabetic murine excisional wound models. In this model, the time of wound healing was longer in diabetic murine skin than in non-diabetic mice (58-60), and topical administration of SP or NEP inhibition improved the wound repair kinetics by increasing the density of inflammatory cells in injured skin areas (25, 26, 58, 59).

However, some reports did not find an obvious involvement of the SP/NK1R system in the wound healing process. Thus, in anNK1R knock-out mouse model, Cao *et al* observed that the deletion of the functional form of this receptor had little effect on skin wound healing (61). Their results are supported by Wallengren *et al* who showed that capsaicin pre-treatment had no effect on the healing of a wound in a rat model (62), and Cavallini *et al* who demonstrated that the decreased levels of SP in the burned skin obtained after flushing with diphoterine were associated with better wound healing (63). These surprising results do not call into question the role of SP and/or the NK-1R in this process but instead suggest that their mechanisms of action are more nuanced. Cao *et al* does not exclude that compensatory mechanisms may have come into play in the KO mouse. NK-1R is not the only binding receptor of SP; binding by NK-2R is also possible. Additionally, Wallengren *et al* knocked out most, but not all, of the cutaneous sensory innervations and explained that the remaining C-fibres (30% of the original amount) seemed sufficient to ensure a normal skin wound healing.

In conclusion, the above described studies tend to support the hypothesis that interactions between skin cells and the nervous system promote the skin wound healing. However, the levels of SP released into the injury site must be regulated to avoid an abnormal skin wound healing process as observed in hypertrophic human scars (64).

Neurokinins A (NKA) and B (NKB)

NKA is a 10 amino-acid peptide; its biological activities are closely related to those of SP. It has been shown to stimulate DNA synthesis in cultured human keratinocytes and fibroblasts (33, 34, 42) where it might act as a mitogen by stimulating the

proliferation of connective tissue cells which are crucial during wound healing. Therefore, NKA and SP might be important mediators of the regeneration of cutaneous nerves during wound healing. NKA (as was SP) was effective in stimulating NGF mRNA expression in human and mouse keratinocytes in an *in vitro* model and in inducing the release of NGF in the epidermis in an *in vivo* murine model (65). The key role of NKA in wound healing has been confirmed by other studies. For example, in 2007, Rook *et al* demonstrated that the topical application of morphine in a rat model of cutaneous wound healing induced a delay in the wound closure *via* the blockade of peripheral tachykinin release (i.e SP and NKA). This delay was totally abolished when the rats received morphine combined with SP or NKA (27). The authors proposed that NKA could have a clinical application in wound therapy; this protein could be combined with morphine to provide local analgesia and maintain normal closure rates.

Neuropeptide Y (NPY)

NPY is a 36 amino-acid peptide widely distributed in the CNS and PNS in the vicinity of the arteries where it can exert its vasoconstrictor effects (66). In the skin, the expression of NPY was detected in parasympathetic/sympathetic nerve fibres in the deeper layers as well as the superficial dermal plexus, where it was often near sweat glands and blood vessels (67-69).

Several studies in both in rats and humans have confirmed the role of NPY in skin wound healing. In an *in vivo* model of wounds in rats, Sterne *et al* showed that the immunoreactivity for NPY was not detectable in normal injured DRG but was significantly upregulated following injury (70). This result confirmed data published by other studies showing that NPY is found in a subpopulation of large and intermediate neurons following axotomy, unlike other neuropeptides, such as SP, CGRP and VIP (71-76).

In humans, Altun et al showed in 22 patients that the number of nerve fibres gradually increased in both the dermis and the epidermis 7 months after wound closure but that the levels of expression present in matched unburned skin of the same patient were not reached. For the authors, the significantly higher number of nerve fibres in normotrophic scars compared with hypertrophic scars suggests a regulatory role for the skin nerve system in the outcome of burn wound healing (29). This is in agreement with a study by Onuoha GN and Alpar; this study showed that

from a total of 26 patients in samples from 13 patients with thermal injury, the plasma levels of SP, CGRP and NPY after 24 h were higher than in the control samples. However, these increases were not significant (77). In contrast, Crowe *et al* did not observe neuropeptides in the nerves of post-burn normotrophic scars (64). Thus, their results showed that the density of nerves containing NPY, VIP, SP and CGRP was greater in hypertrophic scars than in normal skin. This discrepancy might be due to the detection technique: an immunofluorescent technique was used which might have complicated the detection and quantification of nerve fibres in the dermis.

It is well established that the wound healing process is impaired in type I and type II diabetic patients (57) and some studies have reported a close correlation between the expression of neuropeptides such as SP and NPY and impaired wound healing in diabetic patients. As SP and NPY levels have been shown to be reduced in patients with type I diabetes and in animal models of diabetes (78, 79). Furthermore, Pradhan *et al* clearly showed in a rabbit model that NPY expression was not different at the baseline between non-diabetic and diabetic rabbits but was reduced post-injury in diabetic wounds compared with non-diabetic wounds (57). Even if the mechanisms are unclear diabetes seems to cause a dysregulation in the expression of both SP and NPY.

The most interesting aspect of NPY expression in skin wound healing is its pro-angiogenic capacity. NPY has been reported to directly stimulate endothelial cells and migration in *in vitro* studies suggesting that NPY may act as an angiogenic factor (80, 81). The intra-arterial infusion of this neuropeptide in anesthetised rats induced a dose-dependent neurogenic cutaneous vasodilatation as indicated by an increase in the mean arterial blood pressure (82). An *in vivo* study of NPY receptor KO mice provided compelling evidence that NPY is a potent angiogenic factor and that the skin wound repair was significantly delayed (83). However, this angiogenic capacity was not found in all studies. For example, Jain M *et al* showed that NPY promoted neither proliferation nor tube formation of dermal microvascular endothelial cells (DMVEC) under both normal and hyperglycemic conditions (36). This study contrasted with other studies that had shown that NPY promoted migration, proliferation and tube formation of endothelial cells (84). The authors attributed this difference to the use of different types of endothelial cells; this study used cells that were dermal in origin while the others studies used cells from the human umbilical vein.

Calcitonin gene related-peptide (CGRP)

CGRP is a 37-amino-acid peptide belonging to the calcitonin family of peptides. Its biological effects are mediated by a heterodimeric receptor composed of the calcitonin receptor like-receptor (a G protein-coupled receptor) and the receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), which is also expressed by inflammatory cells (such as monocytes-macrophages and mast cells), endothelial cells and epidermal cells (such as keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells) (85-89).

In the skin, CGRP is one of the most abundant and prominent neuropeptides and is often co-localised with either SP or somatostatin (SOM) in unmyelinated subepidermal and epidermal sensory fibres (90). Furthermore, these fibres are in close interactions with the different skin cell types (melanocytes, keratinocytes, Merkel cells, Langerhans cells, dermal masts cells) (11, 89, 91, 92), and CGRP release after sensory stimulation can modulate many biological functions of the epidermis and dermis as well as vasodilatation and plasma extravasation. Recently, CGRP expression was described in human keratinocytes (88).

The beneficial effects of CGRP on skin wound healing have been reported in several *in vitro* and *in vivo* models. These studies observed that the exogenous administration of CGRP regardless of the application (intradermally or intraperitoneally) accelerated healing whereas the lack of CGRP or the administration of CGRP antagonist resulted in delayed wound closure (23, 28, 93, 94). CGRP promotes wound healing by increasing the rate of contraction in rat models and promoting keratinocyte proliferation, but it seems that this trophic effect of CGRP on wound healing is dependent on the integrity of the neural supply which is involved in the axonal transfer of the neuropeptide (94). Wallengren *et al* have also shown that the presence of 30% of the original level of C-fibre innervations seems to be enough to ensure a normal wound healing (62). Hence, CGRP stimulates the proliferation and migration of human keratinocytes both *in vitro* and *in vivo* (95-97).

Interestingly, CGRP was found to induce the expression and secretion of the mature and immature forms of NGF (proNGF/NGF) from cultured human keratinocytes. As NGF is a neurotrophin highly expressed by proliferative keratinocytes and as its immature form is an active participant in the initiation of apoptosis, this implies that, through the regulation of the ratio between the two forms, CGRP could determine the balance between survival and cell death during the wound healing process (98).

Furthermore, CGRP exerts potent proliferative effects on cultured fibroblasts suggesting that this neuropeptide may influence the proliferation of connective tissue cells but this effect seems to be dependent on the origin of the fibroblast (99,100).

One of the main effects of CGRP on skin wound healing is its capacity to stimulate angiogenesis *in vitro* and *in vivo* and to prolong vasodilatation *in vivo*. Thus, it can enhance human dermal endothelial cell proliferation both in terms of cell numbers and DNA synthesis (101-104). CGRP was shown to be an extremely powerful vasodilator, with a long lasting effect on small and large vessels of most species, including humans (105-108).

Furthermore, in addition to regulating vascular functions, CGRP can also influence immune responses (5, 11, 44, 109, 110). It is able to stimulate mast cells to secrete TNF-α and keratinocytes to secrete IL-1α, its expression can also result in an increase in the mRNA expression of the receptor of the neutrophil chemotactic factor, IL-8, the IL-8RA. This chemokine was shown to be secreted by dermal microvascular endothelial cells and dermal fibroblasts after CGRP stimulation (40, 98, 110, 111). The effects of CGRP on skin wound healing are often similar to those of SP, however, some differences have been observed. First, CGRP inhibits the production of pro-inflammatory cytokines and the presentation of antigens as well as the migration of T cells and macrophages. It prevents macrophage activation at sites of inflammation by inhibiting the proliferation of peripheral monocytes (44). Numerous data are available on the role of SP in impaired skin wound healing in the diabetic population; CGRP, however seems to have no positive or negative influence in this process (112).

Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and VIP-related peptides

VIP

VIP is a 28-amino-acid peptide belonging to the gastrin/secretin/glucagon family of secretory peptides (113). VIP has been detected in the central as well as in the peripheral nervous system (114).

In the skin, VIP-like immunoreactivity was found to be associated with nerve fibres contacting dermal arteries and capillaries, glands such as sweat, apocrine and meibominian glands, and hair follicles (115, 116). Although VIP reactivity was less abundant in the epidermal layer, binding sites for VIP have been identified on

keratinocytes and Merkel cells (117). Immune cells and mast cells can also produce VIP (47, 118).

The role of VIP in wound healing has never been clearly demonstrated in *in vivo* models of wound healing, but its implication has been strongly suspected due to its association with keratinocytes, immune cells, and the nervous system. Indeed, VIP and NH-2 VIP derivatives stimulate the proliferation as well as the migration of human keratinocytes via a cAMP-dependent pathway (101, 119- 121). However, Wollina *et al* highlighted the importance of the N-terminal part of the molecule for its action on keratinocytes by showing that the VIP-induced migration was dependent on the integrity of the N-terminus; the loss of the N-terminus abrogated the stimulation of the migration and delayed colonization (122). Additionally, VIP was shown to stimulate angiogenesis in *in vitro* and *in vivo* models (123, 124) and to enhance the production of VEGF by epidermal keratinocytes through the ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathway (120, 125). Furthermore, VIP similar to SP or CGRP, can stimulate the release of NGF or inflammatory cytokines (IL-1α, IL-8) in cultured human keratinocytes (47, 98). Concerning the induction of IL-6 release by VIP, studies have reported conflicting results which could be explained by the fact that biological effects depend on the cells or organs used in experiments (120, 126). VIP may also be involved in the reinnervation of wounded tissue, as VIP promoted sciatic nerve regeneration in rats after transaction (127), VIP immunoreactivity has also been demonstrated in nerve fibres close to structures from which epithelialisations initiated (hair follicles, sweat glands, basal cell layer of the epidermis) (128).

Interestingly, there is a disparate effect of VIP and SP in the modulation of the mechanisms involved in wound healing. For example, Pincelli *et al* observed that the VIP-induced stimulation of human keratinocytes growth could be blocked by SP (119). This difference in the modulatory activities of SP and VIP on human keratinocytes is enhanced by the fact that in the skin lesions of patients with AD, SP levels were decreased whereas VIP levels were increased (129). The fine regulation of this imbalance in expression between these two cutaneous neuropeptides might be a key mechanism in normal wound healing and its deregulation should be analysed in pathological wound healing.

Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP)

PACAP is a 27- or 38-amino-acid regulatory neuropeptide (PACAP27 or PACAP38) that is 68% homologous to VIP and acts through the same family of receptors: PACAP/VIP receptors (PAC1R/VPAC1R and VPAC2R) (130). In normal human skin, only PACAP38 immunoreactivity was demonstrated (131), VPAC1R was expressed on endothelial cells and keratinocytes while VPAC2R was expressed on epidermal cells mostly on keratinocytes of the basal layer and in glandular cells surrounded by VIP-immunoreactive nerve fibres (132). While the immunomodulatory effect of this peptide had been demonstrated in various tissues, its biological role in the skin was unknown (131).

Several studies have shown that PACAP could induce vasodilatation and plasma extravasation as well as increase the blood flow in rat and rabbit skin (133, 134). This last effect of PACAP was also found in human skin *in vivo* but to a lesser extent that of VIP and other effect such as flushing and hyperthermia were also described (135). PACAP could be an important mediator in the early phase of inflammation. Furthermore, PACAP38 mimicked VIP-induced keratinocyte proliferation (121). PACAP may act as an autocrine growth factor in contrast to VIP which may be a paracrine growth factor: PACAP38 mRNA was detected in the human keratinocytes while VIP mRNA was absent.

Interestingly, many studies have shown that PACAP was expressed in rat DRG and that this expression was dramatically upregulated after nerve transaction (136-138). Even if the functional significance of this increased expression *in vivo* in response to injury is still unknown, the close relationships between the sensory nervous system and skin led us to think that it may participate in nerve regeneration during wound healing in the skin. Furthermore, while its implication in cutaneous wound healing has not been clearly demonstrated yet, its cutaneous vasoregulation activity combined with its similarities to VIP in terms of function and receptors, suggest that PACAP38 may be regarded as an important contributor in wound healing.

Peptide Histidine Methionin/Peptide Histidine Isoleucine (PHM/PHI)

PHM/PHI is encoded by the same gene as VIP, uses the same receptors and co-exists with acetylcholine in post-ganglionic sympathetic neurons that are in close contact with the eccrine and apocrine glands as well as hair follicular cells in human

skin (69, 139-140). There are no data describing the role of this peptide in cutaneous wound healing but it was shown to induce a rapid and substantial increase in intracellular cAMP accumulation in human primary keratinocyte cultures. This intracellular elevation of cAMP was correlated with cellular proliferation (95). However, there are many conflicting reports concerning the inhibitory or stimulatory effect of intracellular cAMP elevation on the proliferation of keratinocytes. Thus, it remains difficult to elucidate the exact role of this peptide in human skin.

Somatostatin (SST)

Somatostatin (SST) is a 92-amino-acid prohormone that is further post-translationally digested into two biologically active peptides: the cyclic SST-14 and the NH2-terminal SST-28 (141, 142). This regulatory peptide is produced in the hypothalamus, as well as in neuronal (central nervous system and primary sensory neurons) and nonneuronal tissues (143, 144). In human skin, only SOM-14 immunoreactivity has been demonstrated. The expression of SOM and its receptors (SOM R1-5) has been shown *in vitro* in cultured keratinocytes (145-148) and *in vivo* by confocal laser scanning microscopy in Merkel cells, keratinocytes, Langerhans cells and suprabasal cells of the epidermis (91, 145-149). In the dermal layer, SST-14 specific antisera stained dendritic cells as well as somatostatin-positive nerves (147).

SST is an inhibitor of exocrine and endocrine secretion from the central and peripheral nervous system (143). Hence, SST can inhibit the release of neurotransmitters such as SP from nerve endings (150, 151) and its anti-inflammatory and anti-nociceptive actions have been shown in *in vitro* and *in vivo* studies (152-157). In addition to its opposite effect on SP-induced inflammation this regulatory peptide can counteract plasma extravasation (158).

More interestingly, SST affects the proliferation, migration and formation of cellular junctions of different cell types. SST and its analogues have been shown to have an antiproliferative effect on T and B lymphocytes (159, 160), and they have also been shown to inhibit the proliferation of keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells in several *in vitro* and *in vivo* models. Furthermore, it is a powerful regulator of the adhesion and migration of keratinocytes and endothelial cells (150, 155, 161, 162). The activation of SST receptors induced a reduction in cAMP levels, an activation of the MAPK pathway and an inhibition of Rac1 activity (150).

The involvement of SST in these cellular processes suggests that this neuropeptide is a negative regulator of wound healing but its role in this process to be elucidated. Senapati *et al* reported a decrease in the epidermal concentrations of SST during the early phases of wound healing in a rat model (163). This result has been confirmed in another model by Vockel M *et al* in a study published in 2011, in which they showed that SST delayed epidermal re-epithelialisation in an *ex vivo* porcine wound healing model (150). However, the exact role of SST in the regulation of the wound healing process remains to be clarified; in particular, it might be of great interest to investigate whether SST and its receptors are regulated in the late stages of normal and chronic wound healing.

Bombesin-like peptide: Gastrin releasing peptide (GRP)

GRP is the mammalian homologue of bombesin; it consists of 27 amino acids. It was first isolated in porcine gastric tissue (164) and is widely distributed in the central (165) and peripheral nervous systems (166, 167).

In the skin, GRP immunoreactivity is present mainly in primary afferents fibres and GRP-positive nerve fibres are positive for nociceptive nerve markers such as SP, CGRP, TRPV1 and PAR2R (168,169). In addition to its role in itch signal transmission within the dorsal horn, its main biological functions in the skin are largely restricted to its action in the itch response via the induction of mast cell degranulation, (170); its implication in wound healing is not certain. However, some studies have shown that bombesin promoted migration, proliferation and neoangiogenesis in bombesin-treated cells compared to untreated cells in an *in vitro* damaged cell layer model (HaCaT) (171) and this mitogen effect on keratinocytes could be observed even in absence of growth factors as EGF (172). In 2002, Yamaguchi Y *et al* confirmed these data by using GRP and verified that GRP can be a mitogen agent for keratinocytes when these cells are cultured without other growth factors such as EGF and TGF-β. Furthermore, in the same study the authors showed in an *in vivo* hairless porcine model that the topical application of GRP accelerated macroscopic epidermal regeneration and re-epithelialisation in a dose-dependent manner (173). They concluded that topical use of GRP may be useful for the treatment of wounds with different origins (burns, injury, chronic ulcers, or skin graft donor sites). However, there is too little information its beneficial effect of GRP on

wound healing and we must keep in mind that GRP is only one key molecule in itch signal transmission.

Neurotensin (NT)

NT is a tridecapeptide identified in the skin: it has been suggested to participate in different mechanisms such as nociception, pruritus or inflammation (174, 175). Recently, a role for neurotensin in cutaneous wound healing has been proposed as this peptide can downregulate the activation of pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF-α) and upregulate the expression of EGF by murine Langerhans Cells (176). However, a previous report evaluating the action of several peptides including NT on the intracellular formation of inositol phosphates by the activation of the phospholipase C in the human keratinocytes cell line, HaCaT, did not conclude that NT acted as an inhibitor or activator of this molecule (177). Thus, its effect on human skin cells and its role in wound healing remain to be determined.

Galanin

The galanin protein family includes four members: galanin (GAL) and GMAP (galanin message-associated protein) which are encoded by the same gene as well as alarnin and GALP (galanin-like peptide), which are encoded by a splice variant of the Gal gene. These proteins transduce their signal through the galanin receptor family comprising three members, GALR1-3, which are G protein-coupled receptors. However some authors have suggested that GALP and alarnin could have specific receptor that have yet to be identified (178).

In human skin, GAL-like immunoreactivity was detected first in afferent sensory neurons and fibres of the dermis (68); it was then detected in different cutaneous structures such as Merkel cells, Meissner corpuscules, keratinocytes, and eccrine sweat glands as well as around blood vessels (91, 179, 180). However, some authors have reported differences in expression among the Gal-peptides: GALP and alarin were shown to be weakly expressed in keratinocytes, whereas Gal was highly expressed in the epidermis. Furthermore, alarin expression was described in the dermis in perivascular locations (pericytes and smooth muscle cells) (181, 182).

GAL binding sites were revealed in the basal layer of the epidermis and cultured human keratinocytes (179, 183, 184) as well as in the dermis around the eccrine sweat glands, around the hair follicles and in the vicinity of the arteries (183, 184).

While the expression of GMAP, GLAP and alarin in the skin may have some physiological relevance, the bulk of the current knowledge concerns GAL.

GAL was shown to be a crucial mitogenic and neurotrophic factor for axonal regeneration after neuronal injury. After axotomy, GAL mRNA and peptides were shown to be abundantly expressed in 40-50% of all DRG neurons, and their levels remained elevated during nerve regeneration (185, 186). These data were confirmed by the use of galanin knockout animals in which the regeneration of sciatic nerves after injury was 35% less efficient. *In vitro* experiments further supported this compromised regenerative capacity by demonstrating a deficit in neuritogenesis (DRG cells impaired abilities to extend neuritis in culture) (187).

Moreover, GAL *via* GALR1 and GALR3 was mainly described as an anti-proliferative agent in normal and malignant tissues (188, 189). But Dallos *et al* suggested in their study on human cultured keratinocytes that GAL via GALR2 may induce mechanisms involved in the differentiation or proliferation of these cells (184). These conflicting results could be explained by the differences in the cell types used for the studies but more interestingly, they suggest that GAL may exert opposite effects depending on which receptor it binds.

Furthermore, the influence of Gal on skin processes such as wound healing has been suggested in an *in vitro* study on normal cultured human keratinocytes in which the incubation of cells with GAL induced an upregulation of pro-inflammatory cytokines production (IL-1α and IL-8) as well as the release of the mature form of NGF, a neurotrophin that promotes cell survival, modulates cell differentiation and stimulates neuritogenesis (98). These data confirmed that GAL may play a role in the modulation of cutaneous inflammation (190, 191).

Another interesting role of GAL and GAL peptides lies in their capacity to regulate the physiology of skin vessels. Vasoconstrictive effects were described in murine dorsal skin for GAL, GALP and alarin upon coinjection of SP and CGRP (181, 192) and the inhibition of cutaneous plasma extravasation was induced by histamine in the pigeon (193, 194).

Neurotrophins (NTs)

Neurotrophins (NTs) consist of a structurally and functionally diverse polypeptide family, known to act as mediators in the interactions between immune, nerve and skin cells and to play a critical role in skin homeostasis. Four members constitute this family: nerve growth factor (NGF), neurotrophin-3 (NT3), neurotrophin-4/5 (NT4/5) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). NTs could bind two types of receptors with different affinities: the low-affinity p75NTR could bind all NTs and the high-affinity tyrosine kinase receptors (Trk) showed ligand selectivity; TrkA has a high affinity for NGF, TrkB for BDNF and NT4, and TrkC for NT3 (195, 196).

In the skin, cutaneous neurotrophins and their receptors are expressed by sensory and sympathetic neurons as well as nonneuronal cells (197-200).

While NGF was the member most extensively studied in human skin, over the years the role of the other members of this neurotrophin family has been investigated in skin even if their implication in cutaneous wound healing remains poorly characterised.

Nerve growth factor-beta (NGF-β)

NGF-β is a 26kD polypeptide that is classically described as a factor involved in the growth and survival of neurons. It has been known for several years that NGF could exert a broader influence on the biological activities on non-neuronal cells (201-205). As we indicated previously, the effects of mature NGF are mediated by specific neurotrophin receptors, a 75 kDa low affinity receptor of (p75NTR) and a high-affinity 140kD tyrosine kinase receptor (TrkA). Until the early 1990s nothing was known about the expression and function of this growth factor in the skin.

NGF plays a crucial role as a neurotrophic molecule also at the skin level (206). The first evidence came from studies in mice showing that, during cutaneous development, NGF is expressed at its highest levels in the epidermis and is transported to the innervating neurons in a retrograde fashion (207, 208). In particular, NGF synthesis begins in the skin with the arrival of the first axons to the epidermis, and the levels of NGF mRNA increase throughout the period of skin innervation (208).

NGF is mostly expressed by keratinocytes (209) and significantly higher levels of this neurotrophin were detected in proliferating and subconfluent keratinocytes than in

differentiated cells (203, 210). Several studies have demonstrated that NGF was immediately and constitutively released in response to tissues injury and, then plays an important role in tissue repair (211-216). So, NGF promotes re-epithelialisation by stimulating keratinocytes proliferation and by protecting them to apoptosis via an autocrine loop (217, 218). In different mice or rats models, it could be observed that topical application of NGF accelerated the rate of wound healing (215, 216, 219).

Furthermore, NGF was shown to act on the fibroblasts in wound healing. NGF stimulated the differentiation of dermal fibroblasts into dermal myofibroblasts as well as their migration and contractile activity but not their proliferation (205, 220, 221). Furthermore, metabolically active dermal myofibroblasts could release neurotrophin such as NGF and these events initiated and promoted tissue remodelling (205).

In addition, NGF induces the proliferation of human dermal microvascular endothelial cells (HDMECs) *in vitro* and promotes the expression of adhesion molecules such as ICAM on these cells (202).

Keratinocyte-derived NGF is a major mediator of skin innervation density (222). NGF is considered to stimulate the regeneration of neurons (223) and several studies have suggested that there is a cross-regulation between the expression and the release of sensory neurons neuropeptides and NGF. In Dallos *et al* showed that neuropeptides such as CGRP, SP, GAL or VIP induced the synthesis and the release of the mature and pro-form of NGF in an *in vitro* model of NHEKs and higher levels of NGF-like immunoreactive materials were detected in neuropeptides-treated cultured (98). In terms of its effect on neuropeptides, NGF was shown to upregulate the expression and the release of SP and CGRP from adult rat primary sensory neurons (224-226).

Hence, NGF is a neurotrophic factor acting on various classes of neuronal and nonneuronal cells to promote cell survival, stimulate neurites outgrowth and modulate cell differentiation in the skin, which are crucial steps of skin wound healing. All these findings have encouraged successful treatment of leg ulcers in humans with topical application of NGF (227-229). Thus NGF may play a role in tissue repair and fibrosis.

Neurotrophins 3 and 4/5 (NT3 and NT4/5)

Neurotrophin 3

Among the neurotrophin family, NT-3 deserves special attention in cutaneous biology. The expression of NT-3 and TrkC, its high-affinity receptor, was detected in human and mouse skin; there was an increased in the expression of the receptor in the basal epidermis layer while the expression of the protein seems to be restricted to the dermal compartment (230-232). These data support the involvement of NT-3 of skin wound healing but until recently its role had not been clearly demonstrated (233). Human fibroblasts, and keratinocytes can produce NT-3 *in vitro* (203, 234) while human melanocytes expressed but did not release NT-3 (204). However, NT-3 acts as a growth factor for human melanocytes cultured in medium that has been depleted of growth factors (235). Botchkarev VA *et al* demonstrated that NT-3 was an important growth modulator during morphogenesis and the remodelling of neuroectodermal mesenchymal interactions such as the hair follicles (231). Furthermore, Sterne *et al* demonstrated the trophic role of NT-3 on primary sensory neurons after injury in several studies on the rat. This improvement in nerve regeneration after the exogenous administration of NT-3 on primary sensory nerves was associated with the regulation of the phenotype of the NPY-immunoreactive neuronal subpopulation in the DRG (236, 237). These data were recently confirmed by Beggs *et al* who showed that the upregulation of NT-3 in the injured skin of young rats was associated with hyperinnervation of peptidergic afferent neurons (233). All these data indicate that NT-3 is an important “epitheliotrophin” in the human epidermis that acts in both a paracrine and an autocrine manner, and thus is intimately involved in the control of skin homeostasis and certainly in the skin wound healing process (203, 238).

Neurotrophin 4/5

Immunoreactivity was detected for both NT-4/5 and its high affinity receptor, TrkB, in mouse and human skin in the epidermal layer and in basal and suprabasal epidermal keratinocytes, respectively (203, 204, 232, 238). Interestingly, intense epidermal staining for NT-4 was characterised in prurigo lesions in AD patients suggesting a pathophysiological role for this neurotrophin which it supports nerve outgrowth via a PGE2-stimulated pathway (232, 239, 240). Marconi *et al* have shown *in vitro* that human keratinocytes such as melanocytes could synthesize and secrete NT-4 but only at low levels (203, 204). However, NT-4/5 does not exert any effect on human keratinocytes proliferation, but could induce apoptosis (203, 241). These results, in

contrast with data published by Botchkarev on mouse keratinocytes, could be explained by the fact that only the truncated extracellular isoform of TrkB was detected in the human epidermis which has been postulated to act as a dominant inhibitory modulator of trkB signalling (203, 238, 242). Thus, the role of NT-4/5 in cutaneous wound healing remains to be defined but it could act as a negative modulator of keratinocyte proliferation or could promote the skin reinnervation.

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

BDNF can mediate its effects through the low affinity receptor, p75NTR and its high-affinity receptor, TrkB of which only the truncated form has been detected in human keratinocytes (203). The biological actions of BDNF on skin are quite similar to those of NT4/5. It is synthesised and secreted at low levels by cultured human keratinocytes and melanocytes but can stimulate the proliferation of neither keratinocytes nor melanocytes (203, 204). BDNF induces human keratinocytes apoptosis through the p75NTR receptor (241). In contrast, it promotes eosinophil survival and migration (243) as well as migration and formation of the tubular structures of endothelial cells (HUVEC) (244, 245). However, the role of this neurotrophin has been described in a recent paper that they demonstrated that BDNF synthesised by dermal fibroblasts exerted a mitogenic action on these cells and could induce the differentiation of dermal fibroblasts into dermal myofibroblasts. These findings suggest a role for BDNF in tissue remodelling and wound healing (205).

Neurohormones

Corticotropin-releasing hormone (CRH)

CRH, a 41-amino-acid peptide, is the major activator of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) and has potent immunomodulatory properties (246, 247). CRH and its receptors (CRF-1 or CRH-R1 and CRF-2 or CRH-R2) are expressed in many peripheral tissues and organs including that skin (248). In human skin, CRH-R1 is the major receptor subtype expressed both in the epidermal and dermal compartments while CRH-R2 is detected predominantly in dermal structures (248, 249).

In the skin, CRH can modulate the secretion of vascular endothelial growth factor (250) and has a crucial role during inflammation. It can activate NF-κB, the master regulator of inflammation, in human epidermal keratinocytes (251) and has a dual

immunomodulatory activity: a direct pro-inflammatory effect by stimulating the secretion of IL-6 and TGF-β1 and an indirect anti-inflammatory action by inducing the release of cytokines such as IL-11 or by inhibiting the release of IL-1β from human keratinocytes (252-255).

CRH inhibits the proliferation of normal neonatal keratinocytes (249) but stimulates epidermal keratinocyte differentiation (256).

While it had been hypothesised that skin CHR mediates the activation of the tissue response to local stressors including inflammation and injury (257, 258), until recently the effects of endogenous (produced within the skin) CRH had not been studied. In 2011, Rassouli *et al* used a model of dermal fibroblasts from CRH(-/-) and CRH(+/+) (wild type) mice and human foreskin to demonstrate that endogenous CRH had a suppressive effect on the migration and the proliferation of fibroblasts as well as an immunomodulatory effect on these cells that was exerted down regulating the release of IL-6 (259). However, these results were in contrast with the results of Slominski *et al* who observed a stimulating proliferation of dermal fibroblasts after the addition of CRH in culture (260). This discrepancy in the findings for the the same cell type is interesting but difficult to explain. Both studies used human fibroblasts under the same culture conditions; however the first study used adult skin fibroblasts while the second study used foreskin fibroblasts (259). The difference in human fibroblast origin might be important but is not sufficient to explain the difference. The main difference between the two publications concerns the CRH concentrations tested in the experiments: Slominski *et al* analysed the effects of exogenous CRH (10^{-7}M) on the culture whereas Rassouli's study investigated the action of endogenous CRH (i.e, produced by fibroblasts). Despite these conflicting results, endogenous CRH seems to have an important, albeit not explored yet role in epidermal tissue remodelling, regeneration and maintenance of tissue homeostasis.

Pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides

POMC is a 31-36 kDa precursor protein post-translational processing by prohormone convertase (PC) generates up to 8 POMC peptides named melanocortins including the melanocyte stimulating hormones (α- MSH, β- MSH and Ɣ-MSH), adrenocorticotropin hormone (ACTH) and β-endorphin (β-E). The eexpression of PCs is tissue specific and their presence determines the selective expression of POMC.

Thus, the major site of expression of POMC is the pituitary gland but POMC and POMC-derived peptides have been detected in various tissues including the skin. It is now established that several cell types in human skin (melanocytes, keratinocytes, Langerhans cells, dermal microvascular endothelial cells, masts cells and fibroblasts) express and produce POMC peptides (261-264).

Their effects are transduced via a family of G-protein coupled receptors, the melanocortin receptors (MC-1R to 5R). In the skin, epidermal and dermal cells transduce signals exclusively via the MC-1 receptor which exhibits the highest affinity for α-MSH and ACTH (265).

Adrenocorticotropic hormone (ACTH)

Adrenocorticotropic hormone or ACTH is a 39-amino-acid peptide produced by the pituitary gland. However, its expression and release by human skin cells has also been demonstrated (266). Data concerning its effects on human skin in general and on skin wound healing in particular are closely related to α-MSH as this protein is the last result of the proteolytic cleavage of ACTH 1-17. Furthermore, these proteins act via the same receptor, the MC1 receptor. Thus, In 1996, Matsumoto *et al* reported that POMC and its derivatives, ACTH and α-MSH, were strongly expressed during the healing of human xenografts (267); this increase in expression was observed just after the graft and was maintained in the dermis and epidermis from 2 to 4 weeks post-graft. Furthermore, Tsatmali et al have shown that ACTH and its related peptides (i.e ACTH 1-17) produced by human keratinocytes were present in greater concentrations than α-MSH in the epidermis (264). These studies focused on one specific step in skin wound healing, i.e skin pigmentation but many authors agree that POMC peptides such as ACTH, produced *in situ* by human skin, are involved in other key regulator events of healing such as the negative control of this process through the stimulation of cortisol production. Some studies have suggested a possible role of ACTH in neoangiogenesis: ACTH was shown to significantly induce VEGF expression and was a potent inducer of endothelial fenestration in different mammalian models of the adrenal cortex in response to a functional demand or restored during regeneration (268-270). However, its role in vascular development and function *in vivo* has not been established yet.

Alpha-melanocyte stimulating hormone (α-MSH)

α-MSH is a 22-amino-acid-peptide signalling through the MC-1R receptor; it is principally produced by the pituitary gland but like ACTH it can also be expressed by skin cells (262).

The role of α-MSH in the skin in general and in cutaneous wound healing in particular is becoming more established. The data reporting the upregulation of α-MSH and ACTH during the healing of human xenografts that we previously cited for ACTH were reinforced by the study of Muffley LA *et al*. Through a spatiotemporal immunohistochemical analysis, they observed the expression of α-MSH and its receptor, MC-1R, in murine cutaneous wounds, human acute burns and hypertrophic scars; these findings confirmed the important role of these molecules in cutaneous wound healing by showing that the protein levels of α-MSH and MC-1R were upregulated in human burn wounds and hypertrophic scars and were localised to the epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts (271). Furthermore, α-MSH appears to be a potent immunomodulator of the inflammatory reaction by activating the synthesis of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and inhibiting pro-inflammatory cytokines such as IL-1 or IL-12 (272). In particular, α-MSH was shown to modulate the production of cytokines by both fibroblasts and endothelial cells *in vitro* through the activation of NF-kB and AP-1 signalling pathways (273, 274). Specifically, α-MSH induced a weak but reproducible and significant increase in IL-8 secretion by dermal fibroblasts, which is a chemokine known to regulate angiogenesis and to promote the acquisition of the migratory phenotype by primary fibroblasts (273, 275)

α-MSH has a cryoprotective role for dermal fibroblasts and an anti apoptotic effect for skin especially after UV radiation (276, 277) and it is known to regulate the proliferation and differentiation of keratinocytes (44).

In light of these data, it appears that the α-MSH/MC-1R signalling pathway exerts important regulatory functions in wound healing, especially by regulating angiogenesis and the inflammatory response as well as the proliferation and migration of fibroblasts.

Beta-endorphin (β-E)

β-endorphin is a 31 amino-acids-peptide, resulting from the processing of the precursor POMC and it is found in the neurons of the hypothalamus and in the

pituitary gland. It is the endogenous ligand of the μ-opiate receptor (MOR). Many studies have shown that this POMC-derived peptide and its receptor MOR were expressed in keratinocytes in the upper layer of the epidermis, in nerve terminations at the border of dermis and epidermis and in fibroblasts in the dermis (278-282). The literature has presented conflicting results about the expression modulation of this peptide's expression. Some reports observed that its expression could be modulated by UV radiation (UVA and/or UVB) (279, 282, 283) while others described β-endorphin production that was not dependent on UV radiations (i.e no increase in β-endorphin immunoreactivity in cultured human keratinocytes or *in vivo* after UVA or UVB treatment) (280, 284). Additionally, IL-1α, a pro-inflammatory cytokine involved in the first step of wound healing, as well as phorbol esters can stimulate its production (279).

There clear evidence supporting the biological role of β-endorphin and MOR in skin wound healing mechanisms. β-endorphin can stimulate the expression of cytokeratin 16, which is secreted in the hyperproliferative epidermis, e.g during wound repair, in a dose-dependent manner in human skin organ cultures (285, 286). Furthermore, β-endorphin upregulates the expression of the TGF-βII receptor, an important protein involved in wound healing (286, 287). Another study indicated that this opioid peptide improved the migration of keratinocytes that could be specifically blocked by the opioid antagonist naltrexone (288) in *in vitro* cultured human foreskin and induced fibroblasts proliferation (278).

In a rat study, an immunohistochemical study showed that the expression of MOR and β-endorphin was chronobiological in nature during the process of wound healing with the expression of β-endorphin increasing during the wound healing process (278). Bigliardi P *et al* supplemented these results by showing that β-endorphin levels were greatly increased in chronic wounds whereas in acute wounds, these levels were slightly enhanced: MOR was significantly less expressed at the wound margins of chronic wounds compared to acute wound (286). These results suggest that β-endorphin could be involved in a negative feedback mechanism of its own receptor.

Thus, β-endorphin appears to be an important peptide in the mechanism of skin wound healing through its different effects on fibroblast proliferation and re-epithelialisation.

Cortisol

Cortisol, also named hydrocortisone, is the main glucocorticoid (GC) hormone in humans. Its production and secretion is under the control of the HPA axis, specifically CRH and ACTH. In particular, the relationships between GCs and skin wound healing have been studied in recent years. Indeed, GCs are the most widely used class of anti-inflammatory drugs and are responsive to stress. Various stressors or treatments ranging in magnitude and duration can impair skin wound healing in humans (289), and it has long been clear that healing is also significantly related to cortisol levels. High levels of cortisol predicted slower healing (290, 291). For example, in an in vivo model of hamsters subjected to restraint stress, those who were pair-housed had significant lower serum cortisol concentrations than those who were socially isolated (292). In humans, the production of pro-inflammatory cytokines (i.e: IL-1β and IL-8) was found to be suppressed in blood samples from stressed individuals as the cortisol levels were elevated (293, 294).

Systemic GCs are known to inhibit wound repair by globally suppressing the response to wounding. Fibroblast proliferation and collagen synthesis are reduced, contributing to incomplete granulation tissue formation and impaired wound contraction. Some studies have evaluated the influence of GC treatments on skin wound healing. In a study comparing the resistance of skin wound healing of mice submitted to local or systemic hydrocortisone (the cortisol in rodents) administration in different postoperative periods, Alberti *et al* showed a reduction in skin wound healing resistance during the first postoperative week in the treated mice (295). However, it seems that this impairment in wound healing upon GC treatment is not due to persistent adverse effects of GCs on fibroblast physiology (cell proliferation, cellular replicative lifespan and collagen production) (296).

An endogenous glucocorticoid-producing system can be described in human skin. All major components of the HPA axis (CRH, CRH-R, POMC, ACTH, MC-R) are produced and identified in the skin (297, 298). Additionally, the enzymatic system catalysing the conversion of hormonally active cortisol to inactive cortisone and vice versa, the 11βHSD1/D2 (11β-hydroxysteroid dehydrogenase 1/2) enzymes are expressed in the epidermis and in fibroblasts (299-301). Specifically, the negative role of 11βHSD1 in wound healing had been studied by Terao *et al*: these authors demonstrated that the addition of a selective inhibitor of this enzyme enhanced cutaneous wound healing in C57BL/6 mice model (300). In addition, in 2011, several

publications reported that both human keratinocytes *in vitro* and epidermis *in vivo* synthetised cortisol. Furthermore, Vukelic et al demonstrated that the essential enzyme for cortisol synthesis, the steroid 11bhydroxylase CYP11B1, was expressed in the basal and first suprabasal layers of the human epidermis (302, 303). Additionally, their study confirmed that cortisol levels increased upon acute epidermis injury by wounding in both human skin explants and porcine skin samples and that inhibition of cortisol synthesis during wound healing increased IL-1β production. More interestingly, their results suggest that the pro-inflammatory cytokine IL-1β induced its own negative feedback regulation by inducing the expression of CYP11B1, and a subsequent increase in cortisol production by keratinocytes. Other publications confirmed that human primary keratinocytes expressed all the major enzymes involved in the metabolic chain from cholesterol to cortisol (299, 303).

Other neurohormones

Prolactin (PRL)

Prolactin (PRL) is a 199-amino-acid neurohormone classically associated as the pituitary modulator of lactation and reproduction. Hence, PRL is likely to be involved as a mediator in the "brain-skin axis" and its expression in different skin cell types has been documented (304). Whereas PRL expression could not be detected in dermal fibroblasts in murine skin (304), it is expressed by cultured human dermal fibroblasts (305). However, its functional effect on fibroblast biology remains unclear. Interestingly, endothelial cells expressed the PRL-receptor and in an *in vitro* culture of endothelial cells, researchers showed that PRL treatment of a mechanical injury inhibited cell adhesion in a dose-dependent manner and that these cultured endothelial cells became abnormal in shape and had reductions in f-actin staining (306). Its role in the control of angiogenesis has been explored as well (307). Furthermore, an elevation in serum PRL levels has been demonstrated after thermal injury (308).

These data could encourage future exploration of the role of PRL in skin wound healing as there is no study concerning its exact implication in this mechanism.

Enkephalins

Enkephalins are opioid peptides that are synthetised not only in the central nervous system but also in peripheral tissues such as in the skin. Two pentapeptides have been identified, [Met^5]-enkephalin also known as opioid growth factor (OGF) and Leu-enkephalin (309, 310).

- ***[Met^5]-enkephalin***

Due to its opioid nature [Met^5]-enkephalin was described binding one of the classical opioid receptors, the δ opioid receptor (DOR). However, Zagon *et al* demonstrated that OGF mediated its action preferentially through the nuclear-associated OGF receptor (OGFR) (311). Met-enkephalin and its receptor were shown to be localised by immunohistochemistry in the basal and suprabasal layers of human and mouse skin (312,313). More recently, DOR expression was described in murine and human keratinocytes and fibroblasts (314).

The modulation of the [Met^5]-enkephalin/[Met^5]-enkephalin receptor system results in increases or decreases in skin cell proliferation and differentiation. Thus, this axis was shown to modulate re-epithelialisation of the mammalian cornea by inhibiting basal epidermal cell proliferation and differentiation during the stratum corneum renewal (315, 316). McLaughlin *et al* clearly showed a decrease in the number of cell layers in the epidermis in transgenic mice overexpressing OGFR which impaired full-thickness wound closure (319). To further analyse the role of OGF in skin wound healing, the group of Bigliardi used an *in vivo* model of mice that were knock-outs for DOR. With this model they noted that the loss of DOR induced a faster increase in the epidermal thickness compared to wild-type mice during the wound healing process; this epidermal hypertrophy was correlated with an increased expression of markers of skin proliferation, differentiation, re-epithelialisation and dermal repair in KO mice *versus* WT (314, 317). In the two cases, i.e the overexpresssion or absence of DOR, skin wound healing was delayed. In summary, the [Met^5]-enkephalin/[Met^5]-enkephalin receptor axis seems to be an important regulator of skin wound healing.

- ***[Leu^5]-enkephalin***

The influences of [Leu^5]-enkephalin on skin wound healing are closely related to [Met^5]-enkephalin. Despite the fact that it can modulate its actions by both the δ and

μ opioid receptors (DOR or MOR) it was significantly greater affinity for the DOR and could inhibit the proliferation and differentiation of cultured human keratinocytes (315). The local application of dalargin, a leu-enkephalin analogue, has been observed to improve wound healing in rat skin by inducing fibroblast proliferation and growth capillary while also accelerating the maturation of granulation tissue and the epithelisation of the defects (318-320).

Conclusions

Neuropeptides, neurohormones and neurotrophins are major actors in the regulation of skin wound healing (figure 1). A better knowledge of this fine regulation will allow researchers to propose new therapeutic possibilities for skin chronic wounds; these applications would not be restricted to neuropathic diseases but could also be of use in all wound disorders.

Acknowledgments

We thank the Fondation Le Lous (France) for its financial support. None of the authors had conflict of interest.

References

1. Boulais N, Pereira U, Lebonvallet N, Misery L. The whole epidermis as the forefront of the sensory system. Exp. Dermatol. août 2007;16(8):634‑635.

2. Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin. Endocr. Rev. oct 2000;21(5):457‑487.

3. Brazzini B, Ghersetich I, Hercogova J, Lotti T. The neuro-immuno-cutaneous-endocrine network: relationship between mind and skin. Dermatol Ther. 2003;16(2):123‑131.

4. Slominski A. Neuroendocrine system of the skin. Dermatology (Basel). 2005;211(3):199‑208.

5. Misery L. Skin, immunity and the nervous system. Br. J. Dermatol. déc 1997;137(6):843‑850.

6. Boulais N, Misery L. The epidermis: a sensory tissue. Eur J Dermatol. avr 2008;18(2):119‑127.

7. Wiesner-Menzel L, Schulz B, Vakilzadeh F, Czarnetzki BM. Electron microscopical evidence for a direct contact between nerve fibres and mast cells. Acta Derm. Venereol. 1981;61(6):465‑469.

8. Sueki H, Telegan B, Murphy GF. Computer-assisted three-dimensional reconstruction of human dermal dendrocytes. J. Invest. Dermatol. nov 1995;105(5):704‑708.

9. Chateau Y, Misery L. Connections between nerve endings and epidermal cells: are they synapses? Exp. Dermatol. janv 2004;13(1):2‑4.

10. Langerhans P. Uber die nerven der manschlichen haut. Virchows Arch Pathol Anat Physiol 1868;44:325‑337.

11. Hosoi J, Murphy GF, Egan CL, Lerner EA, Grabbe S, Asahina A, et al. Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. Nature. 13 mai 1993;363(6425):159‑163.

12. Gaudillere A, Misery L, Souchier C, Claudy A, Schmitt D. Intimate associations between PGP9.5-positive nerve fibres and Langerhans cells. Br. J. Dermatol. août 1996;135(2):343‑344.

13. Hilliges M, Wang L, Johansson O. Ultrastructural evidence for nerve fibres within all vital layers of the human epidermis. J. Invest. Dermatol. janv 1995;104(1):134‑137.

14. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. Lancet. 12 nov 2005;366(9498):1736‑1743.

15. Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S, Erspamer V. The tachykinin peptide family. Pharmacol. Rev. juin 2002;54(2):285‑322.

16. Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. Life Sci. 6 févr 2004;74(12):1445‑1463.

17. Steinhoff M, Ständer S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. Arch Dermatol. nov 2003;139(11):1479‑1488.

18. Lembeck F, Holzer P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. déc 1979;310(2):175‑183.

19. Liu J-Y, Hu J-H, Zhu Q-G, Li F-Q, Sun H-J. Substance P receptor expression in human skin keratinocytes and fibroblasts. Br. J. Dermatol. oct 2006;155(4):657‑662.

20. Quinlan KL, Song IS, Bunnett NW, Letran E, Steinhoff M, Harten B, et al. Neuropeptide regulation of human dermal microvascular endothelial cell ICAM-1 expression and function. Am. J. Physiol. déc 1998;275(6 Pt 1):C1580‑1590.

21. Dunnick CA, Gibran NS, Heimbach DM. Substance P has a role in neurogenic mediation of human burn wound healing. J Burn Care Rehabil. oct 1996;17(5):390‑396.

22. Kishimoto S. The regeneration of substance P-containing nerve fibres in the process of burn wound healing in the guinea pig skin. J. Invest. Dermatol. sept 1984;83(3):219‑223.

23. Khalil Z, Helme R. Sensory peptides as neuromodulators of wound healing in aged rats. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. sept 1996;51(5):B354‑361.

24. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Exogenous administration of Substance P enhances wound healing in a novel skin-injury model. Exp. Biol. Med. (Maywood). avr 2005;230(4):271‑280.

25. Scott JR, Muangman PR, Tamura RN, Zhu KQ, Liang Z, Anthony J, et al. Substance P levels and neutral endopeptidase activity in acute burn wounds and hypertrophic scar. Plast. Reconstr. Surg. avr 2005;115(4):1095‑1102.

26. Spenny ML, Muangman P, Sullivan SR, Bunnett NW, Ansel JC, Olerud JE, et al. Neutral endopeptidase inhibition in diabetic wound repair. Wound Repair Regen. oct 2002;10(5):295‑301.

27. Rook JM, McCarson KE. Delay of cutaneous wound closure by morphine via local blockade of peripheral tachykinin release. Biochem. Pharmacol. 1 sept 2007;74(5):752‑757.

28. Rook JM, Hasan W, McCarson KE. Morphine-induced early delays in wound closure: involvement of sensory neuropeptides and modification of neurokinin receptor expression. Biochem. Pharmacol. 1 juin 2009;77(11):1747‑1755.

29. Altun V, Hakvoort TE, Van Zuijlen PP, Van der Kwast TH, Prens EP. Nerve outgrowth and neuropeptide expression during the remodelling of human burn wound scars. A 7-month follow-up study of 22 patients. Burns. nov 2001;27(7):717‑722.

30. Iwamoto I, Nadel JA. Tachykinin receptor subtype that mediates the increase in vascular permeability in guinea pig skin. Life Sci. 1989;44(16):1089‑1095.

31. Holzer P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. Gen. Pharmacol. janv 1998;30(1):5‑11.

32. Hughes SR, Williams TJ, Brain SD. Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P. Eur. J. Pharmacol. 4 déc 1990;191(3):481‑484.

33. Nilsson J, Von Euler AM, Dalsgaard CJ. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. Nature. 2 mai 1985;315(6014):61‑63.

34. Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Dolara P, Maggi CA. NK1-receptors mediate the proliferative response of human fibroblasts to tachykinins. Br. J. Pharmacol. mai 1990;100(1):11‑14.

35. Kähler CM, Herold M, Reinisch N, Wiedermann CJ. Interaction of substance P with epidermal growth factor and fibroblast growth factor in cyclooxygenase-dependent proliferation of human skin fibroblasts. J. Cell. Physiol. mars 1996;166(3):601‑608.

36. Jain M, LoGerfo FW, Guthrie P, Pradhan L. Effect of hyperglycemia and neuropeptides on interleukin-8 expression and angiogenesis in dermal microvascular endothelial cells. J. Vasc. Surg. juin 2011;53(6):1654‑1660.e2.

37. Walsh DA, Hu DE, Mapp PI, Polak JM, Blake DR, Fan TP. Innervation and neurokinin receptors during angiogenesis in the rat sponge granuloma. Histochem. J. nov 1996;28(11):759‑769.

38. Wiedermann CJ, Auer B, Sitte B, Reinisch N, Schratzberger P, Kähler CM. Induction of endothelial cell differentiation into capillary-like structures by substance P. Eur. J. Pharmacol. 18 mars 1996;298(3):335‑338.

39. Gibran NS, Tamura R, Tsou R, Isik FF. Human dermal microvascular endothelial cells produce nerve growth factor: implications for wound repair. Shock. févr 2003;19(2):127‑130.

40. Ansel JC, Armstrong CA, Song I, Quinlan KL, Olerud JE, Caughman SW, et al. Interactions of the skin and nervous system. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. août 1997;2(1):23‑26.

41. McGovern UB, Jones KT, Sharpe GR. Intracellular calcium as a second messenger following growth stimulation of human keratinocytes. Br. J. Dermatol. juin 1995;132(6):892‑896.

42. Tanaka T, Danno K, Ikai K, Imamura S. Effects of substance P and substance K on the growth of cultured keratinocytes. J. Invest. Dermatol. mars 1988;90(3):399‑401.

43. Paus R, Heinzelmann T, Robicsek S, Czarnetzki BM, Maurer M. Substance P stimulates murine epidermal keratinocyte proliferation and dermal mast cell degranulation in situ. Arch. Dermatol. Res. 1995;287(5):500‑502.

44. Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. Exp. Dermatol. juin 1998;7(2-3):81‑96.

45. Parenti A, Amerini S, Ledda F, Maggi CA, Ziche M. The tachykinin NK1 receptor mediates the migration-promoting effect of substance P on human skin fibroblasts in culture. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. avr 1996;353(5):475‑481.

46. Lai X, Wang Z, Wei L, Wang L. Effect of substance P released from peripheral nerve ending on endogenous expression of epidermal growth factor and its receptor in wound healing. Chin. J. Traumatol. juin 2002;5(3):176‑179.

47. Luger TA, Lotti T. Neuropeptides: role in inflammatory skin diseases. J Eur Acad Dermatol Venereol. mai 1998;10(3):207‑211.

48. Wei T, Guo T-Z, Li W-W, Hou S, Kingery WS, Clark JD. Keratinocyte expression of inflammatory mediators plays a crucial role in substance P-induced acute and chronic pain. J Neuroinflammation. 2012;9:181.

49. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. Neuropeptides. déc 2003;37(6):355‑361.

50. Witte MB, Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair. Am. J. Surg. avr 2002;183(4):406‑412.

51. Benrath J, Zimmermann M, Gillardon F. Substance P and nitric oxide mediate would healing of ultraviolet photodamaged rat skin: evidence for an effect of nitric oxide on keratinocyte proliferation. Neurosci. Lett. 10 nov 1995;200(1):17‑20.

52. Muangman P, Tamura RN, Muffley LA, Isik FF, Scott JR, Xie C, et al. Substance P enhances wound closure in nitric oxide synthase knockout mice. J. Surg. Res. 15 mai 2009;153(2):201‑209.

53. Olerud JE, Usui ML, Seckin D, Chiu DS, Haycox CL, Song IS, et al. Neutral endopeptidase expression and distribution in human skin and wounds. J. Invest. Dermatol. juin 1999;112(6):873‑881.

54. Scholzen TE, Luger TA. Neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme -- key enzymes terminating the action of neuroendocrine mediators. Exp. Dermatol. 2004;13 Suppl 4:22‑26.

55. Levy DM, Karanth SS, Springall DR, Polak JM. Depletion of cutaneous nerves and neuropeptides in diabetes mellitus: an immunocytochemical study. Diabetologia. juill 1989;32(7):427‑433.

56. Antezana M, Sullivan SR, Usui M, Gibran N, Spenny M, Larsen J, et al. Neutral endopeptidase activity is increased in the skin of subjects with diabetic ulcers. J. Invest. Dermatol. déc 2002;119(6):1400‑1404.

57. Pradhan L, Cai X, Wu S, Andersen ND, Martin M, Malek J, et al. Gene expression of pro-inflammatory cytokines and neuropeptides in diabetic wound healing. J. Surg. Res. 15 mai 2011;167(2):336‑342.

58. Gibran NS, Jang YC, Isik FF, Greenhalgh DG, Muffley LA, Underwood RA, et al. Diminished neuropeptide levels contribute to the impaired cutaneous healing response associated with diabetes mellitus. J. Surg. Res. nov 2002;108(1):122‑128.

59. Scott JR, Tamura RN, Muangman P, Isik FF, Xie C, Gibran NS. Topical substance P increases inflammatory cell density in genetically diabetic murine wounds. Wound Repair Regen. août 2008;16(4):529‑533.

60. Younan G, Ogawa R, Ramirez M, Helm D, Dastouri P, Orgill DP. Analysis of nerve and neuropeptide patterns in vacuum-assisted closure-treated diabetic murine wounds. Plast. Reconstr. Surg. juill 2010;126(1):87‑96.

61. Cao T, Grant AD, Gerard NP, Brain SD. Lack of a significant effect of deletion of the tachykinin neurokinin-1 receptor on wound healing in mouse skin. Neuroscience. 2001;108(4):695‑700.

62. Wallengren J, Chen D, Sundler F. Neuropeptide-containing C-fibres and wound healing in rat skin. Neither capsaicin nor peripheral neurotomy affect the rate of healing. Br. J. Dermatol. mars 1999;140(3):400‑408.

63. Cavallini M, Casati A. A prospective, randomized, blind comparison between saline, calcium gluconate and diphoterine for washing skin acid injuries in rats: effects on substance P and beta-endorphin release. Eur J Anaesthesiol. mai 2004;21(5):389‑392.

64. Crowe R, Parkhouse N, McGrouther D, Burnstock G. Neuropeptide-containing nerves in painful hypertrophic human scar tissue. Br. J. Dermatol. avr 1994;130(4):444‑452.

65. Burbach GJ, Kim KH, Zivony AS, Kim A, Aranda J, Wright S, et al. The neurosensory tachykinins substance P and neurokinin A directly induce keratinocyte nerve growth factor. J. Invest. Dermatol. nov 2001;117(5):1075‑1082.

66. Kellogg DL Jr. In vivo mechanisms of cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans during thermoregulatory challenges. J. Appl. Physiol. mai 2006;100(5):1709‑1718.

67. Johansson O, Sandberg G. Effect of the neuropeptides beta-MSH, neurotensin, NPY, PHI, somatostatin and substance P on proliferation of lymphocytes in vitro. Acta Physiol. Scand. sept 1989;137(1):107‑111.

68. Tainio H, Vaalasti A, Rechardt L. The distribution of substance P-, CGRP-, galanin- and ANP-like immunoreactive nerves in human sweat glands. Histochem. J. juill 1987;19(6-7):375‑380.

69. Polak JM, Bloom SR. Regulatory peptides--the distribution of two newly discovered peptides: PHI and NPY. Peptides. 1984;5 Suppl 1:79‑89.

70. Sterne GD, Brown RA, Green CJ, Terenghi G. NT-3 modulates NPY expression in primary sensory neurons following peripheral nerve injury. J. Anat. août 1998;193 (Pt 2):273‑281.

71. Noguchi K, De León M, Nahin RL, Senba E, Ruda MA. Quantification of axotomy-induced alteration of neuropeptide mRNAs in dorsal root ganglion neurons with special reference to neuropeptide Y mRNA and the effects of neonatal capsaicin treatment. J. Neurosci. Res. 1 mai 1993;35(1):54‑66.

72. Zhang WB, Domoto T, Tsumori T, Agawa S. Nerve fibres containing neuropeptide Y in the atrioventricular valves of Japanese monkey and rat; a light and electron microscopic study. Histol. Histopathol. oct 1993;8(4):735‑738.

73. Landry M, Holmberg K, Zhang X, Hökfelt T. Effect of axotomy on expression of NPY, galanin, and NPY Y1 and Y2 receptors in dorsal root ganglia and the superior cervical ganglion studied with double-labeling in situ hybridisationand immunohistochemistry. Exp. Neurol. avr 2000;162(2):361‑384.

74. Rydh-Rinder M, Holmberg K, Elfvin LG, Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T. Effects of peripheral axotomy on neuropeptides and nitric oxide synthase in dorsal root ganglia and spinal cord of the guinea pig: an immunohistochemical study. Brain Res. 29 janv 1996;707(2):180‑188.

75. Ohara S, Tantuwaya V, DiStefano PS, Schmidt RE. Exogenous NT-3 mitigates the transganglionic neuropeptide Y response to sciatic nerve injury. Brain Res. 13 nov 1995;699(1):143‑148.

76. Wakisaka S, Kajander KC, Bennett GJ. Increased neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in rat sensory neurons following peripheral axotomy. Neurosci. Lett. 1 avr 1991;124(2):200‑203.

77. Onuoha GN, Alpar EK. Levels of vasodilators (SP, CGRP) and vasoconstrictor (NPY) peptides in early human burns. Eur. J. Clin. Invest. mars 2001;31(3):253‑257.

78. Ahlborg G, Lundberg JM. Exercise-induced changes in neuropeptide Y, noradrenaline and endothelin-1 levels in young people with type I diabetes. Clin Physiol. nov 1996;16(6):645‑655.

79. Kuncová J, Svíglerová J, Tonar Z, Slavíková J. Heterogenous changes in neuropeptide Y, norepinephrine and epinephrine concentrations in the hearts of diabetic rats. Auton Neurosci. 31 août 2005;121(1-2):7‑15.

80. Ghersi G, Chen W, Lee EW, Zukowska Z. Critical role of dipeptidyl peptidase IV in neuropeptide Y-mediated endothelial cell migration in response to wounding. Peptides. mars 2001;22(3):453‑458.

81. Zukowska-Grojec Z, Karwatowska-Prokopczuk E, Rose W, Rone J, Movafagh S, Ji H, et al. Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. Circ. Res. 27 juill 1998;83(2):187‑195.

82. Hashim MA, Tadepalli AS. Cutaneous vasomotor effects of neuropeptide Y. Neuropeptides. nov 1995;29(5):263‑271.

83. Ekstrand AJ, Cao R, Bjorndahl M, Nystrom S, Jonsson-Rylander A-C, Hassani H, et al. Deletion of neuropeptide Y (NPY) 2 receptor in mice results in blockage of NPY-induced angiogenesis and delayed wound healing. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 13 mai 2003;100(10):6033‑6038.

84. Movafagh S, Hobson JP, Spiegel S, Kleinman HK, Zukowska Z. Neuropeptide Y induces migration, proliferation, and tube formation of endothelial cells bimodally via Y1, Y2, and Y5 receptors. FASEB J. sept 2006;20(11):1924‑1926.

85. Caviedes-Bucheli J, Moreno GC, López MP, Bermeo-Noguera AM, Pacheco-Rodríguez G, Cuellar A, et al. Calcitonin gene-related peptide receptor expression in alternatively activated monocytes/macrophages during irreversible pulpitis. J Endod. août 2008;34(8):945‑949.

86. Kulka M, Sheen CH, Tancowny BP, Grammer LC, Schleimer RP. Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. Immunology. mars 2008;123(3):398‑410.

87. Hagner S, Stahl U, Knoblauch B, McGregor GP, Lang RE. Calcitonin receptor-like receptor: identification and distribution in human peripheral tissues. Cell Tissue Res. oct 2002;310(1):41‑50.

88. Hou Q, Barr T, Gee L, Vickers J, Wymer J, Borsani E, et al. Keratinocyte expression of calcitonin gene-related peptide β: implications for neuropathic and inflammatory pain mechanisms. Pain. sept 2011;152(9):2036‑2051.

89. Hara M, Toyoda M, Yaar M, Bhawan J, Avila EM, Penner IR, et al. Innervation of melanocytes in human skin. J. Exp. Med. 1 oct 1996;184(4):1385‑1395.

90. Gibbins IL, Wattchow D, Coventry B. Two immunohistochemically identified populations of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive axons in human skin. Brain Res. 23 juin 1987;414(1):143‑148.

91. Fantini F, Johansson O. Neurochemical markers in human cutaneous Merkel cells. An immunohistochemical investigation. Exp. Dermatol. déc 1995;4(6):365‑371.

92. Botchkarev VA, Eichmüller S, Peters EM, Pietsch P, Johansson O, Maurer M, et al. A simple immunofluorescence technique for simultaneous visualization of mast cells and nerve fibres reveals selectivity and hair cycle--dependent changes in mast cell--nerve fibre contacts in murine skin. Arch. Dermatol. Res. avr 1997;289(5):292‑302.

93. Toda M, Suzuki T, Hosono K, Kurihara Y, Kurihara H, Hayashi I, et al. Roles of calcitonin gene-related peptide in facilitation of wound healing and angiogenesis. Biomed. Pharmacother. août 2008;62(6):352‑359.

94. Engin C. Effects of calcitonin gene-related peptide on wound contraction in denervated and normal rat skin: a preliminary report. Plast. Reconstr. Surg. juin 1998;101(7):1887‑1890.

95. Takahashi K, Nakanishi S, Imamura S. Direct effects of cutaneous neuropeptides on adenylyl cyclase activity and proliferation in a keratinocyte cell line: stimulation of cyclic AMP formation by CGRP and VIP/PHM, and inhibition by NPY through G protein-coupled receptors. J. Invest. Dermatol. nov 1993;101(5):646‑651.

96. Seike M, Ikeda M, Morimoto A, Matsumoto M, Kodama H. Increased synthesis of calcitonin gene-related peptide stimulates keratinocyte proliferation in murine UVB-irradiated skin. J. Dermatol. Sci. févr 2002;28(2):135‑143.

97. Yu X-J, Li C-Y, Xu Y-H, Chen L-M, Zhou C-L. Calcitonin gene-related peptide increases proliferation of human HaCaT keratinocytes by activation of MAP kinases. Cell Biol. Int. nov 2009;33(11):1144‑1148.

98. Dallos A, Kiss M, Polyánka H, Dobozy A, Kemény L, Husz S. Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and galanin on the production of nerve growth factor and inflammatory cytokines in cultured human keratinocytes. Neuropeptides. août 2006;40(4):251‑263.

99. Dahl J, Li J, Bring DK-I, Renström P, Ackermann PW. Intermittent pneumatic compression enhances neurovascular ingrowth and tissue proliferation during connective tissue healing: a study in the rat. J. Orthop. Res. sept 2007;25(9):1185‑1192.

100. Yule KA, White SR. Migration of 3T3 and lung fibroblasts in response to calcitonin gene-related peptide and bombesin. Exp. Lung Res. mai 1999;25(3):261‑273.

101. Haegerstrand A, Dalsgaard CJ, Jonzon B, Larsson O, Nilsson J. Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. mai 1990;87(9):3299‑3303.

102. Zheng S, Li W, Xu M, Bai X, Zhou Z, Han J, et al. Calcitonin gene-related peptide promotes angiogenesis via AMP-activated protein kinase. Am. J. Physiol., Cell Physiol. déc 2010;299(6):C1485‑1492.

103. Mapp PI, McWilliams DF, Turley MJ, Hargin E, Walsh DA. A role for the sensory neuropeptide calcitonin gene-related peptide in endothelial cell proliferation in vivo. Br. J. Pharmacol. juin 2012;166(4):1261‑1271.

104. Manek S, Terenghi G, Shurey C, Nishikawa H, Green CJ, Polak JM. Angiogenesis and reinnervation in skin flaps: the effects of ischaemia examined in an animal model. Int J Exp Pathol. août 1994;75(4):243‑255.

105. Brain SD, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I, Williams TJ. Potent vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide in human skin. J. Invest. Dermatol. oct 1986;87(4):533‑536.

106. Brain SD, Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. Physiol. Rev. juill 2004;84(3):903‑934.

107. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. Nature. 3 janv 1985;313(5997):54‑56.

108. Jansen-Olesen I, Mortensen A, Edvinsson L. Calcitonin gene-related peptide is released from capsaicin-sensitive nerve fibres and induces vasodilatation of human cerebral arteries concomitant with activation of adenylyl cyclase. Cephalalgia. août 1996;16(5):310‑316.

109. Mikami N, Fukada S-I, Yamamoto H, Tsujikawa K. The Regulatory Mechanisms of Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP) in Skin Inflammation. Yakugaku Zasshi. 2012;132(11):1211‑1215.

110. Niizeki H, Alard P, Streilein JW. Calcitonin gene-related peptide is necessary for ultraviolet B-impaired induction of contact hypersensitivity. J. Immunol. 1 déc 1997;159(11):5183‑5186.

111. Kiss M, Kemény L, Gyulai R, Michel G, Husz S, Kovács R, et al. Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone on the IL-8/IL-8 receptor system in a cultured human keratinocyte cell line and dermal fibroblasts. Inflammation. déc 1999;23(6):557‑567.

112. Chen B, Niu Y, Xie T, Miao M, Tian M, Ji X, et al. [Relationship between cutaneous glycometabolic disorders and cutaneous neuropathy in diabetic rats]. Zhonghua Shao Shang Za Zhi. avr 2011;27(2):139‑144.

113. Dockray GJ. Evolutionary relationships of the gut hormones. Fed. Proc. août 1979;38(9):2295‑2301.

114. Duckles SP. Innervation of the cerebral vasculature. Ann Biomed Eng. 1983;11(6):599‑605.

115. Schulze E, Witt M, Fink T, Hofer A, Funk RH. Immunohistochemical detection of human skin nerve fibres. Acta Histochem. août 1997;99(3):301‑309.

116. Tachibana T, Nawa T. Immunohistochemical reactions of receptors to met-enkephalin, VIP, substance P, and CGRP located on Merkel cells in the rat sinus hair follicle. Arch. Histol. Cytol. déc 2005;68(5):383‑391.

117. Misery L, Meyronet D, Pichon M, Brutin J-L, Pestre P, Cambazard F. [Aquadynia: a role for VIP?]. Ann Dermatol Venereol. févr 2003;130(2 Pt 1):195‑198.

118. Martinez C, Delgado M, Abad C, Gomariz RP, Ganea D, Leceta J. Regulation of VIP production and secretion by murine lymphocytes. J. Neuroimmunol. 1 janv 1999;93(1-2):126‑138.

119. Pincelli C, Fantini F, Romualdi P, Sevignani C, Lesa G, Benassi L, et al. Substance P is diminished and vasoactive intestinal peptide is augmented in psoriatic lesions and these peptides exert disparate effects on the proliferation of cultured human keratinocytes. J. Invest. Dermatol. avr 1992;98(4):421‑427.

120. Kakurai M, Demitsu T, Umemoto N, Kobayashi Y, Inoue-Narita T, Fujita N, et al. Vasoactive intestinal peptide and inflammatory cytokines enhance vascular endothelial growth factor production from epidermal keratinocytes. Br. J. Dermatol. déc 2009;161(6):1232‑1238.

121. Granoth R, Fridkin M, Gozes I. VIP and the potent analog, stearyl-Nle(17)-VIP, induce proliferation of keratinocytes. FEBS Lett. 16 juin 2000;475(2):78‑83.

122. Wollina U, Huschenbeck J, Knöll B, Sternberg B, Hipler UC. Vasoactive intestinal peptide supports induced migration of human keratinocytes and their colonization of an artificial polyurethane matrix. Regul. Pept. 14 mai 1997;70(1):29‑36.

123. Yang J, Zong CH, Zhao ZH, Hu XD, Shi QD, Xiao XL, et al. Vasoactive intestinal peptide in rats with focal cerebral ischemia enhances angiogenesis. Neuroscience. 30 juin 2009;161(2):413‑421.

124. Collado B, Carmena MJ, Clemente C, Prieto JC, Bajo AM. Vasoactive intestinal peptide enhances growth and angiogenesis of human experimental prostate cancer in a xenograft model. Peptides. sept 2007;28(9):1896‑1901.

125. Yu X-J, Ren X-H, Xu Y-H, Chen L-M, Zhou C-L, Li C-Y. Vasoactive intestinal peptide induces vascular endothelial growth factor production in human HaCaT keratinocytes via MAPK pathway. Neuropeptides. oct 2010;44(5):407‑411.

126. Park YM, Kim CW. The effects of substance P and vasoactive intestinal peptide on interleukin-6 synthesis in cultured human keratinocytes. J. Dermatol. Sci. déc 1999;22(1):17‑23.

127. Rayan GM, Johnson C, Pitha J, Cahill S, Said S. Vasoactive intestinal peptide and nerve growth factor effects on nerve regeneration. J Okla State Med Assoc. août 1995;88(8):337‑341.

128. Björklund H, Dalsgaard CJ, Jonsson CE, Hermansson A. Sensory and autonomic innervation of non-hairy and hairy human skin. An immunohistochemical study. Cell Tissue Res. 1986;243(1):51‑57.

129. Giannetti A, Fantini F, Cimitan A, Pincelli C. Vasoactive intestinal polypeptide and substance P in the pathogenesis of atopic dermatitis. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh). 1992;176:90‑92.

130. Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, et al. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 16 oct 1989;164(1):567‑574.

131. Steinhoff M, McGregor GP, Radleff-Schlimme A, Steinhoff A, Jarry H, Schmidt WE. Identification of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and PACAP type 1 receptor in human skin: expression of PACAP-38 is increased in patients with psoriasis. Regul. Pept. 17 mars 1999;80(1-2):49‑55.

132. Fischer TC, Dinh QT, Peiser C, Löser C, Fischer A, Groneberg DA. Simultaneous detection of receptor mRNA and ligand protein in human skin tissues. J. Cutan. Pathol. févr 2002;29(2):65‑71.

133. Cardell LO, Stjärne P, Wagstaff SJ, Agustí C, Nadel JA. PACAP-induced plasma extravasation in rat skin. Regul. Pept. 15 août 1997;71(2):67‑71.

134. Warren JB, Larkin SW, Coughlan M, Kajekar R, Williams TJ. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is a potent vasodilator and oedema potentiator in rabbit skin in vivo. Br. J. Pharmacol. juin 1992;106(2):331‑334.

135. Seeliger S, Buddenkotte J, Schmidt-Choudhury A, Rosignoli C, Shpacovitch V, Von Arnim U, et al. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: an important vascular regulator in human skin in vivo. Am. J. Pathol. nov 2010;177(5):2563‑2575.

136. Jongsma H, Danielsen N, Sundler F, Kanje M. Alteration of PACAP distribution and PACAP receptor binding in the rat sensory nervous system following sciatic nerve transection. Brain Res. 24 janv 2000;853(2):186‑196.

137. Zhang YZ, Hannibal J, Zhao Q, Moller K, Danielsen N, Fahrenkrug J, et al. Pituitary adenylate cyclase activating peptide expression in the rat dorsal root ganglia: up-regulation after peripheral nerve injury. Neuroscience. oct 1996;74(4):1099‑1110.

138. Lioudyno M, Skoglösa Y, Takei N, Lindholm D. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) protects dorsal root ganglion neurons from death and induces calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in vitro. J. Neurosci. Res. 15 janv 1998;51(2):243‑256.

139. Eedy DJ, Shaw C, Armstrong EP, Johnston CF, Buchanan KD. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and peptide histidine methionine (PHM) in human eccrine sweat glands: demonstration of innervation, specific binding sites and presence in secretions. Br. J. Dermatol. juill 1990;123(1):65‑76.

140. Weihe E, Hartschuh W. Multiple peptides in cutaneous nerves: regulators under physiological conditions and a pathogenetic role in skin disease? Semin Dermatol. déc 1988;7(4):284‑300.

141. Brazeau P. Somatostatin: a peptide with unexpected physiologic activities. Am. J. Med. 22 déc 1986;81(6B):8‑13.

142. Pradayrol L, Jörnvall H, Mutt V, Ribet A. N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. FEBS Lett. 1 janv 1980;109(1):55‑58.

143. Reichlin S. Somatostatin. N. Engl. J. Med. 15 déc 1983;309(24):1495‑1501.

144. Patel YC. Somatostatin and its receptor family. Front Neuroendocrinol. juill 1999;20(3):157‑198.

145. Hagströmer L, Emtestam L, Stridsberg M, Talme T. Expression pattern of somatostatin receptor subtypes 1-5 in human skin: an immunohistochemical study of healthy subjects and patients with psoriasis or atopic dermatitis. Exp. Dermatol. déc 2006;15(12):950‑957.

146. Vockel M, Breitenbach U, Kreienkamp H-J, Brandner JM. Somatostatin regulates tight junction function and composition in human keratinocytes. Exp. Dermatol. oct 2010;19(10):888‑894.

147. Gaudillère A, Misery L, Bernard C, Souchier C, Claudy A, Schmitt D. Presence of somatostatin in normal human epidermis. Br. J. Dermatol. sept 1997;137(3):376‑380.

148. Gaudillère A, Bernard C, Abello J, Schmitt D, Claudy A, Misery L. Human normal dermal fibroblasts express somatostatin receptors. Exp. Dermatol. août 1999;8(4):267‑273.

149. Misery L, Gaudillère A, Claudy A, Schmitt D. Expression of somatostatin on Langerhans cells. Adv. Exp. Med. Biol. 1995;378:109‑110.

150. Vockel M, Pollok S, Breitenbach U, Ridderbusch I, Kreienkamp H-J, Brandner JM. Somatostatin inhibits cell migration and reduces cell counts of human keratinocytes and delays epidermal wound healing in an ex vivo wound model. PLoS ONE. 2011;6(5):e19740.

151. Sicuteri F, Renzi D, Geppetti P. Substance P and enkephalins: a creditable tandem in the pathophysiology of cluster headache and migraine. Adv. Exp. Med. Biol. 1986;198 Pt B:145‑152.

152. Markovics A, Szoke É, Sándor K, Börzsei R, Bagoly T, Kemény Á, et al. Comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of cortistatin-14 and somatostatin-14 in distinct in vitro and in vivo model systems. J. Mol. Neurosci. janv 2012;46(1):40‑50.

153. Szolcsányi J, Helyes Z, Oroszi G, Németh J, Pintér E. Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic

stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. Br. J. Pharmacol. mars 1998;123(5):936‑942.

154. Helyes Z, Szabó A, Németh J, Jakab B, Pintér E, Bánvölgyi A, et al. Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. Arthritis Rheum. mai 2004;50(5):1677‑1685.

155. Pintér E, Helyes Z, Szolcsányi J. Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. Pharmacology & Therapeutics. nov 2006;112(2):440‑456.

156. Helyes Z, Thán M, Oroszi G, Pintér E, Németh J, Kéri G, et al. Anti-nociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogues in the rat. Neurosci. Lett. 14 janv 2000;278(3):185‑188.

157. Karalis K, Mastorakos G, Chrousos GP, Tolis G. Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo. J. Clin. Invest. mai 1994;93(5):2000‑2006.

158. Green PG, Basbaum AI, Levine JD. Sensory neuropeptide interactions in the production of plasma extravasation in the rat. Neuroscience. oct 1992;50(3):745‑749.

159. Payan DG, Hess CA, Goetzl EJ. Inhibition by somatostatin of the proliferation of T-lymphocytes and Molt-4 lymphoblasts. Cell. Immunol. 1 avr 1984;84(2):433‑438.

160. Stanisz AM, Befus D, Bienenstock J. Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. J. Immunol. janv 1986;136(1):152‑156.

161. Bocci G, Culler MD, Fioravanti A, Orlandi P, Fasciani A, Colucci R, et al. In vitro antiangiogenic activity of selective somatostatin subtype-1 receptor agonists. Eur. J. Clin. Invest. sept 2007;37(9):700‑708.

162. García de la Torre N, Wass JAH, Turner HE. Antiangiogenic effects of somatostatin analogues. Clin. Endocrinol. (Oxf). oct 2002;57(4):425‑441.

163. Senapati A, Anand P, McGregor GP, Ghatei MA, Thompson RP, Bloom SR. Depletion of neuropeptides during wound healing in rat skin. Neurosci. Lett. 30 oct 1986;71(1):101‑105.

164. McDonald TJ, Jörnvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, et al. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. Biochem. Biophys. Res. Commun. 12 sept 1979;90(1):227‑233.

165. Battey J, Wada E. Two distinct receptor subtypes for mammalian bombesin-like peptides. Trends Neurosci. déc 1991;14(12):524‑528.

166. Sun Y-G, Chen Z-F. A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. Nature. 9 août 2007;448(7154):700‑703.

167. Panula P, Hadjiconstantinou M, Yang HY, Costa E. Immunohistochemical localization of bombesin/gastrin-releasing peptide and substance P in primary sensory neurons. J. Neurosci. oct 1983;3(10):2021‑2029.

168. Tominaga M, Ogawa H, Takamori K. Histological characterization of cutaneous nerve fibres containing gastrin-releasing peptide in NC/Nga mice: an atopic dermatitis model. J. Invest. Dermatol. déc 2009;129(12):2901‑2905.

169. Staniek V, Misery L, Peguet-Navarro J, Sabido O, Cuber JC, Dezutter-Dambuyant C, et al. Expression of gastrin-releasing peptide receptor in human skin. Acta Derm. Venereol. juill 1996;76(4):282‑286.

170. Andoh T, Kuwazono T, Lee J-B, Kuraishi Y. Gastrin-releasing peptide induces itch-related responses through mast cell degranulation in mice. Peptides. oct 2011;32(10):2098‑2103.

171. Baroni A, Perfetto B, Canozo N, Braca A, Farina E, Melito A, et al. Bombesin: a possible role in wound repair. Peptides. juill 2008;29(7):1157‑1166.

172. Regauer S, Compton CC. Cultured keratinocyte sheets enhance spontaneous re-epithelialization in a dermal explant model of partial-thickness wound healing. J. Invest. Dermatol. sept 1990;95(3):341‑346.

173. Yamaguchi Y, Hosokawa K, Nakatani Y, Sano S, Yoshikawa K, Itami S. Gastrin-releasing peptide, a bombesin-like neuropeptide, promotes cutaneous wound healing. Dermatol Surg. avr 2002;28(4):314‑319.

174. Donelan J, Boucher W, Papadopoulou N, Lytinas M, Papaliodis D, Dobner P, et al. Corticotropin-releasing hormone induces skin vascular permeability through a neurotensin-dependent process. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 16 mai 2006;103(20):7759‑7764.

175. Hartschuh W, Weihe E, Reinecke M. Peptidergic (neurotensin, VIP, substance P) nerve fibres in the skin. Immunohistochemical evidence of an involvement of neuropeptides in nociception, pruritus and inflammation. Br. J. Dermatol. juill 1983;109 Suppl 25:14‑17.

176. Da Silva L, Neves BM, Moura L, Cruz MT, Carvalho E. Neurotensin downregulates the pro-inflammatory properties of skin dendritic cells and increases epidermal growth factor expression. Biochim. Biophys. Acta. oct 2011;1813(10):1863‑1871.

177. Haase I, Czarnetzki BM, Rosenbach T. Thrombin and melittin activate phospholipase C in human HaCaT keratinocytes. Exp. Dermatol. avr 1996;5(2):84‑88.

178. Bauer JW, Lang R, Jakab M, Kofler B. Galanin family of peptides in skin function. Cell. Mol. Life Sci. juin 2008;65(12):1820‑1825.

179. Hökfelt T, Zhang X, Verge V, Villar M, Elde R, Bartfai T, et al. Coexistence and interaction of neuropeptides with substance P in primary sensory neurons, with special reference to galanin. Regul. Pept. 2 juill 1993;46(1-2):76‑80.

180. Kofler B, Berger A, Santic R, Moritz K, Almer D, Tuechler C, et al. Expression of neuropeptide galanin and galanin receptors in human skin. J. Invest. Dermatol. avr 2004;122(4):1050‑1053.

181. Johansson O, Fantini F, Hu H. Neuronal structural proteins, transmitters, transmitter enzymes and neuropeptides in human Meissner's corpuscles: a reappraisal using immunohistochemistry. Arch. Dermatol. Res. août 1999;291(7-8):419‑424.

182. Santic R, Schmidhuber SM, Lang R, Rauch I, Voglas E, Eberhard N, et al. Alarin is a vasoactive peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 12 juin 2007;104(24):10217‑10222.

183. Ji RR, Zhang X, Zhang Q, Dagerlind A, Nilsson S, Wiesenfeld-Hallin Z, et al. Central and peripheral expression of galanin in response to inflammation. Neuroscience. sept 1995;68(2):563‑576.

184. Dallos A, Kiss M, Polyánka H, Dobozy A, Kemény L, Husz S. Galanin receptor expression in cultured human keratinocytes and in normal human skin. J. Peripher. Nerv. Syst. juin 2006;11(2):156‑164.

185. Hökfelt T, Wiesenfeld-Hallin Z, Villar M, Melander T. Increase of galanin-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglion cells after peripheral axotomy. Neurosci. Lett. 29 déc 1987;83(3):217‑220.

186. Hökfelt T, Zhang X, Wiesenfeld-Hallin Z. Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. Trends Neurosci. janv 1994;17(1):22‑30.

187. Holmes FE, Mahoney S-A, Wynick D. Use of genetically engineered transgenic mice to investigate the role of galanin in the peripheral nervous system after injury. Neuropeptides. juin 2005;39(3):191‑199.

188. Henson BS, Neubig RR, Jang I, Ogawa T, Zhang Z, Carey TE, et al. Galanin receptor 1 has anti-proliferative effects in oral squamous cell carcinoma. J. Biol. Chem. 17 juin 2005;280(24):22564‑22571.

189. Trejter M, Brelinska R, Warchol JB, Butowska W, Neri G, Rebuffat P, et al. Effects of galanin on proliferation and apoptosis of immature rat thymocytes. Int. J. Mol. Med. août 2002;10(2):183‑186.

190. Jimenez-Andrade JM, Zhou S, Du J, Yamani A, Grady JJ, Castañeda-Hernandez G, et al. Pro-nociceptive role of peripheral galanin in inflammatory pain. Pain. juill 2004;110(1-2):10‑21.

191. Jimenez-Andrade JM, Zhou S, Yamani A, Valencia de Ita S, Castañeda-Hernandez G, Carlton SM. Mechanism by which peripheral galanin increases acute inflammatory pain. Brain Res. 21 sept 2005;1056(2):113‑117.

192. Schmidhuber SM, Santic R, Tam CW, Bauer JW, Kofler B, Brain SD. Galanin-like peptides exert potent vasoactive functions in vivo. J. Invest. Dermatol. mars 2007;127(3):716‑721.

193. Sántha P, Pierau FK, Jancsó G. Evidence for an inhibition by endogenous galanin of neurogenic cutaneous vasodilatation in the pigeon. Neurosci. Lett. 27 févr 1998;243(1-3):101-104.

194. Sántha P, Pierau FK, Jancsó G. Galanin mediated inhibitory nervous modulation of cutaneous vascular reactions. Acta Physiol Hung. 1999;86(3-4):279-285.

195. Chao MV, Bothwell MA, Ross AH, Koprowski H, Lanahan AA, Buck CR, et al. Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. Science. 25 avr 1986;232(4749):518-521.

196. Dechant G. Molecular interactions between neurotrophin receptors. Cell Tissue Res. août 2001;305(2):229-238.

197. Vos P, Stark F, Pittman RN. Merkel cells in vitro: production of nerve growth factor and selective interactions with sensory neurons. Dev. Biol. avr 1991;144(2):281-300.

198. Hattori A, Iwasaki S, Murase K, Tsujimoto M, Sato M, Hayashi K, et al. Tumor necrosis factor is markedly synergistic with interleukin 1 and interferon-gamma in stimulating the production of nerve growth factor in fibroblasts. FEBS Lett. 7 mars 1994;340(3):177-180.

199. Bull HA, Leslie TA, Chopra S, Dowd PM. Expression of nerve growth factor receptors in cutaneous inflammation. Br. J. Dermatol. nov 1998;139(5):776-783.

200. Shibayama E, Koizumi H. Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. Am. J. Pathol. juin 1996;148(6):1807-1818.

201. Welker P, Grabbe J, Grützkau A, Henz BM. Effects of nerve growth factor (NGF) and other fibroblast-derived growth factors on immature human mast cells (HMC-1). Immunology. juill 1998;94(3):310-317.

202. Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP, Weltman H, Farber EM. Effect of nerve growth factor on endothelial cell biology: proliferation and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. Arch. Dermatol. Res. juin 2001;293(6):291-295.

203. Marconi A, Terracina M, Fila C, Franchi J, Bonté F, Romagnoli G, et al. Expression and function of neurotrophins and their receptors in cultured human keratinocytes. J. Invest. Dermatol. déc 2003;121(6):1515-1521.

204. Marconi A, Panza MC, Bonnet-Duquennoy M, Lazou K, Kurfurst R, Truzzi F, et al. Expression and function of neurotrophins and their receptors in human melanocytes. Int J Cosmet Sci. août 2006;28(4):255-261.

205. Palazzo E, Marconi A, Truzzi F, Dallaglio K, Petrachi T, Humbert P, et al. Role of neurotrophins on dermal fibroblast survival and differentiation. J. Cell. Physiol. mars 2012;227(3):1017-1025.

206. Rice FL, Albers KM, Davis BM, Silos-Santiago I, Wilkinson GA, LeMaster AM, et al. Differential dependency of unmyelinated and A delta epidermal and upper dermal innervation on neurotrophins, trk receptors, and p75LNGFR. Dev. Biol. 1 juin 1998;198(1):57-81.

207. Davies AM, Bandtlow C, Heumann R, Korsching S, Rohrer H, Thoenen H. Timing and site of nerve growth factor synthesis in developing skin in relation to innervation and expression of the receptor. Nature. 26 avr 1987;326(6111):353-358.

208. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. Science. 4 sept 1987;237(4819):1154-1162.

209. Tron VA, Coughlin MD, Jang DE, Stanisz J, Sauder DN. Expression and modulation of nerve growth factor in murine keratinocytes (PAM 212). J. Clin. Invest. avr 1990;85(4):1085-1089.

210. Pincelli C, Sevignani C, Manfredini R, Grande A, Fantini F, Bracci-Laudiero L, et al. Expression and function of nerve growth factor and nerve growth factor receptor on cultured keratinocytes. J. Invest. Dermatol. juill 1994;103(1):13-18.

211. Hattori A, Hayashi K, Kohno M. Tumor necrosis factor (TNF) stimulates the production of nerve growth factor in fibroblasts via the 55-kDa type 1 TNF receptor. FEBS Lett. 29 janv 1996;379(2):157-160.

212. Kawamoto K, Matsuda H. Nerve growth factor and wound healing. Prog. Brain Res. 2004;146:369-384.

213. Hasan W, Zhang R, Liu M, Warn JD, Smith PG. Coordinate expression of NGF and alpha-smooth muscle actin mRNA and protein in cutaneous wound tissue of developing and adult rats. Cell Tissue Res. avr 2000;300(1):97-109.

214. Lee KF, Li E, Huber LJ, Landis SC, Sharpe AH, Chao MV, et al. Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. Cell. 29 mai 1992;69(5):737-749.

215. Nithya M, Suguna L, Rose C. The effect of nerve growth factor on the early responses during the process of wound healing. Biochim. Biophys. Acta. 17 mars 2003;1620(1-3):25-31.

216. Li AK, Koroly MJ, Schattenkerk ME, Malt RA, Young M. Nerve growth factor: acceleration of the rate of wound healing in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. juill 1980;77(7):4379-4381.

217. Di Marco E, Mathor M, Bondanza S, Cutuli N, Marchisio PC, Cancedda R, et al. Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop. J. Biol. Chem. 25 oct 1993;268(30):22838-22846.

218. Pincelli C, Marconi A. Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes. J. Dermatol. Sci. févr 2000;22(2):71-79.

219. Shi C-M, Qu J-F, Cheng T-M. Effects of the nerve growth factor on the survival and wound healing in mice with combined radiation and wound injury. J. Radiat. Res. sept 2003;44(3):223-228.

220. Micera A, Vigneti E, Pickholtz D, Reich R, Pappo O, Bonini S, et al. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 22 mai 2001;98(11):6162-6167.

221. Micera A, Lambiase A, Stampachiacchiere B, Sgrulletta R, Normando EM, Bonini S, et al. Nerve growth factor has a modulatory role on human primary fibroblast cultures derived from vernal keratoconjunctivitis-affected conjunctiva. Mol. Vis. 2007;13:981-987.

222. Lewin GR, Mendell LM. Nerve growth factor and nociception. Trends Neurosci. sept 1993;16(9):353-359.

223. Matsuda H, Koyama H, Sato H, Sawada J, Itakura A, Tanaka A, et al. Role of nerve growth factor in cutaneous wound healing: accelerating effects in normal and healing-impaired diabetic mice. J. Exp. Med. 2 févr 1998;187(3):297-306.

224. Kashiba H, Ueda Y, Senba E. Coexpression of preprotachykinin-A, alpha-calcitonin gene-related peptide, somatostatin, and neurotrophin receptor family messenger RNAs in rat dorsal root ganglion neurons. Neuroscience. janv 1996;70(1):179-189.

225. Schmidt Y, Unger JW, Bartke I, Reiter R. Effect of nerve growth factor on peptide neurons in dorsal root ganglia after taxol or cisplatin treatment and in diabetic (db/db) mice. Exp. Neurol. mars 1995;132(1):16-23.

226. Park KA, Fehrenbacher JC, Thompson EL, Duarte DB, Hingtgen CM, Vasko MR. Signaling pathways that mediate nerve growth factor-induced increase in expression and release of calcitonin gene-related peptide from sensory neurons. Neuroscience. 15 déc 2010;171(3):910-923.

227. Lambiase A, Manni L, Rama P, Bonini S. Clinical application of nerve growth factor on human corneal ulcer. Arch Ital Biol. mars 2003;141(2-3):141-148.

228. Aloe L, Tirassa P, Lambiase A. The topical application of nerve growth factor as a pharmacological tool for human corneal and skin ulcers. Pharmacol. Res. avr 2008;57(4):253-258.

229. Sun W, Lin H, Chen B, Zhao W, Zhao Y, Xiao Z, et al. Collagen scaffolds loaded with collagen-binding NGF-beta accelerate ulcer healing. J Biomed Mater Res A. 1 mars 2010;92(3):887-895.

230. Terenghi G, Mann D, Kopelman PG, Anand P. trkA and trkC expression is increased in human diabetic skin. Neurosci. Lett. 30 mai 1997;228(1):33-36.

231. Botchkarev VA, Botchkarev NV, Albers KM, Van der Veen C, Lewin GR, Paus R. Neurotrophin-3 involvement in the regulation of hair follicle morphogenesis. J. Invest. Dermatol. août 1998;111(2):279-285.

232. Grewe M, Vogelsang K, Ruzicka T, Stege H, Krutmann J. Neurotrophin-4 production by human epidermal keratinocytes: increased expression in atopic dermatitis. J. Invest. Dermatol. juin 2000;114(6):1108-1112.

233. Beggs S, Alvares D, Moss A, Currie G, Middleton J, Salter MW, et al. A role for NT-3 in the hyperinnervation of neonatally wounded skin. Pain [Internet]. 4 août 2012 [cité 28 août 2012]; Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22871470

234. Cartwright M, Mikheev AM, Heinrich G. Expression of neurotrophin genes in human fibroblasts: differential regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. Int. J. Dev. Neurosci. déc 1994;12(8):685-693.

235. Yaar M, Eller MS, DiBenedetto P, Reenstra WR, Zhai S, McQuaid T, et al. The trk family of receptors mediates nerve growth factor and neurotrophin-3 effects in melanocytes. J. Clin. Invest. oct 1994;94(4):1550-1562.

236. Sterne GD, Coulton GR, Brown RA, Green CJ, Terenghi G. Neurotrophin-3-enhanced nerve regeneration selectively improves recovery of muscle fibres expressing myosin heavy chains 2b. J. Cell Biol. 3 nov 1997;139(3):709-715.

237. Sterne GD, Brown RA, Green CJ, Terenghi G. Neurotrophin-3 delivered locally via fibronectin mats enhances peripheral nerve regeneration. Eur. J. Neurosci. juill 1997;9(7):1388-1396.

238. Botchkarev VA, Metz M, Botchkareva NV, Welker P, Lommatzsch M, Renz H, et al. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 act as « epitheliotrophins » in murine skin. Lab. Invest. mai 1999;79(5):557-572.

239. Engelhart K, El Hindi T, Biesalski H-K, Pfitzner I. In vitro reproduction of clinical hallmarks of eczematous dermatitis in organotypic skin models. Arch. Dermatol. Res. juill 2005;297(1):1-9.

240. Kanda N, Koike S, Watanabe S. Prostaglandin E2 enhances neurotrophin-4 production via EP3 receptor in human keratinocytes. J. Pharmacol. Exp. Ther. nov 2005;315(2):796-804.

241. Truzzi F, Marconi A, Atzei P, Panza MC, Lotti R, Dallaglio K, et al. p75 neurotrophin receptor mediates apoptosis in transit-amplifying cells and its overexpression restores cell death in psoriatic keratinocytes. Cell Death Differ. juin 2011;18(6):948-958.

242. Kryl D, Barker PA. TTIP is a novel protein that interacts with the truncated T1 TrkB neurotrophin receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 29 déc 2000;279(3):925-930.

243. Raap U, Goltz C, Deneka N, Bruder M, Renz H, Kapp A, et al. Brain-derived neurotrophic factor is increased in atopic dermatitis and modulates eosinophil functions compared with that seen in nonatopic subjects. J. Allergy Clin. Immunol. juin 2005;115(6):1268-1275.

244. Matsuda S, Fujita T, Kajiya M, Takeda K, Shiba H, Kawaguchi H, et al. Brain-derived neurotrophic factor induces migration of endothelial cells through a TrkB-ERK-integrin αVβ3-FAK cascade. J. Cell. Physiol. mai 2012;227(5):2123-2129.

245. Sun C, Hu Y, Chu Z, Huang J, Zhang L. The effect of brain-derived neurotrophic factor on angiogenesis. J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. avr 2009;29(2):139-143.

246. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. N. Engl. J. Med. 18 mai 1995;332(20):1351-1362.

247. Karalis K, Sano H, Redwine J, Listwak S, Wilder RL, Chrousos GP. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. Science. 18 oct 1991;254(5030):421-423.

248. Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A, Zbytek B, Linton EA, Mazurkiewicz JE, et al. Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. FASEB J. août 2001;15(10):1678-1693.

249. Slominski A, Pisarchik A, Tobin DJ, Mazurkiewicz JE, Wortsman J. Differential expression of a cutaneous corticotropin-releasing hormone system. Endocrinology. févr 2004;145(2):941-950.

250. Cao J, Cetrulo CL, Theoharides TC. Corticotropin-releasing hormone induces vascular endothelial growth factor release from human mast cells via the cAMP/protein kinase A/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. Mol. Pharmacol. mars 2006;69(3):998-1006.

251. Zbytek B, Pfeffer LM, Slominski AT. Corticotropin-releasing hormone inhibits nuclear factor-kappaB pathway in human HaCaT keratinocytes. J. Invest. Dermatol. déc 2003;121(6):1496-1499.

252. Zbytek B, Mysliwski A, Slominski A, Wortsman J, Wei ET, Mysliwska J. Corticotropin-releasing hormone affects cytokine production in human HaCaT keratinocytes. Life Sci. 18 janv 2002;70(9):1013-1021.

253. Itoi K, Jiang Y-Q, Iwasaki Y, Watson SJ. Regulatory mechanisms of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the hypothalamus. J. Neuroendocrinol. avr 2004;16(4):348-355.

254. Slominski A, Zbytek B, Semak I, Sweatman T, Wortsman J. CRH stimulates POMC activity and corticosterone production in dermal fibroblasts. J. Neuroimmunol. mai 2005;162(1-2):97-102.

255. Ganceviciene R, Graziene V, Fimmel S, Zouboulis CC. Involvement of the corticotropin-releasing hormone system in the pathogenesis of acne vulgaris. Br. J. Dermatol. févr 2009;160(2):345-352.

256. Zbytek B, Slominski AT. Corticotropin-releasing hormone induces keratinocyte differentiation in the adult human epidermis. J. Cell. Physiol. avr 2005;203(1):118-126.

257. Slominski A, Wortsman J, Luger T, Paus R, Solomon S. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. Physiol. Rev. juill 2000;80(3):979-1020.

258. Arck PC, Slominski A, Theoharides TC, Peters EMJ, Paus R. Neuroimmunology of stress: skin takes center stage. J. Invest. Dermatol. août 2006;126(8):1697-1704.

259. Rassouli O, Liapakis G, Lazaridis I, Sakellaris G, Gkountelias K, Gravanis A, et al. A novel role of peripheral corticotropin-releasing hormone (CRH) on dermal fibroblasts. PLoS ONE. 2011;6(7):e21654.

260. Slominski A, Zbytek B, Szczesniewski A, Wortsman J. Cultured human dermal fibroblasts do produce cortisol. J. Invest. Dermatol. mai 2006;126(5):1177-1178.

261. Luger TA, Scholzen T, Grabbe S. The role of alpha-melanocyte-stimulating hormone in cutaneous biology. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. août 1997;2(1):87-93.

262. Thody AJ, Ridley K, Penny RJ, Chalmers R, Fisher C, Shuster S. MSH peptides are present in mammalian skin. Peptides. déc 1983;4(6):813-816.

263. Wakamatsu K, Graham A, Cook D, Thody AJ. Characterisation of ACTH peptides in human skin and their activation of the melanocortin-1 receptor. Pigment Cell Res. oct 1997;10(5):288-297.

264. Tsatmali M, Ancans J, Yukitake J, Thody AJ. Skin POMC peptides: their actions at the human MC-1 receptor and roles in the tanning response. Pigment Cell Res. 2000;13 Suppl 8:125-129.

265. Mountjoy KG. The human melanocyte stimulating hormone receptor has evolved to become « super-sensitive » to melanocortin peptides. Mol. Cell. Endocrinol. juin 1994;102(1-2):R7-11.

266. Rousseau K, Kauser S, Pritchard LE, Warhurst A, Oliver RL, Slominski A, et al. Proopiomelanocortin (POMC), the ACTH/melanocortin precursor, is secreted by human epidermal keratinocytes and melanocytes and stimulates melanogenesis. FASEB J. juin 2007;21(8):1844-1856.

267. Matsumoto K, Robb E, Warden G, Nordlund J. Hyperpigmentation of human skin grafted on to athymic nude mice: immunohistochemical study. Br. J. Dermatol. sept 1996;135(3):412-418.

268. Apkarian RP, Curtis JC. Hormonal regulation of capillary fenestrae in the rat adrenal cortex: quantitative studies using objective lens staging scanning electron microscopy. Scan Electron Microsc. 1986;(Pt 4):1381-1393.

269. Gaillard I, Keramidas M, Liakos P, Vilgrain I, Feige JJ, Vittet D. ACTH-regulated expression of vascular endothelial growth factor in the adult bovine adrenal cortex: a possible role in the maintenance of the microvasculature. J. Cell. Physiol. nov 2000;185(2):226-234.

270. Mallet C, Feraud O, Ouengue-Mbele G, Gaillard I, Sappay N, Vittet D, et al. Differential expression of VEGF receptors in adrenal atrophy induced by dexamethasone: a protective role of ACTH. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. janv 2003;284(1):E156-167.

271. Muffley LA, Zhu KQ, Engrav LH, Gibran NS, Hocking AM. Spatial and temporal localization of the melanocortin 1 receptor and its ligand α-melanocyte-stimulating hormone during cutaneous wound repair. J. Histochem. Cytochem. mars 2011;59(3):278-288.

272. Luger TA, Brzoska T, Scholzen TE, Kalden DH, Sunderkötter C, Armstrong C, et al. The role of alpha-MSH as a modulator of cutaneous inflammation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2000;917:232-238.

273. Böhm M, Schulte U, Kalden H, Luger TA. Alpha-melanocyte-stimulating hormone modulates activation of NF-kappa B and AP-1 and secretion of interleukin-8 in human dermal fibroblasts. Ann. N. Y. Acad. Sci. 20 oct 1999;885:277-286.

274. Hartmeyer M, Scholzen T, Becher E, Bhardwaj RS, Schwarz T, Luger TA. Human dermal microvascular endothelial cells express the melanocortin receptor type 1 and produce increased levels of IL-8 upon stimulation with alpha-melanocyte-stimulating hormone. J. Immunol. 15 août 1997;159(4):1930-1937.

275. Dunlevy JR, Couchman JR. Interleukin-8 induces motile behavior and loss of focal adhesions in primary fibroblasts. J. Cell. Sci. janv 1995;108 (Pt 1):311-321.

276. Böhm M, Wolff I, Scholzen TE, Robinson SJ, Healy E, Luger TA, et al. alpha-Melanocyte-stimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. J. Biol. Chem. 18 févr 2005;280(7):5795-5802.

277. Hill RP, Wheeler P, MacNeil S, Haycock JW. Alpha-melanocyte stimulating hormone cytoprotective biology in human dermal fibroblast cells. Peptides. juill 2005;26(7):1150-1158.

278. Cheng B, Liu H, Fu X, Sheng Z, Qiu J, Cao R. [Expression of beta-endorphin and micro-opioid receptor during wound healing process in rat with deep partial-thickness scald]. Zhonghua Shao Shang Za Zhi. févr 2007;23(1):36-39.

279. Wintzen M, Gilchrest BA. Proopiomelanocortin, its derived peptides, and the skin. J. Invest. Dermatol. janv 1996;106(1):3-10.

280. Zanello SB, Jackson DM, Holick MF. An immunocytochemical approach to the study of beta-endorphin production in human keratinocytes using confocal microscopy. Ann. N. Y. Acad. Sci. 20 oct 1999;885:85-99.

281. Slominski A, Paus R, Mazurkiewicz J. Proopiomelanocortin expression in the skin during induced hair growth in mice. Experientia. 15 janv 1992;48(1):50-54.

282. Farooqui JZ, Medrano EE, Abdel-Malek Z, Nordlund J. The expression of proopiomelanocortin and various POMC-derived peptides in mouse and human skin. Ann. N. Y. Acad. Sci. 31 mai 1993;680:508-510.

283. Skobowiat C, Dowdy JC, Sayre RM, Tuckey RC, Slominski A. Cutaneous hypothalamic-pituitary-adrenal axis homolog: regulation by ultraviolet radiation. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. sept 2011;301(3):E484-493.

284. Wintzen M, Ostijn DM, Polderman MC, Le Cessie S, Burbach JP, Vermeer BJ. Total body exposure to ultraviolet radiation does not influence plasma levels of immunoreactive beta-endorphin in man. Photodermatol Photoimmunol Photomed. déc 2001;17(6):256-260.

285. Bigliardi-Qi M, Bigliardi PL, Eberle AN, Büchner S, Rufli T. beta-endorphin stimulates cytokeratin 16 expression and downregulates mu-opiate receptor expression in human epidermis. J. Invest. Dermatol. mars 2000;114(3):527-532.

286. Bigliardi PL, Sumanovski LT, Büchner S, Rufli T, Bigliardi-Qi M. Different expression of mu-opiate receptor in chronic and acute wounds and the effect of beta-endorphin on transforming growth factor beta type II receptor and cytokeratin 16 expression. J. Invest. Dermatol. janv 2003;120(1):145-152.

287. Gold LI, Sung JJ, Siebert JW, Longaker MT. Type I (RI) and type II (RII) receptors for transforming growth factor-beta isoforms are expressed subsequent to transforming growth factor-beta ligands during excisional wound repair. Am. J. Pathol. janv 1997;150(1):209-222.

288. Bigliardi PL, Büchner S, Rufli T, Bigliardi-Qi M. Specific stimulation of migration of human keratinocytes by mu-opiate receptor agonists. J. Recept. Signal Transduct. Res. nov 2002;22(1-4):191-199.

289. Christian LM, Graham JE, Padgett DA, Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress and wound healing. Neuroimmunomodulation. 2006;13(5-6):337-346.

290. Ebrecht M, Hextall J, Kirtley L-G, Taylor A, Dyson M, Weinman J. Perceived stress and cortisol levels predict speed of wound healing in healthy male adults. Psychoneuroendocrinology. juill 2004;29(6):798-809.

291. Altemus M, Rao B, Dhabhar FS, Ding W, Granstein RD. Stress-induced changes in skin barrier function in healthy women. J. Invest. Dermatol. août 2001;117(2):309-317.

292. Detillion CE, Craft TKS, Glasper ER, Prendergast BJ, DeVries AC. Social facilitation of wound healing. Psychoneuroendocrinology. sept 2004;29(8):1004-1011.

293. Hübner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fässler R, Werner S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. Cytokine. juill 1996;8(7):548-556.

294. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK, Marucha PT, MacCallum RC, Laskowski BF, Malarkey WB. Stress-related changes in proinflammatory cytokine production in wounds. Arch. Gen. Psychiatry. mai 1999;56(5):450-456.

295. Alberti LR, Vasconcellos L de S, Petroianu A. Influence of local or systemic corticosteroids on skin wound healing resistance. Acta Cir Bras. avr 2012;27(4):295-299.

296. Pratsinis H, Dimozi A, Pilichos K, Tsagarakis S, Yiacoumettis AM, Kletsas D. Previous chronic exogenous glucocorticoid administration in vivo does not affect functional characteristics and cellular lifespan of human skin fibroblasts in vitro. Exp. Dermatol. juin 2011;20(6):529-531.

297. Slominski A, Wortsman J, Tuckey RC, Paus R. Differential expression of HPA axis homolog in the skin. Mol. Cell. Endocrinol. févr 2007;265-266:143-149.

298. Slominski A, Ermak G, Hwang J, Chakraborty A, Mazurkiewicz JE, Mihm M. Proopiomelanocortin, corticotropin releasing hormone and corticotropin releasing hormone receptor genes are expressed in human skin. FEBS Lett. 23 oct 1995;374(1):113-116.

299. Cirillo N, Prime SS. Keratinocytes synthesize and activate cortisol. J. Cell. Biochem. juin 2011;112(6):1499-1505.

300. Terao M, Murota H, Kimura A, Kato A, Ishikawa A, Igawa K, et al. 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase-1 is a novel regulator of skin homeostasis and a candidate target for promoting tissue repair. PLoS ONE. 2011;6(9):e25039.

301. Albiston AL, Obeyesekere VR, Smith RE, Krozowski ZS. Cloning and tissue distribution of the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. Mol. Cell. Endocrinol. nov 1994;105(2):R11-17.

302. Vukelic S, Stojadinovic O, Pastar I, Rabach M, Krzyzanowska A, Lebrun E, et al. Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury. J. Biol. Chem. 25 mars 2011;286(12):10265-10275.

303. Hannen RF, Michael AE, Jaulim A, Bhogal R, Burrin JM, Philpott MP. Steroid synthesis by primary human keratinocytes; implications for skin disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 7 janv 2011;404(1):62-67.

304. Foitzik K, Langan EA, Paus R. Prolactin and the skin: a dermatological perspective on an ancient pleiotropic peptide hormone. J. Invest. Dermatol. mai 2009;129(5):1071-1087.

305. Richards RG, Hartman SM. Human dermal fibroblast cells express prolactin in vitro. J. Invest. Dermatol. juin 1996;106(6):1250-1255.

306. Merkle CJ, Schuler LA, Schaeffer RC Jr, Gribbon JM, Montgomery DW. Structural and functional effects of high prolactin levels on injured endothelial cells: evidence for an endothelial prolactin receptor. Endocrine. août 2000;13(1):37-46.

307. Clapp C, Aranda J, González C, Jeziorski MC, Martínez de la Escalera G. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. Trends Endocrinol. Metab. oct 2006;17(8):301-307.

308. Brizio-Molteni L, Molteni A, Warpeha RL, Angelats J, Lewis N, Fors EM. Prolactin, corticotropin, and gonadotropin concentrations following thermal injury in adults. J Trauma. janv 1984;24(1):1-7.

309. Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM. Endogenous opioids: biology and function. Annu. Rev. Neurosci. 1984;7:223-255.

310. Slominski AT, Zmijewski MA, Zbytek B, Brozyna AA, Granese J, Pisarchik A, et al. Regulated proenkephalin expression in human skin and cultured skin cells. J. Invest. Dermatol. mars 2011;131(3):613-622.

311. Zagon IS, Verderame MF, Allen SS, McLaughlin PJ. Cloning, sequencing, expression and function of a cDNA encoding a receptor for the opioid growth factor, [Met(5)]enkephalin. Brain Res. 4 déc 1999;849(1-2):147-154.

312. Zagon IS, Wu Y, McLaughlin PJ. The opioid growth factor, [Met5]-enkephalin, and the zeta opioid receptor are present in human and mouse skin and tonically act to inhibit DNA synthesis in the epidermis. J. Invest. Dermatol. mars 1996;106(3):490-497.

313. Wilson RP, McLaughlin PJ, Lang CM, Zagon IS. The opioid growth factor, [Met5]-enkephalin, inhibits DNA synthesis during recornification of mouse tail skin. Cell Prolif. avr 2000;33(2):63-73.

314. Bigliardi-Qi M, Gaveriaux-Ruff C, Zhou H, Hell C, Bady P, Rufli T, et al. Deletion of delta-opioid receptor in mice alters skin differentiation and delays wound healing. Differentiation. avr 2006;74(4):174-185.

315. Nissen JB, Kragballe K. Enkephalins modulate differentiation of normal human keratinocytes in vitro. Exp. Dermatol. oct 1997;6(5):222-229.

316. Zagon IS, Sassani JW, McLaughlin PJ. Reepithelialization of the human cornea is regulated by endogenous opioids. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. janv 2000;41(1):73-81.

317. McLaughlin PJ, Keiper CL, Verderame MF, Zagon IS. Targeted overexpression of OGFr in epithelium of transgenic mice suppresses cell proliferation and impairs full-thickness wound closure. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. mai 2012;302(9):R1084-1090.

318. Shekhter AB, Solov'eva AI, Spevak SE, Titov MI. [Effects of opioid peptide dalargin on reparative processes in wound healing]. Biull Eksp Biol Med. oct 1988;106(10):487-490.

319. Kohl A, Werner A, Buntrock P, Diezel W, Adrian K, Titov MI. [The effect of the peptide dalargin on wound healing]. Dermatol Monatsschr. 1989;175(9):561-572.

320. Vinogradov VA, Spevak SE, Larygin KN, Korobov NV, Solov'eva AI. [Opioid activity of peptides and wound healing of the skin]. Biull Eksp Biol Med. juill 1987;104(7):89-91.

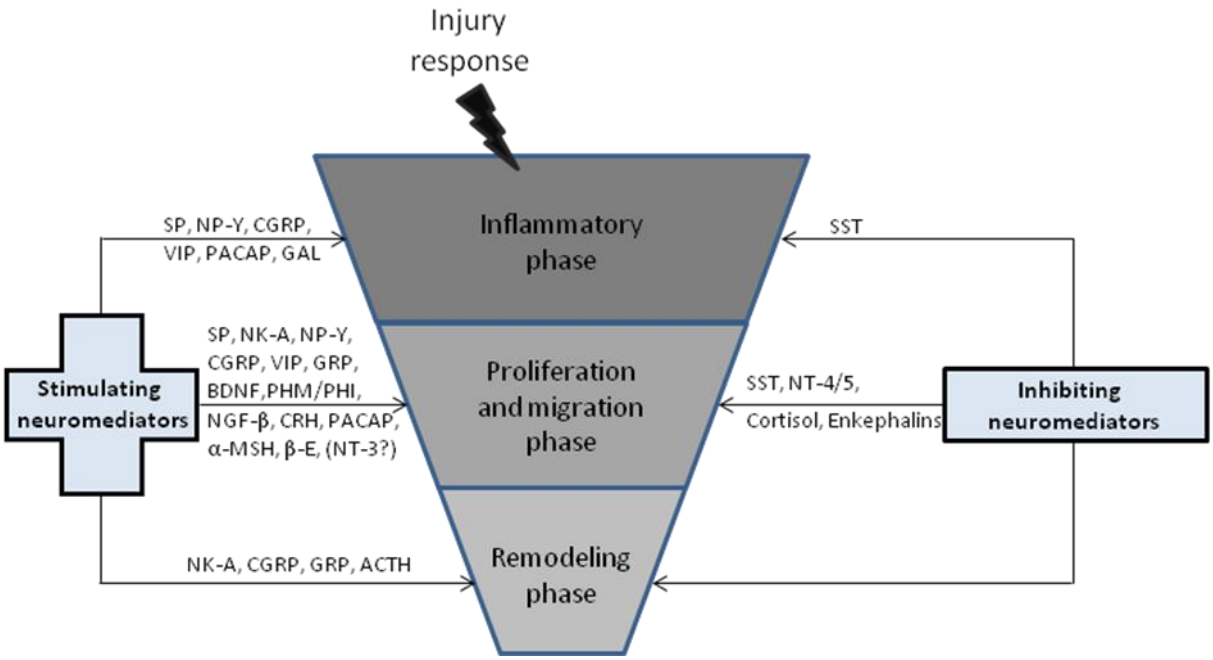


Figure 1. A schematic diagram of the effects of the different neuropeptides, neurohormones and neurotrophins released in the skin during the cutaneous wound healing process. After injury, lots of neuromediators are released in the skin both by neuronal and non-neuronal cells. Many of them act as stimulators of the successive steps of the wound healing. However, there is also a negative feedback, which is provided by few but very effective molecules as SST, Cortisol, enkephalins and NT-4/5.

Chapitre III. Objectifs du travail

L'objectif de la thèse, dans la continuité des travaux réalisés au laboratoire, a été d'étudier les effets du système nerveux périphérique sur la cicatrisation cutanée. Pour cela, nous avons dans un premier temps :

- étudié l'effet des neurones sensoriels sur la cicatrisation cutanée (phases de prolifération et formation du tissu de granulation) dans un modèle tridimensionnel de culture d'explant de peau humaine lésée,

- Puis nous avons étudié plus précisemment l'effet du NGF et de trois neuropeptides (VIP, SP et CGRP) sur ces étapes de la cicatrisation.

Nous avons utilisé des explants cutanés que nous avons lésés en leur centre pour étudier les mécanismes de cicatrisation. Nous avons tout d'abord mis ces explants en culture avec des GRDs issus de rats nouveau-nés puis dosé les neuropeptides sécrétés dans les surnageants de culture. Dans un second temps, nous avons incubé ces explants lésés avec les différents neuropeptides dosés précédemment (SP, CGRP et VIP) ainsi qu'avec le NGF à différentes doses pour étudier leurs effets sur le processus de cicatrisation pendant 3, 7 et 10 jours de culture. Nous avons ensuite analysé leurs effets sur la prolifération des kératinocytes mais également des fibrolastes (ainsi que leur différenciation myofibrobalstique), le ratio entre les collagène I et III ainsi que l'activité des métalloprotéases matricielles -2 et -9 par des techniques immunochimiques, histologiques, biochimiques et biomoléculaires.

MATERIEL

ET

METHODES

Chapitre IV. Matériel et méthodes

A. Culture primaire tissulaire et cellulaire

Toutes les manipulations ont été effectuées stérilement sous une hotte à flux laminaire vertical. Tous les milieux de culture étaient supplémentés en Normocin (Cayla, ANT-NR2). La culture des cellules et des tissus était réalisée à 37°C dans une étuve saturée en humidité dans une atmosphère contenant 5 % de CO_2. Les numérations des cellules et l'évaluation de la mortalité ont été réalisées à l'aide d'un hématimètre de Malassez et du bleu trypan.

1. Préparation des tissus et des cellules

1.1 Les explants de peau humaine

1.1.1 Lieu d'obtention et suivi

Tous les prélèvements de peau utilisés lors de ce travail provenaient du service de chirurgie plastique, reconstructrice et réparatrice du Docteur Stanislas Valentin à la clinique Pasteur à Brest. Un protocole de traitement et de suivi des échantillons a été mis en place conjointement avec son service de chirurgie (tableau). Les échantillons étaient prélevés en conditions d'asepsie puis placés à 4°C dans de la gaze humidifiée par du liquide physiologique et amenés au lieu de traitement dans l'heure.

Age du patient :	Sexe du patient :	Surface de l'echantillon :	
Remarques/Observations éventuelles :		Origine de l'echantillon :	
		☐ Facial	☐ Autre :
		☐ Abdominal	…
		☐ Mammaire	
Numero d'échantillon :		Date :	
- Conservation : l'echantillon de peau peut être placé dans de la gaze humidifiée par du serum physiologique et conservé à 4°C.			
- Contact : LEBONVALLET Nicolas au			

Tableau 3. Champs à remplir pour le traitement et le suivi des échantillons de peau prélevés à la clinique et utilisés dans notre laboratoire.

1.1.2 Analyse de l’expression de la neuroserpine (NSP) dans la peau humaine

Afin de travailler en conditions stériles, la surface des prélèvements était nettoyée côté épiderme par des jets d'alcool rapide à 95°. L'alcool était immédiatement rincé par un écoulement de DPBS stérile (Lonza). Les prélèvements étaient dégraissés grossièrement dans un premier temps à l’aide d’un ciseau, puis plus finement à l’aide d’un scalpel. Ils étaient ensuite plongés dans une suite de bains d'alcool et de DPBS (1 bain d'alcool 70, puis 95°, 3 bains de DPBS). Les échantillons de peau étaient réalisés grâce à un emporte pièce de 6 mm de diamètre. Ils étaient fixés pendant 15 minutes dans un bain de Paraformaldéhyde à 4% (PAF 4%), déposés sur du Tissue-tecK®O.C.T. (Tissu-tech) et congelés dans de l'isopentane refroidi à l'aide d'azote liquide. Ils étaient conservés dans un surgélateur à -80°C.

Au total, 10 patients différents ont été utilisés.

1.1.3. Traitement avant la culture et création de la lésion cutanée

Selon la taille de la peau, elle était découpée en morceaux plus petits afin de pouvoir effectuer les bains d’alcool comme décrit précédemment.

Pour tous les prélèvements la lésion était créée à partir du modèle décrit par Kratz G en 1998 (Kratz G, 1998). Une lésion était réalisée à l’aide d'un emporte pièce à biopsie de 3 mm de diamètre sur quelques millimètres d’épaisseur, puis les explants de peau ainsi lésés, étaient coupés à l'aide d’un second emporte pièce de 6 mm de diamètre pour l’ensemble des manipulations (Figure 19). L'épaisseur des explants était ensuite adaptée à l'aide de petits ciseaux afin d'obtenir une épaisseur d'environ 1mm (à l’œil nu).

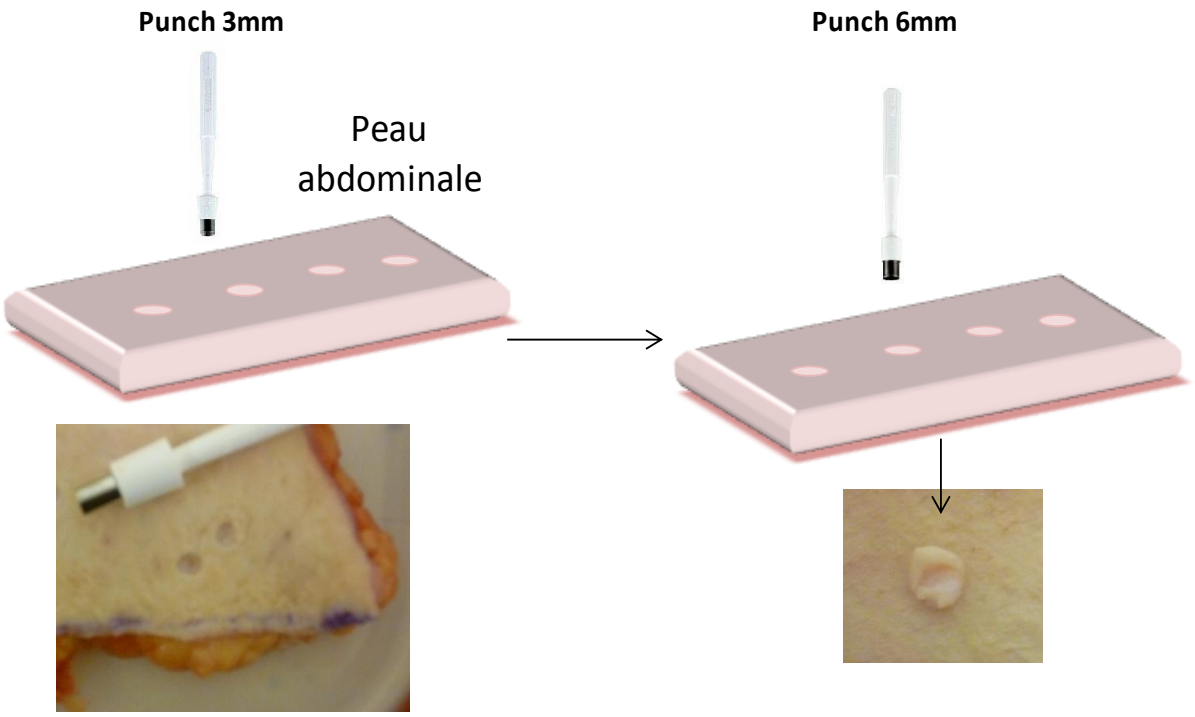


Figure 19. Elaboration des explants de peau humaine lésés (Technique adaptée de Kratz G, 1998).

Dans certains cas, les fibroblastes des échantillons de peau, contenus dans le derme, étaient récupérés selon le protocole décrit ci-dessous.

Deux explants témoins de peaux normales non mis en culture correspondant aux J0 de nos expérimentations, étaient fixés et congelés aussitôt comme décrit précédemment.

1.2. Les fibroblastes dermiques humains

L'épiderme et le derme étaient dissociés par une solution de dispase à 15U/ml dans du DMEM (Invitrogen) pendant 3 heures à 37°C ou à 4°C pendant la nuit. L'épiderme était éliminé et le derme placé 3 heures dans de la collagénase IV à 200 unités/ml (Sigma-Aldrich). Les débris étaient passés dans un filtre 70 µm (Falcon) puis centrifugés à 250 g pendant 5 minutes. Le culot était repris dans du DMEM/F12 supplémenté avec 10% de SVF et de l'antibiotique et mis en culture jusqu'à utilisation.

1.3 Les neurones issus de ganglions rachidiens dorsaux de rat (GRD)

Des rats nouveau-nés âgés de 2 à 5 jours ont été sacrifiés par décapitation. La peau du dos était enlevée à l'aide d'une pince et de petits ciseaux. La suite des manipulations se faisait sous hotte stérile. Pour atteindre les GRD, la partie haute de la colonne vertébrale était d'abord éliminée puis à l'aide de petits ciseaux, la colonne était séparée en deux longitudinalement. Chaque GRD était extrait à l'aide d'une pince fine puis aussitôt placés dans du milieu DMEM/F12. Pour dissocier les cellules nerveuses et les cellules gliales du GRD, les ganglions étaient placés pendant 35 minutes dans de la collagénase de type IV à 200 U/ml. Ensuite, les cellules étaient dissociées à l'aide d'une pipette Pasteur à l'embout rodé. Nous obtenons ainsi un mélange principalement constitué de cellules gliales (cellules de Schwann) et de neurones sensoriels.

2. Le modèle de culture organotypique 3D

2.1 Culture d'explant humain seul

Nous devions dans un premier temps définir le meilleur milieu de culture pour nos expérimentations. Ainsi, après analyse de la bibliographie, cinq milieux ont été testés:

- le DMEM/F12 (3:1) (Lonza),
- le RPMI-1640 (Lonza),
- le K-SFM supplémenté en EGF humain recombinant (5ng/ml) et BPE (50µg/ml) (Gibco) à 3 concentrations différentes en calcium :
    - 0M (milieu dit classique, de base, utilisé pour la prolifération des kératinocytes primaires humain),
    - 0,8M
    - 1,6M (connu pour favoriser la différenciation kératinocytaire).

Des compléments tels que l’insuline (5µg/ml, INS ; Sigma-Aldrich) et l’hydrocortisone (10ng/ml, HC) ont été utilisés dans les différents milieux. Dans tous les cas, les milieux n’étaient pas supplémentés en sérum.

2.2 Co-culture avec les cellules nerveuses primaires de rat

Les GRD étaient ensemencées à 80 000 cellules/puits dans un volume de 500 µl de milieu sur des plaques 12 puits. Le milieu de culture était constitué du milieu défini et de NGF à 25 ng/ml, ce second milieu sera par la suite appelé « milieu complet ». Dans certaines conditions le NGF n'était pas ajouté.

La plaque était ensuite laissée pendant 1 à 2 heures dans l'incubateur et les explants de peau lésée étaient placés à interface air-liquide, l'épiderme orienté côté air. Le milieu était changé tous les 2 jours. Après 3, 7 ou 10 jours de culture, les surnageants étaient récupérés, centrifugés et congelés à -80°C jusqu'à utilisation ; quant aux explants de peau lésée, ils étaient fixés dans une solution de PAF 4% (bain de 15 minutes) puis congelés suivant le protocole décrit ci-après.

3. Test des neuromédiateurs

3.1 Avec les explants lésés

Les explants de peau lésée cultivés seuls étaient cultivés en plaques de 12 puits dans 500 µl de milieu constitué de DMEM/F12 (3:1), d'INS 5 µg/ml et d'HC à 10 ng/ml (Sigma-Aldrich) par puits (Falcon) à interface air-liquide, l'épiderme étant orienté du coté air.

Pour l'étude de l'action des neuropeptides et neurotrophines sur la cicatrisation, le milieu de base était supplémenté avec l'une des molécules référencées dans le tableau 4. Des explants lésés non traités servaient de contrôle.

Molécules	Fournisseur	Concentrations testées
Substance P (SP)	PolyPeptide Laboratories	10^{-10}M 10^{-8} M 10^{-6} M
Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP)		
Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)		
Nerve Growth Factor-β (NGF- β)	Sigma-Aldrich Aldrich	10^{-12}M 10^{-10}M 10^{-8} M

Tableau 4. Liste des neuromédiateurs, fournisseurs er concentrations testés.

Les cultures étaient réalisées en duplicate pour chaque condition. Après 3, 7 ou 10 jours de culture, les surnageants étaient récupérés, centrifugés et congelés à -80°C jusqu'à utilisation. Quant aux explants de peau lésée (contrôle et traités), ils étaient fixés dans une solution de PAF 4% (bain de 15 minutes) puis congelés suivant le protocole décrit un peu plus loin dans le manuscrit.

3.2 Avec les fibroblastes dermiques primaires humains

3.2.1 Préparation de la matrice de fibronectine humaine

Les tests avec les fibroblastes dermiques humains ont été réalisés en incubant les cellules sur une matrice de fibronectine humaine (Sigma-Aldrich).

Une solution de 10 µg/ml de fibronectine diluée dans du DPBS stérile étaient déposés sur les plaques (96 ou 12 puits) de manière à recouvrir totalement le puits de culture. Les plaques étaient incubées à température ambiante pendant 3h puis l'excédent de fibronectine était éliminé. Les plaques étaient de nouveau mises à sécher jusqu'au lendemain. Elles étaient ensuite conservées à 4°C jusqu'à utilisation.

3.2.2 Test d'adhérence sur une matrice de fibronectine humaine

✓ Préparation des cellules

Les fibroblastes étaient cultivés pendant 24 H dans du DMEM ne contenant que 0.5% de SVF. Après dissociation (DPBS/EDTA à 2 mM), les cellules étaient rincées 2 fois dans du DMEM contenant 0.5% d'ASB, comptées et incubées dans des tubes de 1.5 ml à raison de 20 00 cellules/ml en présence ou non des différents neuromédiateurs (tableau 4) pendant 1 H à 37°C. Les tubes étaient sous constante agitation. Pour chaque condition, 300 µl était prélevés et répartis à raison de 100 µl/puits dans une plaque 96 puits préalablement coatés avec de la fibronectine humaine (10 µg/ml). Après 1 H à 37°C, les cellules étaient rincées 3 fois avec du DPBS et le nombre de cellules attachées à la matrice quantifié en utilisant le kit « Acid Phosphatase Assay kit » (Sigma-Aldrich).

✓ Utilisation du kit "Acid phosphatase Assay kit"

Une solution Substrat et une solution Standard étaient préparées extemporanément. Ainsi, pour la solution Substrat, 1 pastille de 4-Nitrophenyl Phosphate était diluée dans 2.5 ml de tampon citrate (0.09M, pH 4.8) contenant 1% de Triton X-100. Pour la seconde solution, 5 µl d'une solution standard de p-Nitrophenol (10 mM, solution mère) étaient dilués dans 995 µl de solution STOP (NaOH 0.5N) pour une concentration finale de 50 µM.

Au moment du dosage, les solutions étaient mises à température ambiante.

	Solution Substrat	Enzyme	Tampon Citrate	Solution Standard
Echantillon à doser	100 µl			
Blanc	100 µl		50 µl	
Standard				300 µl
Contrôle positif	100 µl	2 µl d'enzyme contrôle	48 µl	

Tableau 5. Volume des différentes solutions pour l'utilisation du Kit de dosage de la phosphatase acide.

Comme l'indique le tableau 5, 100 µl de la solution Substrat étaient déposés dans chaque puits contenant les cellules et la plaque était mise en incubation à 37°C sous constante agitation. Puis, 150 µl de solution STOP étaient ajoutés dans toutes les conditions excepté la condition « Standard ».

L'activité de la phosphatase acide était déterminée en comparant l'absorbance à 405 nm obtenue pour chaque condition selon l'équation suivante :
((A405[sample] – A405[blank]) x 0.05 x 0.3 x dilution factor) / (A405[standard] x temps x volume d'enzyme) = Unité de phosphatase acide/ml.

Chaque incubation avec les neuromédiateurs était réalisée en duplicate, et la valeur moyenne de 3 expérimentations indépendantes était calculée.

3.2.3 Différenciation des fibroblastes en myofibroblastes

Les fibroblastes dermiques étaient obtenus par le protocole décrit précédemment. Après dissociation (15 minutes dans une solution de DPBS/EDTA à 2mM, Lonza), les fibroblastes étaient comptés et ensemencés dans des plaques 12 puits préalablement coatées avec de la fibronectine (10 µg/ml) à raison de 10 000 cellules/puits. Un anneau de clonage était inséré dans chaque puits avant l'ensemencement afin de mimer une lésion. Les cellules étaient laissées pendant 24H dans du milieu DMEM contenant de la normocine, puis l'anneau de clonage était enlevé. Les cellules étaient ensuite incubées en présence ou non des neuromédiateurs (tableau 4) dans du milieu DMEM contenant de la normocine (500 µl/puits). Afin d'inhiber la prolifération, 10 µg/ml de mitomycine C (Sigma-Aldrich)

était ajouté dans toutes les conditions de culture. Un contrôle positif de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes était effectué en incubant certains puits de culture avec 4 ng/ml de TGF-β1. Chaque condition était réalisée en triplicate.

Après 24H ou 48 H de culture, les tapis cellulaire étaient rincés deux fois avec du DPBS et stockés à -80°C jusqu'à utilisation pour le protocole d'extraction des ARNs.

B. Histologie

1. Coupe des explants lésés

Avant d'effectuer les coupes, les échantillons de peau lésée fixés et congelés étaient coupés en deux parties; une partie était remise au -80°C et les coupes étaient réalisées sur la seconde partie. Ces coupes d'une épaisseur de 10 µm étaient effectuées à l'aide d'un cryotome et disposées sur des lames Superfrost+ (Thermo, Superfrost+). Une moyenne de 6 coupes par lame et 8 lames par échantillon étaient réalisées puis conservées au surgélateur (-80°C) jusqu'à utilisation (Figure 20).

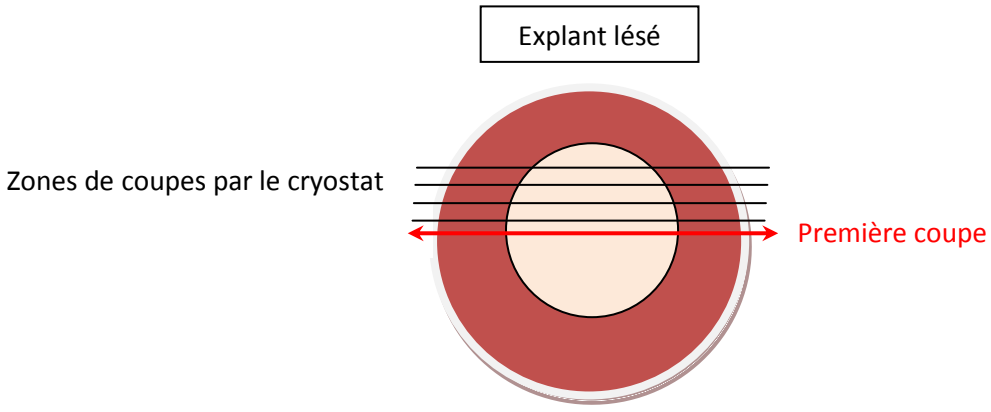


Figure 20. Zones de coupes des explants lésés pour nos différentes études histologiques.

2. Colorations histologiques

2.1 Trichrome de Masson

Les coupes étaient aérées pendant une demi-heure sous une Sorbonne puis disposées sur une plaque chauffante. Une goutte d'hématoxyline de Harris (RAL) était déposée sur les coupes pendant 3 minutes. Les lames étaient ensuite rincées à l'eau courante quelques secondes puis plongées un instant dans une solution d'acide chlorhydrique 1%. Elles étaient rincées à nouveau puis plongées dans de l'eau lithinée (Merck, carbonate de lithium, 1.05680). Les cytoplasmes étaient marqués par le mélange Fushine-Ponceau pendant 5 minutes puis deux bains d'eau acétifiée à 1% étaient pratiqués. Les lames étaient ensuite colorées par l'orange G molybdique pendant 5 minutes puis deux bains d'eau acétifiée à 1% étaient pratiqués. Le collagène était révélé par le vert-lumière pendant 5 minutes puis deux bains d'eau acétifiée. Les lames étaient ensuite déshydratées par des bains d'éthanol successifs (70°, 95°, 100°, 100°) pour être plongées dans du toluène puis montées entre lame et lamelle avec de l'Eukitt®.

2.2 Hématoxyline-éosine (HE)

Le protocole est identique à la coloration au Trichrome de Masson jusqu'au bain d'eau lithiné. Les coupes étaient ensuite rincées, puis colorées par une solution d'éosine/érythrosine (19,8 g d'éosine, RAL ; 10,2 g d'érythrosine, RAL; QSP eau 1 litre) pendant une minute. Les lames étaient ensuite déshydratées par des bains d'éthanol successifs (80°, 95°, 100°, 100°) pour être plongées dans du toluène puis montées entre lame et lamelle avec de l'Eukitt®.

3. Immunohistochimie (IHC)

Les coupes de tissus étaient aérées pendant 30 minutes à la sortie du surgélateur. Les échantillons étaient ensuite délimités par un stylo hydrophobe (Sigma-Aldrich, Pap pen, Liquid Blocker).

Anticorps	Spécificité, Source, dilution	Références
Anticorps primaires		
-Ki67	polyclonal, lapin, 1/100	Abcam, ab833
-anti-Collagen IA	monoclonal, souris, 1/1000	Santa Cruz, sc59772
-anti-Collagen III	polyclonal, lapin 1/250	Abcam, ab7778
-anti-Cytokeratine 6	monoclonal, souris, 1/100	Abcam, ab20204
-anti-Neuroserpine	polyclonal, lapin, 1/100	Abcam, ab1617
-anti-CD31	monoclonal, souris,1/50	Dako, M0823
-anti-TE7	monoclonal, souris, 1/100	Millipore, CBL271
Anticorps secondaires		
-anti-lapin Chromeo488	IgG, chèvre, 1/1000	Abcam, ab60314
-anti-souris FITC	IgG, chèvre, 1/1000	Abcam, ab60313
-anti-souris TRITC	IgG, chèvre, 1/500	Sigma-Aldrich-Aldrich, T7782
-anti-lapin (HRP)	IgG, chèvre, 1/1000	Sigma-Aldrich-Aldrich, A9169

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés en immunochimie. IgG = Immunoglobuline de type G, FITC= Fluorescein IsoThyoCyanate , TRITC= Tetramethyl Rhodamine IsoThyoCyanate, HRP= Horse Raddish peroxydase

200 µl de solution de perméabilisation/saturation (constituée de 2,5% de sérum de chèvre (Abcam) et 2,5% de SVF, 0,1% de saponine (Sigma-Aldrich) et de 0,05% de TritonX100 (Sigma-Aldrich) étaient déposés pendant 15 minutes sur chaque lame. L'anticorps primaire (tableau 6) était ensuite dilué dans une solution de DPBS contenant 0.01% de Tween 20 (DPBST), 2.5% de SVF et 0,1% de saponine puis incubé pendant 2H à température ambiante ou une nuit à 4°C dans une chambre humidifiée. Deux rinçages de 15 minutes dans une solution de DPBST étaient

effectués. L'anticorps secondaire (tableau 6) était laissé pendant 1 heure 30 dans une solution identique à celle de l'anticorps primaire. Si nécessaire, une contre-coloration au bleu Evans à 0,5 g/l (Sigma-Aldrich) était réalisée pendant 10 minutes. Un marquage des noyaux au 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI ; Sigma-Aldrich) dilué à 100 ng/ml dans du DPBS pendant 5 minutes pouvait être réalisé puis les lames étaient rincées 3 fois 5 minutes au DPBST. Des échantillons témoins sans anticorps primaires étaient systématiquement réalisés. Les lames étaient observées au microscope optique à fluorescence (Axiostar plus system (Carl ZEISS, MicroImaging Gmbh, Germany)) après montage entre lame et lamelle par du glycérol 90 %.

C. Etudes biochimiques et biomoléculaires

1. Le western-blot (Etude NSP)

1.1 Extraction protéique et dosage

Les explants de peau fixés et congelés (n=10) étaient immergés dans 1ml/échantillon de Tri-Reagent (Sigma-Aldrich-Aldrich) puis broyés dans le dissociateur de tissus, le GentleMacs (Miltenyi Biotech) pendant 1 minute 30. Les lysats tissulaires étaient centrifugés (250g pendant 5 minutes à 4°C) et le surnageant récupérés. Le protocole suivait ensuite la procédure d'extraction des protéines donnée par le fournisseur. Brièvement, 200 µL de chloroforme froid (Rectapur, UN1888) étaient ajoutés dans le Tri-Reagent. Après plusieurs homogénéisations, les échantillons étaient centrifugés à 13 000 g pendant 15 min à 4°C dans des tubes de 1,5 ml. La phase aqueuse supérieure était transférée dans un nouveau tube pour être traitée ultérieurement pour pouvoir extraire les ARN totaux. La phase organique était transférée dans un nouveau tube et 1.5 ml d'isopropanol étaient ajoutés. Après homogénéisations, et une incubation pendant 10 minutes à température ambiante, les échantillons étaient centrifugés à 12 000g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant était enlevé et le culot de protéines lavés trois fois avec une solution de guanidine hydrochloride (0.3M dans de l'éthanol 95%). Pour chaque lavage, 2ml étaient ajoutés, laissés pendant 20 minutes à température ambiante puis centrifugés à 7 500g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot était rincé dans 2 ml d'éthanol 100% pendant 20 minutes à température ambiante puis centrifugé à 7 500g pendant 5

minutes à 4°C. Une fois l'éthanol enlevé, le culot était mis à sécher à l'air, puis dissout dans une solution de Sodium Dodécyl Sulfate 1% (SDS 1%).

La quantité protéique de chaque échantillon était évaluée à l'aide du réactif de Bradford (Biorad). Une gamme d'étalonnage d'albumine de sérum bovin (« bovine Sera Albumin ou BSA) était réalisée pour servir de référence afin d'évaluer la concentration protéique : 0 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml et 1,5 mg/ml de SAB. 10 µl de gamme étaient mélangés à 1 ml de réactif dilué au 1/5 dans de l'eau. La gamme n'était utilisée que si le coefficient de distribution des points autour de la droite était supérieur à 0,985. La densité optique des échantillons, dilués au 1/10, était comparée à celle de la gamme.

1.2 Dénaturation des protéines et Western-blot

Les protéines extraites étaient dénaturées par chauffage à 95°C pendant 5 minutes dans du tampon de Laemmli ou tampon de charge 2X (4% de SDS, 0,1% de bleu de bromophénol, 100 mM de TrisHCl, 15% de glycérol, 15% de beta mercapto-éthanol, pH 8,4).

Un gel de concentration de poly-acrylamide à 4% constitué de 3,3 ml d'eau MilliQ, 1,3 ml de tampon II (TrisHCL 1 Molaire (M)), SDS 0,4%, pH 6,8), 500 µl d'acrylamide-bis (37,5:1, Merck, 1.00638) à 40%, 15 µl de Temed (Euromedex), 75 µl de persulfate d'ammonium (APS) (Biomol) à 10% était coulé sur un gel de séparation. Le gel de séparation était utilisé à 10% de poly-acrylamide. Il contenait 5,25 ml d'eau, 3 ml de Tampon I (TrisHCl 1,5 M, SDS 0,4%, pH 8,6), 3,125 ml d'acrylamide-bis à 40%, 20 µl de Temed, 100 µl d'APS à 10%. Vingt microgrammes de protéines étaient déposés dans les puits du gel de concentration, ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (Sigma-Aldrich-Aldrich) afin d'identifier facilement les protéines d'intérêts. La migration se faisait dans du tampon de migration constitué au 10X de 30 g de TrisHCl, 10 g de SDS, 142 g de glycine dans 500 ml d'eau. Le tampon de migration était dilué au 1/10 avant utilisation. Les protéines étaient concentrées via le gel de concentration à 6,25 V/cm jusqu'à la sortie du tampon de charge du premier, la tension était alors augmentée à 11,25 V/cm jusqu'à la sortie du tampon de charge du second gel. Ensuite les protéines étaient transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 1 heure à 4°C dans le tampon de transfert

constitué au 10X de 15,8 g de Tris et de 71 g de glycine dans 500 ml d'eau. Le tampon de transfert était dilué au 1/10 avant utilisation. L'efficacité du transfert était visualisée par coloration de la membrane avec du rouge ponceau (Sigma-Aldrich) pendant 5 minutes, les protéines les plus présentes apparaissait alors en rouge. La membrane était rincée à l'eau du robinet jusqu'à élimination complète du rouge ponceau.

Avant de réaliser l'hybridation de la membrane avec les anticorps spécifiques, il est important de prévenir toute possibilité de fixation non spécifique. La membrane était donc saturée par incubation pendant une heure ou toute la nuit à 4°C dans du tampon DPBS additionné de 1/1000 de Tween 20 et contenant 5 % de lait écrémé en poudre. La solution d'anticorps primaire anti-NSP humaine était alors appliquée toute la nuit à 4°C, elle contient l'anticorps dilué au 1/100ème et du DPBS à 5% de lait écrémé. Ensuite la membrane était lavée 3 fois sous agitation forte dans du DPBS Tween 20, 1 fois 15 minutes puis 2 fois 5 minutes. La membrane était ensuite incubée pendant 1 heure 30 en présence de l'anticorps secondaire dilué dans du DPBS/Tween 20 puis rincée de nouveau 3 fois comme précédemment.

Le complexe immun sur la membrane, et donc les protéines, était révélé après une action du réactif chimio-luminescent (Chemicon, Amersham) avec l'anticorps secondaire couplé au HRP ("Horse radish peroxydase"). Un film photographique était ensuite exposé dans une cassette auto-radiographique quelques minutes contre la membrane après élimination du réactif luminescent. Le film était révélé par un révélateur (Kodak) jusqu'à l'apparition des bandes, puis fixé (Kodak) et rincé abondamment à l'eau courante. Toutes ces étapes de révélation se faisaient dans l'obscurité. Le film photographique était scanné *via* le logiciel ImageJ.

2. Dosage des surnageants de culture par une technique immuno-enzymatique

Les concentrations de SP et CGRP libérées dans les milieux de co-culture étaient déterminées à l'aide de kits commerciaux utilisant une technique de type EIA (« Enzyme Immunometric Assay »). Ainsi, nous avons utilisé le « rat Substance P Enzyme Immunometric Assay » et le « rat CGRP Enzyme Immunometric Assay »

(SPIBIO, BertinPharma) respectivement pour le dosage de la SP et du CGRP. La limite de détection des tests était de 3,8 pg/ml pour le CGRP et de 7.8 pg/ml pour la SP. Les deux kits sont basés sur le même principe mais n'utilisent pas le même volume d'échantillon :

Les plaques de dosage pré-coatées respectivement par un anticorps monoclonal de souris anti-CGRP et un anticorps monoclonal de souris anti-SP sont préalablement lavées 4 fois. Ensuite, les volumes nécessaires, 100 µl en duplicate pour le CGRP et 50 µl en duplicate pour la SP, de chaque surnageant de culture à doser étaient déposés dans les puits. Puis, 200 µl d'une solution contenant un anticorps anti-SP ou CGRP couplé à de l'acétylcholinestérase étaient ajoutés dans chaque puits, excepté le blanc. Les plaques étaient incubées toute la nuit (entre 16 H et 20 H) à 4°C.

Le lendemain, les plaques étaient lavées pour 2 séries de 4 lavages puis l'activité de l'acétylcholinestérase était révélée par l'addition de 200 µl de réactif d'Ellman. Le résultat de l'activité enzymatique était évalué par lecture de la densité optique à 405 nM. Pour chaque dosage, la concentration de SP ou de CGRP contenue dans les échantillons, exprimée en pg/ml, était déduite à partir d'une courbe standard.

3. La PCR en temps réel

3.1. Extraction des ARNs

3.1.1 A partir d'explants de peau non lésés (Etude NSP)

Après l'extraction des protéines des échantillons de peau, les ARNs totaux étaient extraits. A la phase aqueuse supérieure récupérée précédemment, 500 µL d'isopropanol froid (Sigma-Aldrich) était ajoutés. Après agitation par inversion et incubation de 5 min dans de la glace, les ARNs étaient précipités une nuit à –20°C. Les précipités d'ARNs étaient récupérés après centrifugation à 13 000 g pendant 10 min à 4°C. Les culots d'ARNs ainsi obtenus étaient lavés et centrifugés 2 fois par de l'éthanol à 75 % puis séchés 5 min à 4°C. Ils étaient dissous dans 10 µl d'eau stérile sans RNAse. Les ARNs extraits étaient quantifiés et leur intégrité contrôlée. Ils étaient dosés par spectrophotométrie (Nanodrop ND1000 spectrophotometer, Thermo) à 260 nm, la contamination protéique étant estimée par une lecture à 280

nm. Le rapport des densités optiques (DO) mesurées à 260 nm et à 280 nm (DO_{260}/DO_{280}) indique la pureté des échantillons, il doit se situer entre 1,5 et 2 (<1,5 : contamination par les protéines ; >2 : contamination par l'isothiocyanate de guanidine ou le phénol). La densité optique mesurée à 260 nm permettait de calculer la concentration d'ARN sachant qu'une unité de DO correspond à 40 µg/ml. Les échantillons étaient soit conservés à -80°C jusqu'à utilisation, soit soumis directement à l'étape de synthèse de l'ADN complémentaire par transcription inverse (RT pour Reverse-Transcriptase).

3.1.2 A partir des cultures de fibroblastes dermiques humains

L'expression des gènes a été analysée sur les fibroblastes dermiques primaires humains après 24H et 48H d'incubation avec les différents neuromédiateurs comme décrit précédemment. Pour cela, les culots cellulaires étaient rincés deux fois avec du DPBS puis soumis au protocole d'extraction fourni par le kit « RNeasy Mini Kit » de chez Qiagen. Pour cela, les cellules étaient lysées dans une solution contenant de la guanidine isothyocyanate et bien homogénéisées par plusieurs passages à travers l'embout de pipettes. De l'éthanol absolu était ensuite ajouté au lysat (volume/volume) créant les bonnes conditions de fixation de l'ARN sur la colonne contenant le gel de silice. Chaque échantillon, placé sur une colonne, était centrifugé (8 000g pendant 15 secondes). Au cours de cette étape, l'ARN total se fixait à la membrane, les différents contaminants étaient efficacement enlevés par les cycles de lavage successifs. Le contaminant principal étant l'ADN génomique, une étape de digestion enzymatique par une DNAse était réalisée entre deux cycles de lavage du protocole initial (RNAse-free DNAse Set, Qiagen). Brièvement, les colonnes étaient incubées pendant 10 minutes entre 25° et 30°C avec une solution de DNAse, puis lavées. L'ARN total était ensuite élué par centrifugation dans de l'eau pure ne contenant aucune RNAse (RNAse free).

Une évaluation quantitative de la teneur en ARN de nos échantillons était réalisée comme décrit précédemment.

Les échantillons étaient alors soit congelés à -80°C jusqu'à utilisation, soit soumis directement à l'étape de synthèse de l'ADN complémentaire par transcription inverse (RT pour Reverse-Transcriptase).

3.2 Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc)

Cette étape était réalisée avec le kit « High-capacity cDNA archive kit » de chez Applied Biosystems. Le but de cette étape est de transcrire l'ARNm en ADNc simple brin grâce à une enzyme, la reverse transcriptase. L'ADNc ainsi obtenu était reconnu comme plus stable et moins sensible à la dégradation que l'ARN.

1 µg d'ARN total était utilisé pour la réaction et le volume ajusté à 20 µl dans de l'eau RNAse-free. Un volume équivalent de volume de réaction était ensuite ajouté.

Ce milieu de réaction consistait en :

- 2 µl de tampon de réaction 10X
- 1.8 µl de dNTP 25X (mélange équimolaire de dATP, dCTP, dGTP, DTTP ; Promega, France)
- 2 µl de reverse transcriptase multiscribe (50 U/µl)
- 2 µl de random primers 10X
- 12.2 µL d'eau RNAse-free.

Les échantillons, 40 µl, étaient ensuite mis à incuber pendant 10 minutes à 25°C puis pendant 2H à 37°C.

Les ADNc étaient utilisés tout de suite ou stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

3.3 PCR en temps réel

3.3.1 Principe

La réaction d'amplification de la séquence ADN cible effectué au cours d'une PCR en temps réel ou « Quantitative PCR » (QPCR) suit les mêmes étapes qu'en PCR classique : dénaturation, hybridation, extension. A la différence d'une PCR

classique, la QPCR utilise une sonde fluorescente qui permet la quantification et la caractérisation de l'amplicon formé en temps réel. Cette technique permet de faire une quantification relative du gène d'intérêt ici dans des échantillons donnés par rapport à un gène de référence non régulé.

Ainsi, nous avons analysé l'influence des neuropeptides et du NGF-β sur l'expression de l'α-SMA au cours du temps dans les fibroblastes dermiques humain. L'ARN ribosomal 18S a été utilisé comme gène de référence.

3.3.2 Protocole

La QPCR était réalisée à l'aide du système de détection de la société Applied Biosystem, ABI Prism 7000. Pour chaque PCR, 5 µl d'ADNc de l'échantillon à analyser était ajouté à 15 µl de Master Mix SYBR Green contenant la paire de "primers" permettant d'amplifier le gène d'intérêt, l'α-SMA et le gène de référence, le 18S en concentration finale de 100 nM. Un témoin négatif contenant tous les composants hormis l'ADNc était réalisé pour chaque gène.
Le mixte était préparé comme suit :

- 14.5 µl de Mix SYBR Green,
- 0.25 µl d'oligonucléotides sens (tableau 7)
- 0.25 µl d'oligoniucléotides antisens (tableau 7)
- 5 µl d'eau RNAse-free

α-SMA	sens	5' CCGACCGAATGCAGAAGGA 3'
	antisens	5'ACAGAGTATTTGCGCTCCGAA3'
18S	sens	5' GGCTACCACATCCAAGGAAGG 3'
	antisens	5' CCAATTACAGGGCCTCGAAAG 3'

Tableau 7. Séquence des « primers » utilisés pour la PCR en temps réel.

Les conditions d'amplification étaient les suivantes :

- dénaturation initiale de 2 minutes à 95°C,
- 40 cycles de 15 secondes à 95°C

- 1 minute à 60°C,
- 30 secondes à 95°C

A la fin de chaque expérience, les données étaient collectées et analysées. Chaque réaction d'amplification était réalisée en triplicate et la moyenne du nombre de « threshold cycle » ou Ct de chaque triplicate était utilisé pour calculer l'expression relative de l'ARNm de chaque gène en se basant sur la méthode comparative standard des Ct décrite dans la publication de Livak KJ and Scmittgen TD (Livak KJ and Scmittgen TD 2001). Pour cela, les valeurs des Ct du gène cible était standardisés sur la valeur du gène de référence et calibrés à une valeur de 1 en utilisant les valeurs obtenues avec les fibroblastes dermiques humain activés par le TGF-β1.

Les résultats finaux sont issus de 5 expérimentations indépendantes.

4. Evaluation de l'activité des métalloprotéinases matricielles 2 et 9 par zymographie

4.1 Principe

Cette technique permet de mesurer l'activité des MMPs par ajout de leur substrat dans un gel de polyacrylamide puis incubation dans un tampon de digestion pour permettre aux enzymes de dégrader le gel et permettre après coloration de comparer leurs activités dans les différents échantillons grâce au logiciel Image J.

4.2 Migration sur gel, coloration et décoloration

Les surnageants de culture prélevés à partir des co-cultures et des tests avec les neuromédiateurs, et congelés à -80°C étaient déposés (25 µl) sur un gel de polyacrylamide à 10% (cf gel utilisé pour le Western blot) auquel avait été ajoutée de la gélatine à 0,1% final. Les échantillons étaient mis à migrer à 130 volts pendant 1h30min à 4°C. Ensuite, 3 rinçages de 20 minutes avec du Triton X-100 à 2,5% à température ambiante étaient réalisés. Le gel était incubé dans un tampon de digestion (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl2 à pH 7,5) pendant 20h à 37°C.

Le gel était coloré dans du bleu de Coomassie à 0,1% pendant 1h sous agitation constante à température ambiante puis décoloré à l'aide d'une solution de

décoloration composée de 30% de méthanol, 10% d'acide acétique et de 60% d'eau distillée jusqu'à apparition nette des zones digérées par les enzymes testées.

Une photographie du gel était finalement effectuée et la densité des bandes obtenues évaluée grâce au logiciel Image J.

D. Comptages et mesures

1. Analyse histologique des explants humain lésés.

1.1 Ratio d'expression des collagènes de type I et de type III.

Nous avons analysé l'évolution du ratio d'expression entre les collagènes de type I et de type III dans nos différentes conditions au cours du temps (ratio I/III) par la méthode RVB (Rouge, Vert, Bleu ou RGB « Red, Green, Blue »). Cette méthode consiste à combiner 3 images prises à travers 3 filtres, rouge, vert et bleu et à recomposer ensuite ces 3 composantes dans un logiciel pour retrouver la couleur.

Pour cela, après marquages par IHC, nous avons sélectionné des aires de 628*628 pixels au niveau de la lésion sur chaque coupe en utilisant le logiciel Paint.net (Rick Brewster and contributors, Microsoft developer division). L'intensité de fluorescence des collagènes de cette aire a été analysée par le logiciel ImageJ en mesurant les RVB selon la technique décrite par différentes études (Haviarova Z et al, 2008; Vrekoussis T et al, 2009). Les valeurs d'intensité moyenne du rouge pour le collagène de type I et du vert pour le collagène III étaient collectées individuellement et le ratio collagène I/III était déterminée pour chaque condition de culture.

1.2 Mesure de la longueur moyenne des languettes de ré-épithélialisation

Pour chaque incubation avec des neuromédiateurs, nous avons effectué une mesure moyenne de la longueur de la languette de ré-épithélialisation. Pour cela, à chaque temps de culture, nous avons travaillé sur 6 coupes par échantillon colorées par un trichrome de Masson. Sur chacune de ces coupes, nous avons photographié la zone lésée (épiderme et derme, excepté les bords externes de l'explant) et utilisé le logiciel AxioVision (Carl Zeiss) pour mesurer les languettes de ré-épithélialisation. Le premier point de référence était la fin de la couche cornée, le second point était la fin de la languette de ré-épithélialisation (figure 21).

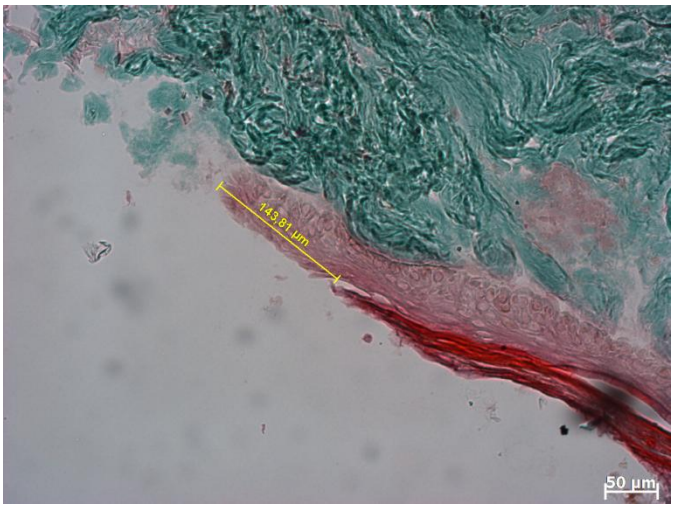


Figure 21. Exemple de mesure de languette de ré-épithélialisation sur une coupe d'explant de peau humaine lésée, colorée au Trichrome de Masson.

1.3 Evaluation de la prolifération moyenne des cellules de la peau

1.3.1 Des fibroblastes dermiques

Afin d'analyser cette prolifération, nous avons choisi une méthode basée sur le calcul du pourcentage moyen de cellules immunoréactives au marqueur de la prolifération Ki67 au niveau du derme (Lebonvallet N et al, 2012). Pour cela, à chaque temps de culture, nous avons travaillé sur 6 coupes par échantillon. Sur chacune de ces coupes, nous avons photographié la zone lésée (épiderme et derme, excepté les bords externes de l'explant) puis nous avons, sur la même coupe, photographié les zones non prolifératives jusqu'à atteindre un total de 6 photos (comprenant les immunoréactives et les autres). Pour chaque champ photographique, une image était prise avec le filtre utilisé pour le Ki67 et une autre pour le DAPI. Le nombre de cellules immunoréactives était alors évalué et exprimé en pourcentage de cellules positives par rapport au nombre de cellules dermiques comptés grâce au DAPI.

1.3.2 Des kératinocytes

Nous avons utilisé la même méthode que pour l'analyse de la prolifération des fibroblastes dermiques. Afin de déterminer l'effet des neurones primaires ou des neuromédiateurs sur la reconstruction de l'épiderme nous avons utilisé un marqueur

de la prolifération kératinocytaire, la cytokératine-6. Pour cela, nous avons travaillé sur 6 coupes par échantillon. Sur chacune de ces coupes, nous avons photographié la zone lésée (excepté les bords externes de l'explant) puis nous avons, sur la même coupe, photographié les zones non prolifératives jusqu'à atteindre un total de 6 photos (comprenant les immunoréactives et les autres). Pour chaque champ photographique, une image était prise avec le filtre utilisé pour le FITC et une autre pour le DAPI. Le nombre de cellules immunoréactives était alors évalué et exprimé en pourcentage de cellules positives par rapport au nombre de kératinocytes totaux comptés grâce au DAPI.

2. Statistiques et représentations graphique

Les calculs statistiques étaient réalisés à l'aide d'un test de Mann-Whitney. Les représentations graphiques des données ont été réalisées à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2007.

RESULTATS

Chapitre V. Résultats

A. Mise en place du modèle : détermination du milieu de culture

1. Analyse histologique

De nombreux modèles d'études de la cicatrisation existent mais très peu d'entre eux utilisent un explant de peau humaine lésée et aucun n'allie cet explant à des neurones sensoriels primaires en culture. Partant de ce constat, nous avons entrepris de mettre en place cette co-culture. Nous devions dans un premier temps définir le meilleur milieu. Cinq milieux ont été testés: le DMEM/F12 (3:1), le RPMI1640 et le K-SFM supplémenté en EGF (5ng/ml) et BPE (50µg/ml) à 3 concentrations différentes en calcium : 0M qui correspond au milieu dit « classique », 0,8M et 1,6M (connu pour favoriser la différenciation kératinocytaire). Des compléments tels que l'INS (5 µg/ml) et l'HC (10 ng/ml) ont été utilisés dans les différents milieux. Dans tous les cas, les milieux n'étaient pas supplémentés en sérum.

La première étape de ce travail a consisté à mettre en culture des explants de peau lésée avec les différents milieux pendant 2, 4, 7 et 10 jours et de réaliser ensuite des coupes histologiques de 10µm. L'intégrité tissulaire ainsi que l'initiation du processus de cicatrisation par la présence de languettes de ré-épithélialisation ont été analysées.

Les études histologiques réalisées grâce aux colorations hématoxyline-éosine et trichrome de Masson sur les coupes congelées d'explants, nous ont rapidement permis de mettre en évidence que le RPMI ne permettait pas d'avoir une intégrité tissulaire suffisante au cours des 10 jours de culture et surtout nous n'observons pas l'apparition de languette de ré-épithélialisation (Figure 22).

En ce qui concerne le K-SFM, qui est un milieu mis au point pour la culture des kératinocytes primaires, nous remarquons, qu'en absence de Ca^{2+}, l'épiderme est désorganisé. En revanche, l'organisation physiologique revient progressivement en corrélation directe avec la concentration en Ca^{2+}. En effet, que se soit en culture avec le K-SFM à 1,6M de Ca^{2+} ou avec le DMEM/F12 (3:1) (1.8M), le tissu cutané reste intègre même après 10 jours de culture. L'apparition de languettes de ré-épithélialisation est également observée dans les deux conditions.

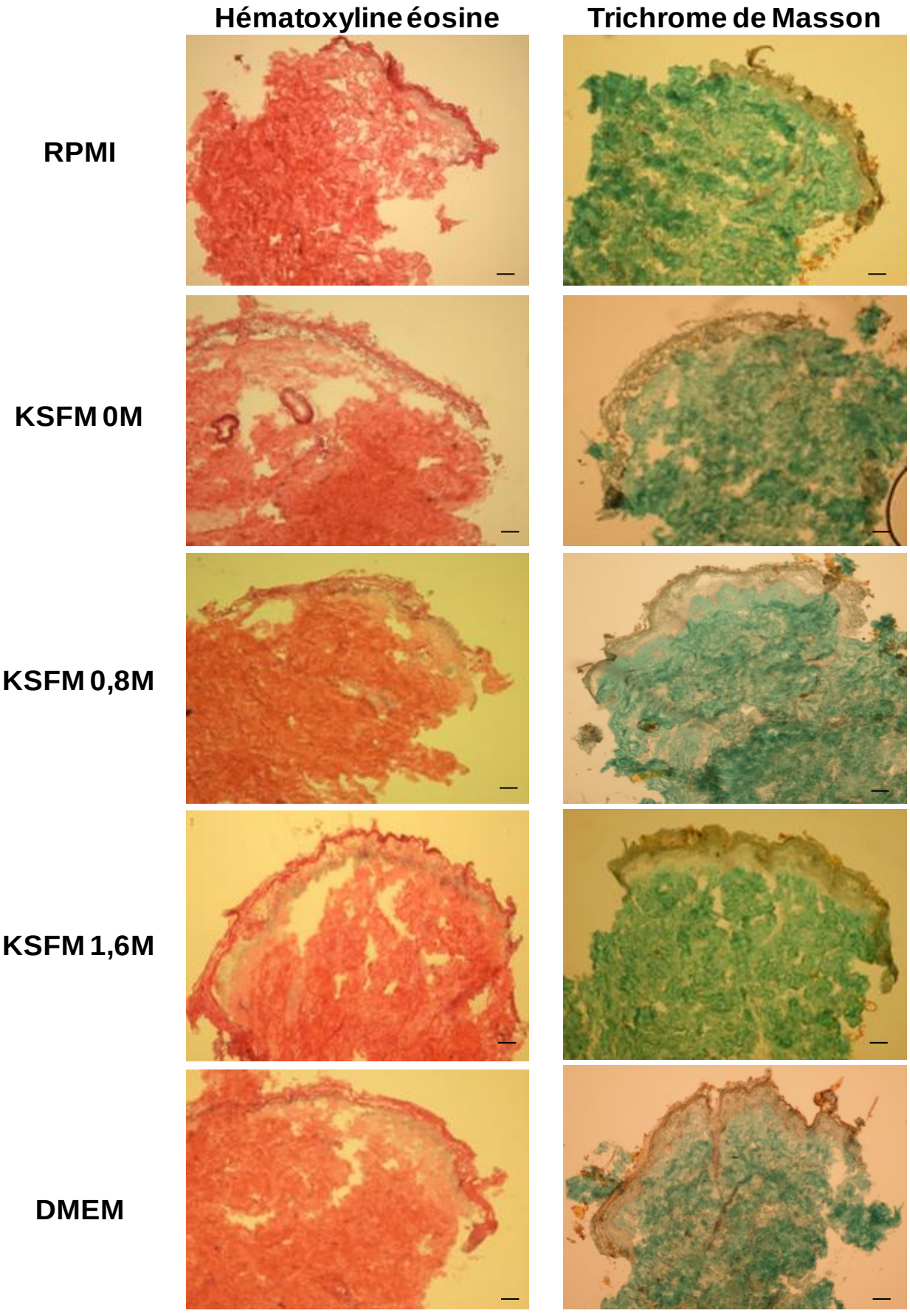


Figure 22. Exemple représentatif des photos obtenues après coloration à l'hématoxyline/éosine ou au Trichrome de Masson des zones lésées après 10 jours de culture dans chaque milieu de culture testé. Barre= 50 µm

2. Evaluation de la prolifération cellulaire

Des immunomarquages pour le Ki67, qui est un marqueur de la prolifération cellulaire, ont été réalisés.

Nous avons pu observer une diminution du nombre de cellules prolifératives au cours du temps lorsque les explants étaient cultivés dans le RPMI ou dans le K-SFM classique et 0.8M. La prolifération cellulaire persistait jusqu'à 10 jours de culture avec le KSFM contenant 1,6M de Ca^{2+} (Figure 23). La culture en DMEM/F12 ne permettait d'observer une prolifération cellulaire que jusqu'au 7ème jour de culture. Cette absence de prolifération après le 7ème jour de culture peut toutefois avoir un intérêt pour notre étude puisque nous voulions étudier l'effet du NGF-β et de différents neuropeptides sur la prolifération cellulaire, que se soit dans le derme et l'épiderme.

A ce stade, deux milieux de culture pouvaient être envisagés : le DMEM/F12 (3 :1) et le K-SFM à 1.6M de Ca^{2+}.

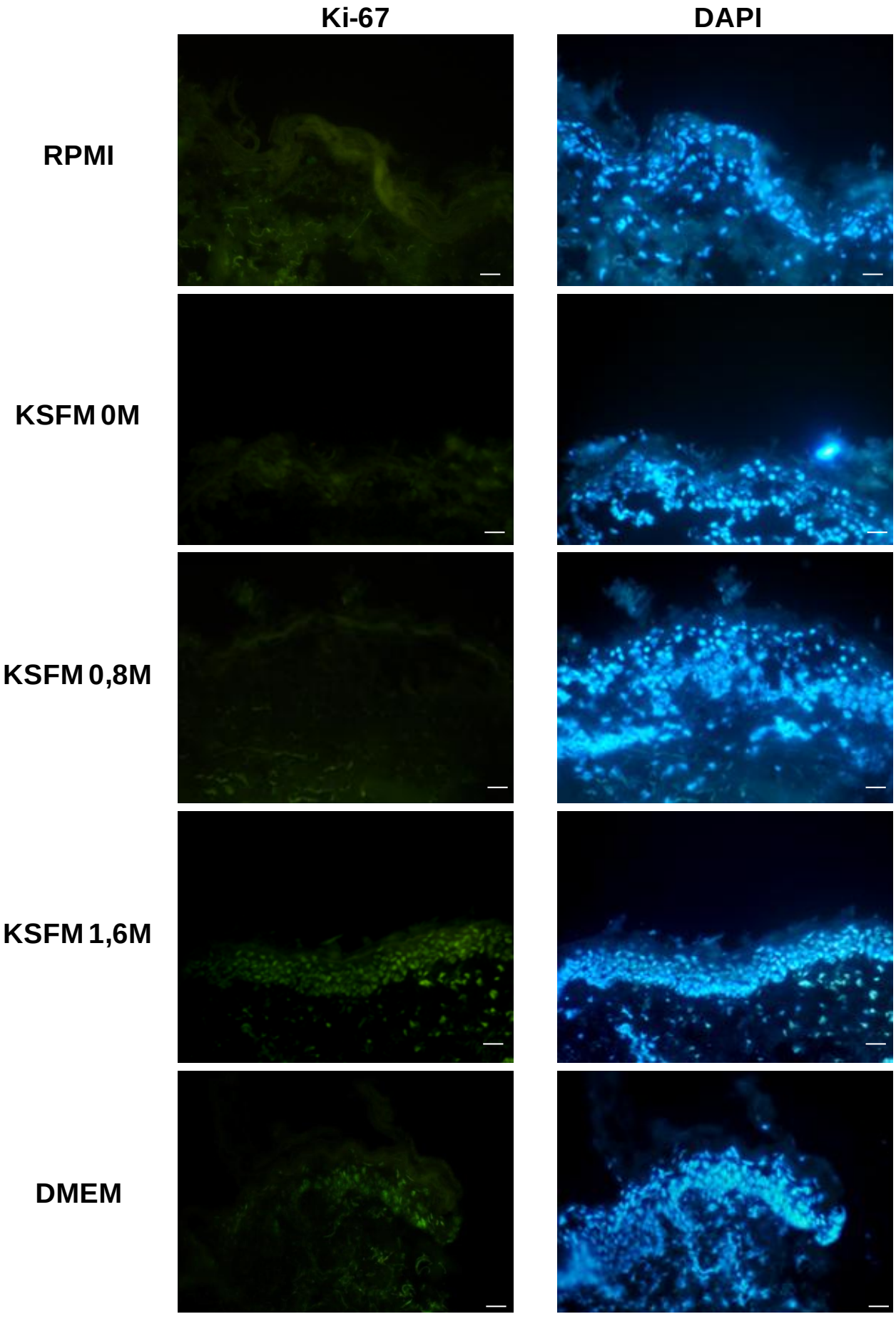


Figure 23. Exemple représentatif des photos des zones lésées obtenues après marquage au Ki67 (IHC) et coloration des noyaux au DAPI pour chaque milieu de culture testé après 10 jours de culture. Barre = 100 µm.

3. Choix final du milieu de coculture

3.1 Effet de la substance P

Le but de notre étude étant de déterminer l'effet de plusieurs neuropeptides et neurotrophines sur la cicatrisation, nous avons cultivé nos explants lésés dans du K-SFM à 1.6M de Ca^{2+} ou du DMEM/F-12 en présence de SP à différentes doses (10^{-6},10^{-8}, 10^{-10}M). Des immunomarquages avec le Ki67 étaient ensuite réalisés aux différents temps de culture.

Avec le K-SFM 1,6M de Ca^{2+}aucune différence significative de prolifération n'a pu être observée entre les explants traités et non traités par la SP, quelle que soit la concentration testée et le temps de culture (Figure 24). Le taux de cellules prolifératives était élevé quelles que soient les conditions, masquant l'effet potentiel de la SP. En revanche, l'ajout de SP dans le milieu DMEM/F12 favorise clairement la prolifération par rapport aux explants non traités. De plus, cette stimulation de la prolifération par la SP était maintenue même après le $7^{ème}$ jour de culture (Figure 25).

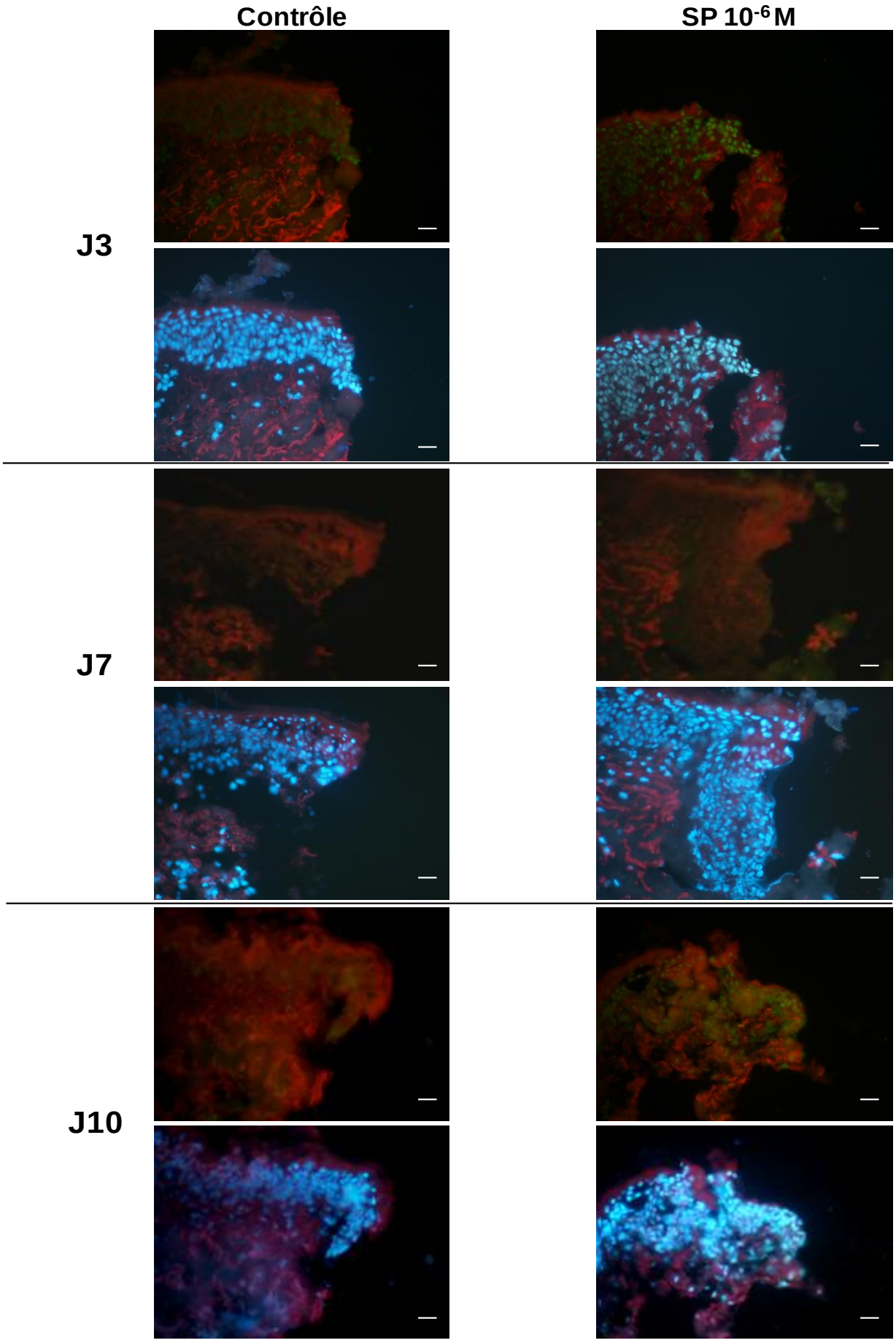


Figure 24. Exemple représentatif des immunomarquages Ki67 et coloration au DAPI obtenus au niveau des zones lésées, après 3, 7 et 10 jours de culture dans du K-SFM 1.6M de Ca^{2+} seul (contrôle) ou en présence de SP à 10^{-6} M. Barre= 100 µm.

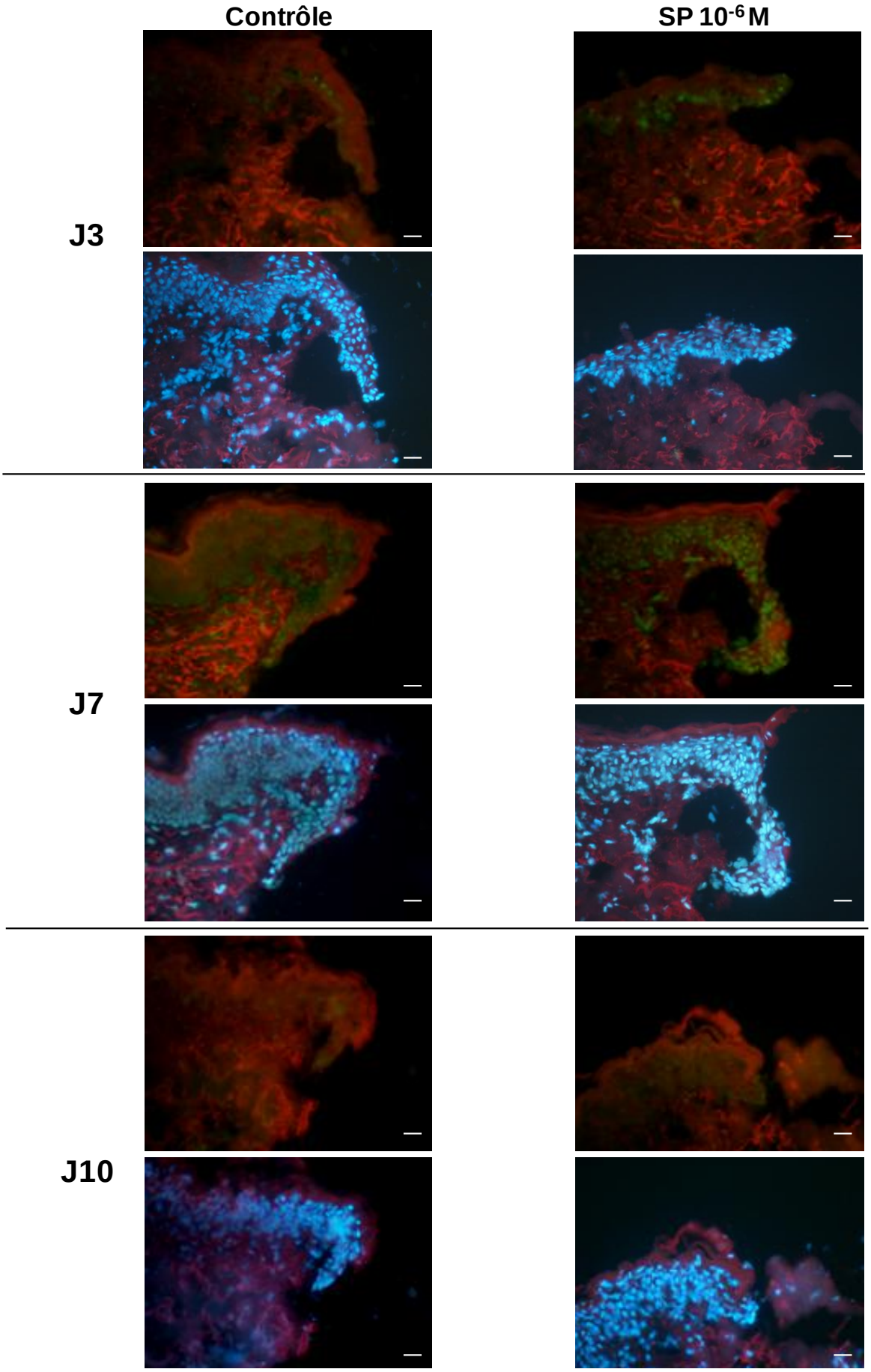


Figure 25. Exemple représentatif des immunomarquages Ki67 et coloration au DAPI obtenus au niveau des zones lésées, après 3, 7 et 10 jours de culture dans du K-SFM 1.6M de Ca^{2+} seul (contrôle) ou en présence de SP à 10^{-6} M. Barre= 100 µm.

3.3 Culture des neurones sensoriels primaires de rat (GRD)

Ces résultats ont orienté notre choix vers le DMEM/F12. La première partie de notre étude étant basée sur l'effet du système nerveux périphérique sur la cicatrisation cutanée par l'utilisation d'un modèle de co-culture explants de peau humaine lésés/ neurones sensoriels primaires de rat. Afin de valider définitivement ce choix, nous avons mis en culture les neurones sensoriels primaires de rat dans l'un ou l'autre de ces 2 milieux.

La viabilité cellulaire, déterminée à l'aide du bleu de trypan, était nettement meilleure dans le DMEM/F12.

3.4 Conclusion

Ces différentes mises au point nous ont permis de déterminer que le DMEM/F12 (3:1) était le meilleur milieu pour réaliser notre étude. De plus, cette première série de tests nous a permis d'observer qu'il n'y avait pas de différence entre les $2^{ème}$ et $4^{ème}$ jours de culture. Ainsi, pour le reste du travail nous avons réalisé nos analyses à J3, J7 et J10 de culture.

B. Effets des neurones sensoriels primaires et de certains neuromédiateurs sur le processus de cicatrisation d'un explant de peau humaine. (Article 2)

Une fois le milieu de culture établit, nous avons pu analyser l'influence des neurones sensoriels primaires et de neuropeptides tels que la SP, le CGRP, le VIP et de la neurotrophine, NGF-β sur la cicatrisation. En effet, comme nous l'avons décrit précédemment, il existe des interactions étroites entre la peau et le système nerveux périphérique et les cellules de la peau. Ils communiquent grâce à différentes molécules (neuropeptides, neurotrophines, neurohormones, …) et leurs récepteurs spécifiques, exprimés à la fois par les cellules neuronales et non neuronales. Il est bien établi que les neuromédiateurs relargués dans la peau ont un rôle immunorégulateur et peuvent exercer des actions mitogéniques ; ils peuvent

également influer sur différentes fonctions des cellules de la peau présentes lors de la cicatrisation. De plus, il est souvent observé chez des patients atteints de neuropathies (périphériques, diabétiques, …) des retards ou des mauvaises cicatrisations. Toutes ces observations suggèrent un rôle crucial des terminaisons nerveuses sur le processus de cicatrisation cutanée.

Afin de mieux comprendre le rôle du système nerveux périphérique sur le processus de cicatrisation cutanée, nous avons analysé le rôle des neurones primaires ainsi que de plusieurs molécules neuronales sur différents mécanismes du processus de cicatrisation. Nous avons pour cela créé une lésion centrale sur des explants de peau humaine puis nous avons soit ajouté les molécules étudiées à différentes concentrations dans le milieu (que nous avons préalablement déterminé), soit mis en co-culture avec des neurones primaires issus de ganglions rachidiens dorsaux de rats nouveau-nés pendant 3, 7 et 10 jours. Nous avons alors analysé les effets des neurones et des différentes molécules sur la phase prolifération de la cicatrisation (dermique et épidermique) ainsi que sur la phase de remodelage (ratio d'expression entre les collagènes de type I et III, activité des MMP-2 et -9). Nous avons enfin étudié l'effet de nos molécules sur un type cellulaire important présent lors de la cicatrisation, les myofibroblastes en analysant l'influence des neuromédiateurs sur la différentiation des fibroblastes en myofibroblastes (expression de l'α-SMA) et sur leur capacité d'adhérence sur une matrice de fibronectine.

Tous ces résultats sont présentés dans l'article soumis au *Journal of Investigative Dermatology* (JID-2013-0213).

Influence of sensory neuropeptides and NGF on human cutaneous wound healing process

J. Chéret[1], N. Lebonvallet[1], V. Buhé[1], L. Misery[1, 2], C. Le Gall-Ianotto[1, 2]

[1] Laboratory of Neurosciences of Brest (EA4685), University of Western Brittany, Brest, France

[2] Department of Dermatology, University Hospital, Brest, France

Short title: sensory neuropeptides and NGF in skin wound healing

Abbreviations: CGRP, Calcitonin Gene Related Peptide; CK6, cytokeratin 6; DRG, Dorsal Root Ganglia; ECM, ExtraCellular Matrix; HDF, human dermal fibroblasts; HDM, human dermal myofibroblasts; IHC, immunoHistochemistry; MMPs, Matrix MetalloProteinases; NGF-β, Nerve Growth Factor-beta; SN, sensory neurons; SP, substance P; SKW, Skin wound healing; α-SMA, alpha-Smooth Muscle Actin; TGF- β 1, Transforming Growth Factor-beta 1; VIP, Vasoactive Intestinal Peptide

Correspondence and reprint requests: Pr. Laurent Misery, Department of Dermatology, University Hospital, 5 avenue Foch, F-29200 Brest (tel: +33 298 22 33 15; fax: +33 298 22 33 82; e-mail: laurent.misery@chu-brest.fr)

Abstract

Close interactions exist between primary sensory neurons of the peripheral nervous system (PNS) and skin cells. The PNS may be implicated in the modulation of different skin functions as wound healing. In order to study this influence, we incubated injured human skin explants either with rat primary sensory neurons from dorsal root ganglia (DRG) or different neuropeptides (Vasoactive Intestinal Peptide or VIP, Calcitonin Gene-Related Peptide or CGRP, Substance P or SP) or the Nerve Growth Factor (NGF) at various concentrations. We then evaluated their effects on the proliferative and extracellular matrix (ECM) remodeling phases, dermal fibroblasts adhesion and differentiation into myofibroblasts. Thus, DRG and all neuromediators increased fibroblasts and keratinocytes proliferation and modulated the expression levels of type I and III collagens in favor of collagen I, particularly between the 3rd and 7th day of culture. Furthermore, the enzymatic activities of matrix metalloproteases (MMP-2 and MMP-9) were modulated. Finally, the adhesion of human dermal fibroblasts and their differentiation into myofibroblasts were promoted after incubation with neuromediators. Interestingly, the most potent concentrations for each tested molecules, were the lowest concentrations, corresponding to physiological concentrations. Thus, sensory neurons and their derived-neuropeptides as well as NGF are able to promote skin wound healing.

Introduction

The skin is densely innervated by primary afferent sensory nerve endings. Increasing evidence suggests that they participate in numerous physiological processes such as skin wound healing (SWH). Thus, delayed or impaired SWH is often described in patients with sensory peripheral neuropathy (e.g., diabetes) (Roosterman D *et al*, 2006; Blakytny R and Jude E, 2006)). The SWH process can be divided into 3 distinct stages: the inflammatory, proliferative and remodeling phases. Proteolytic activity plays a pivotal role. Thus, the levels of matrix metalloproteinases (MMPs), such as MMP-2 and MMP-9, increase within hours after injury and participate in re-epithelialization and collagen remodeling (Ravanti L and Kähäri VM, 2000). In particular, MMPs promote collagen metabolism by stimulating the replacement of collagen III by a more resistant subtype I. Collagens I and III as well as MMPs are secreted by myofibroblasts, which are the specialized activated fibroblasts of the dermis (Vedrenne N et al, 2012).

All of the cellular and biochemical events observed during SWH are regulated by mediators that orchestrate cell-cell and cell-matrix interactions. Sensory neurons (SN) and skin cells communicate *via* a variety of molecules such as neuropeptides, neurohormones and neurotrophins, and their specific receptors are expressed by both neuronal and non-neuronal skin cells. These molecules may participate in SWH (Misery L, 1997). However, the mechanistic details that govern the activity of molecules in SWH remain poorly understood, and published studies investigating such mechanisms reported conflicting results.

Thus, neuropeptides, such as the calcitonin gene related peptide (CGRP) and substance P (SP), are released upon activation by SN and are known to modulate neurogenic inflammation as well as epidermal organization and keratinocyte renewal (Roggenkamp D et al, 2013; Lebonvallet N et al, 2011; Pereira U et al, 2010). The role of the neuropeptide vasoactive intestinal peptide (VIP) in SWH has not been investigated using *in vivo* models, but its involvement has been strongly suspected due to its ability to stimulate the proliferation and migration of keratinocytes (Granoth R et al, 2000; Wollina U et al, 1997). Neuropeptides stimulate the expression of Nerve Growth Factor-β (NGF-β), a neurotrophin that is released by damaged tissues and SN. Its action on SWH remains to be elucidated.

To assess the influence of neuropeptide-derived SN on the human SWH process, we employed an organotypic model of injured human skin cocultured either with rat primary SN derived from dorsal root ganglions (DRGs) or with neuromediators. We investigated their effects on the proliferative and extracellular matrix (ECM) remodeling phases, dermal fibroblast adhesion and myofibroblast differentiation.

Results

Neuronal effects on human skin cell proliferation.

To determine whether SN participate in human SWH, mechanically damaged human skin explants were cultured in the presence or absence of rat DRGs supplemented or not with NGF-β (25 ng/ml). Skin cell proliferation and tissue remodeling were analyzed after 3, 7 and 10 days of culture (D3, D7, D10) (n=5).

First, the influence of DRGs on dermal skin cell proliferation was assessed by Ki67 immunostaining. As shown in figure 1, the presence of neurons significantly stimulated skin cell proliferation from the 3rd through the 10th day of culture compared to controls (“-D-N”) ($p<0.001$; Figure 1a). Furthermore, this effect was enhanced by the addition of NGF to the culture medium. The number of cytokeratin-6-positive keratinocytes (CK-6) was statistically higher in the early days of SWH in presence of DRGs, and this effect was improved by the exogenous addition of NGF ($p<0.01$; Figure 1b).

We investigated the influence of DRGs on tissue remodeling by analyzing the variations of the expression ratio between the collagen I and III (results are expressed as the ratio of collagen I/collagen III). Overall, the presence of DRGs tended to promote the expression of collagen I during the times assayed, and the addition of NGF exerted little influence on the expression ratio (Figure 1c). Thus, the ratio between collagen I and III after 10 days of culture was 30%/70% in control (“-D-N”) vs. 35%/65% with DRGs (“+D+N”). However, the results were not statistically significant ($p>0.05$).

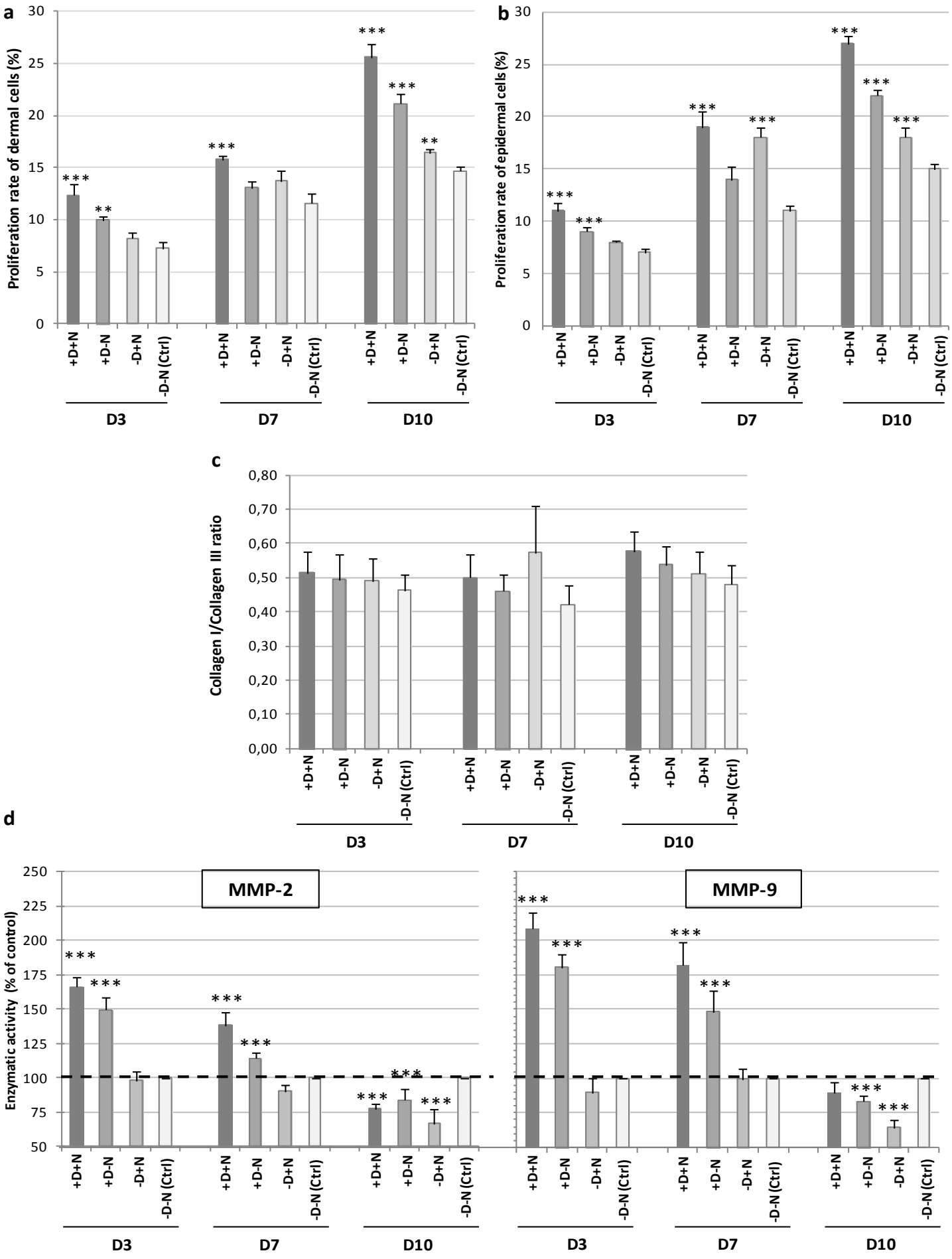


Figure 1. Influence of primary sensory neurons on skin cell proliferation (a,b) and tissue remodeling (c, d).

We analyzed the influence of DRGs on the activity of 2 enzymes known to participate in tissue remodeling: MMP-2 and MMP-9. The presence of DRGs significantly increased the activity of both MMPs ($p<0.01$) (Figure 1c). This effect was not observed in culture without DRGs, and the addition of NGF had no effect. Thus, MMP-2 activity increased by an average of 62% and 41% at D3 and D7 in "+D+N" and "+D-N" conditions, respectively (Figure 1c). Similarly, a significant increase in MMP-9 activity in culture with DRGs was observed (+107% at D3 and +74% at D7 compared to culture without DRGs) (Figure 1c). Furthermore, the maximal effect on the studied MMPs was observed on D3, and it then decreased to control values until the 10^{th} day of culture. A significant inhibition of MMP-2 and MMP-9 enzymatic activity was also observed on the last day of culture ($p<0.001$). The addition of NGF to the culture significantly promoted the enzymatic activity of both MMPs on D3 and D7 but only in cultures supplemented with DRGs.

Identification of neuromediators implicated in SWH

We performed Enzyme Immunometric Assays (EIA) to analyze the release of SP and CGRP in the supernatants of injured human skin cultures incubated with or without DRGs and exogenous NGF (n=5).

The presence of CGRP could only be detected in cultures containing DRGs. In cultures with DRGs, CGRP levels displayed a strong release at D3 but varied for the remainder of the culturing period ($p<0.01$ *versus* "-D-N"; Table 1). The addition of exogenous NGF tended to promote this release, but the results were not significant.

SP levels were detected when injured human skin explants were cultured alone or with DRG. The levels were significantly higher in the presence of DRGs ($p<0.01$ *versus* "-D-N"). The addition of NGF to the culture did not affect SP release, and the SP levels were relatively stable during the entire culture period (Table 1).

	Days of coculture (D)					
	SP (pg/ml)			CGRP (pg/ml)		
	D3	D7	D10	D3	D7	D10
+D+N	25.5 ± 6.5	12.9 ± 3.4	27.6 ± 6.3	1018.8 ± 605.2	345.4 ± 86.5	720.8 ± 527.4
+D-N	17.9 ± 8.0	28.9 ± 6.5	27.8 ± 9.5	669.6 ± 312.9	157.4 ± 50.1	294.1 ± 244.5
-D+N	8.9 ± 6.1	25.2 ± 9.7	14.7 ± 6.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
-D-N=(Ctrl)	10.9 ± 8.3	18.7 ± 5.9	14.9 ± 6.9	0.0 ± 0.0	1.6 ± 1.7	1.0 ± 1.1

Table 1. Kinetics of SP and CGRP release in the supernatant of cocultures between DRGs and injured human skin explants. At days 3 (D3), 7 (D7) and 10 (D10), supernatants were collected, and the concentrations of SP and CGRP released into the medium were calculated by EIA assays. Data are represented as the mean value ± SEM of five independent assays.

Effects of neuromediators on cell proliferation

To further elucidate the effects of neuromediators on cell proliferation, we analyzed the expression of Ki67 and CK-6 by IHC on injured human skin explants incubated with CGRP, SP or NGF at various concentrations. We completed this analysis by evaluating the role of VIP under the same conditions**.**

NGF, CGRP, SP and VIP significantly stimulated the proliferation of human skin cells, although different levels were used with dermal cells vs. epidermal cells (n=3) (Figure 2).

Dermal cell proliferation was evaluated by analyzing Ki67 expression, where the number of proliferative cells highly increased from D7 to D10 in a dose-dependent manner ($p<0.001$). This proliferative effect could be observed from the 3rd day of culture with SP ($p<0.001$; Figure 2a), whereas NGF-mediated stimulating effects at D7 and D10 were preceded by a significant inhibitory effect at D3 at all concentrations ($p<0.00$; Figure 2c). CGRP and VIP effects at D3 contrasted more with stimulatory and inhibitory effects observed concurrently, depending on the

concentration tested (+61 ± 6% and -26 ± 6% for CGRP at 10^{-10} M and 10^{-6} M, respectively; +30 ± 14% and -19 ± 3% for VIP at 10^{-8} M and 10^{-6} M, respectively; $p<0.001$; Figures 2b and 2d). The lowest concentration was typically the most effective (Figure 2).

We evaluated keratinocytes proliferation in the same experiments via CK-6 expression. The number of cells increased after D3 (an average of 5.5% for D0 *versus* 47.4% for D3 ("Ctrl"), $p<0.001$; Figures 2e, 2f, 2g, 2h). A promoting effect was observed when neuropeptides or NGF were added only from the 7th day of culture ($p<0.001$). At D3, CGRP exhibited a dose-dependent inhibitory effect (-49% and -23% at 10^{-10} M and 10^{-8} M, respectively, $p<0.001$) (Figure 2f). Except for VIP, the lowest concentration was the most effective. Thus we observed mean increases of 23 ± 3% and 45 ± 2% for SP and CGRP, respectively, at 10^{-10} M, 28 ± 1% for NGF at 10^{-12} M and 58.5 ± 1.4% for VIP at 10^{-8} M on the 7th day of culture ($p<0.001$) (Figures 2e, 2f, 2g and 2h). The increase of epidermal cell proliferation continued until the 10th day of culture for SP, NGF and VIP (Figures 2e, 2g and 2h).

Effects of neuromediators on tissue remodeling

Effect on collagen I/III expression

The influence of different molecules on the balance of expression between collagens I and III was assessed by IHC.

NGF, SP, CGRP and VIP tended to increase the collagen I/collagen III ratio (Figures 3a, 3b, 3c and 3d). SP and NGF exerted effects only at D10 and only at higher doses ($p<0.01$) (Figures 3a and 3c). Injured human skin treated with VIP displayed an increase in collagen I expression during the entire culture period ($p<0.01$), where a maximal effect was observed at 10^{-10} M (Figure 3d). CGRP effects could be dissociated into 2 phases: an increase in the ratio at early culture time points (D3, D7), followed by a decrease at the last culture time point (D10) ($p<0.01$; Figure 3b). Such an effect was characterized by the stimulation of collagen I expression at D3 and D7, followed by the stimulation of collagen III expression at D10 (data not shown).

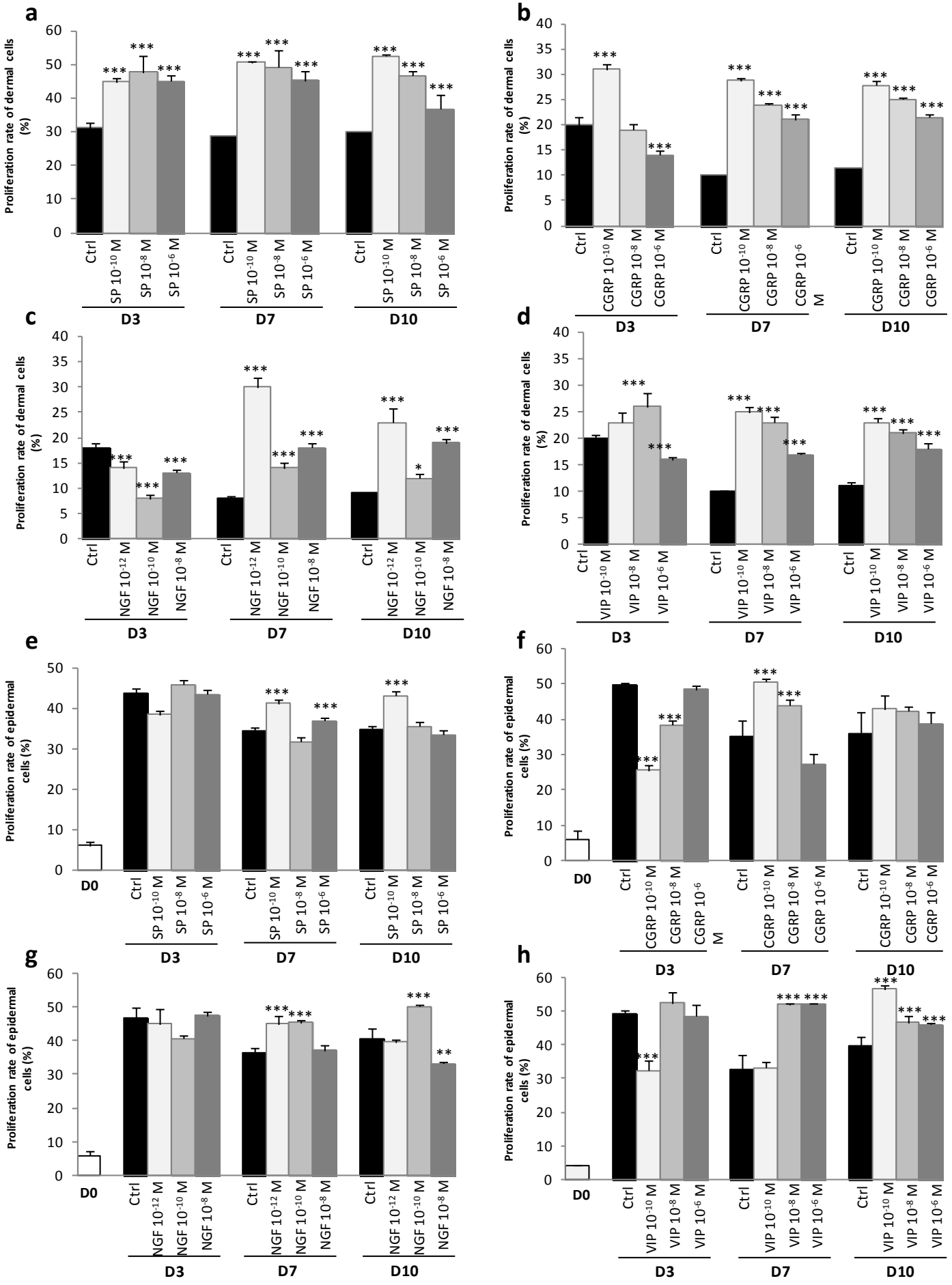


Figure 2. Influence of SP, CGRP, VIP and NGF on the proliferation of dermal and epidermal cells.

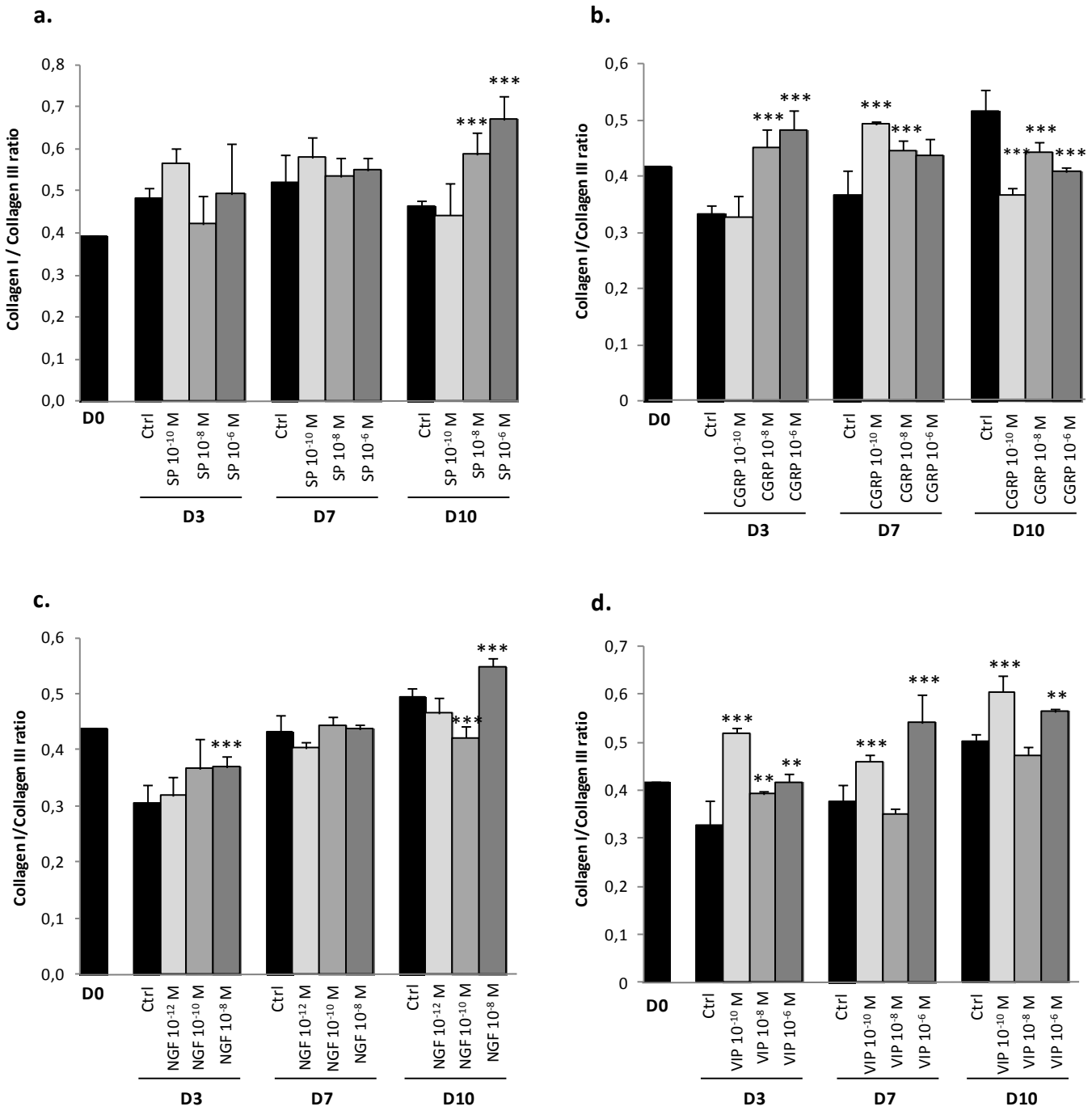


Figure 3. Influence of SP, CGRP, VIP and NGF on the expression ratio between collagen type I and collagen type III.

Effect on MMP-2 and MMP-9 enzymatic activities

Zymography for MMPs 2 and 9 was performed on injured skin biopsies that were incubated for 10 days with or without molecules at different concentrations.

SP, CGRP, VIP and NGF significantly increased MMP-2 activity compared with the untreated condition from D3. This effect lasted through D10 of culture for SP, CGRP and VIP (Figures 4a, 4b, 4d), whereas NGF was stimulating at D3 and D7 and inhibitory at D10 (Figure 4c).

MMP-9 activity similarly increased with NGF treatment ($p<0.01$) (Figure 4c). The promoting effect of neuromediators was noted only at D3 for SP and VIP and at D7 for CGRP, and it was not maintained at D10 regardless the neuromediator (Figures 4 a, 4b and 4d).

Effects of neuromediators on the adhesion capacity of human dermal fibroblasts (HDF) and their differentiation into human dermal myofibroblasts (HDM)

The influence of neuropeptides and NGF on the adhesion capacity and differentiation into HDM of HDF was assessed using HDF extracted from the same skin samples that were used in the previous experiments (n=5) (Figure 5).

The adhesion capacity of HDF was evaluated using an acid phosphatase assay on cells incubated for 1H with various concentrations of molecules. As shown in figure 5a, SP, CGRP, VIP and NGF increased the number of cells that adhered to the fibronectin coated plate ($p<0.05$). An average increase of 20% was observed for the most effective doses of each neuromediator ($p<0.05$) (Figure 5a).

48H after HDF was treated with the most effective neuromediator doses defined in previous experiments, α-SMA mRNA expression was quantified and compared to TGF-β1, which promotes the differentiation of HDF into HDM (Figure 5b). Thus, except for NGF treatment, α-SMA expression was induced to the same extent as TGF-β1 after SP, CGRP or VIP incubation ($p<0.001$). For NGF treatment, α-SMA mRNA levels were statistically higher than untreated cells (“NT”) but were weaker than after TGF-β1 treatment ($p<0.05$).

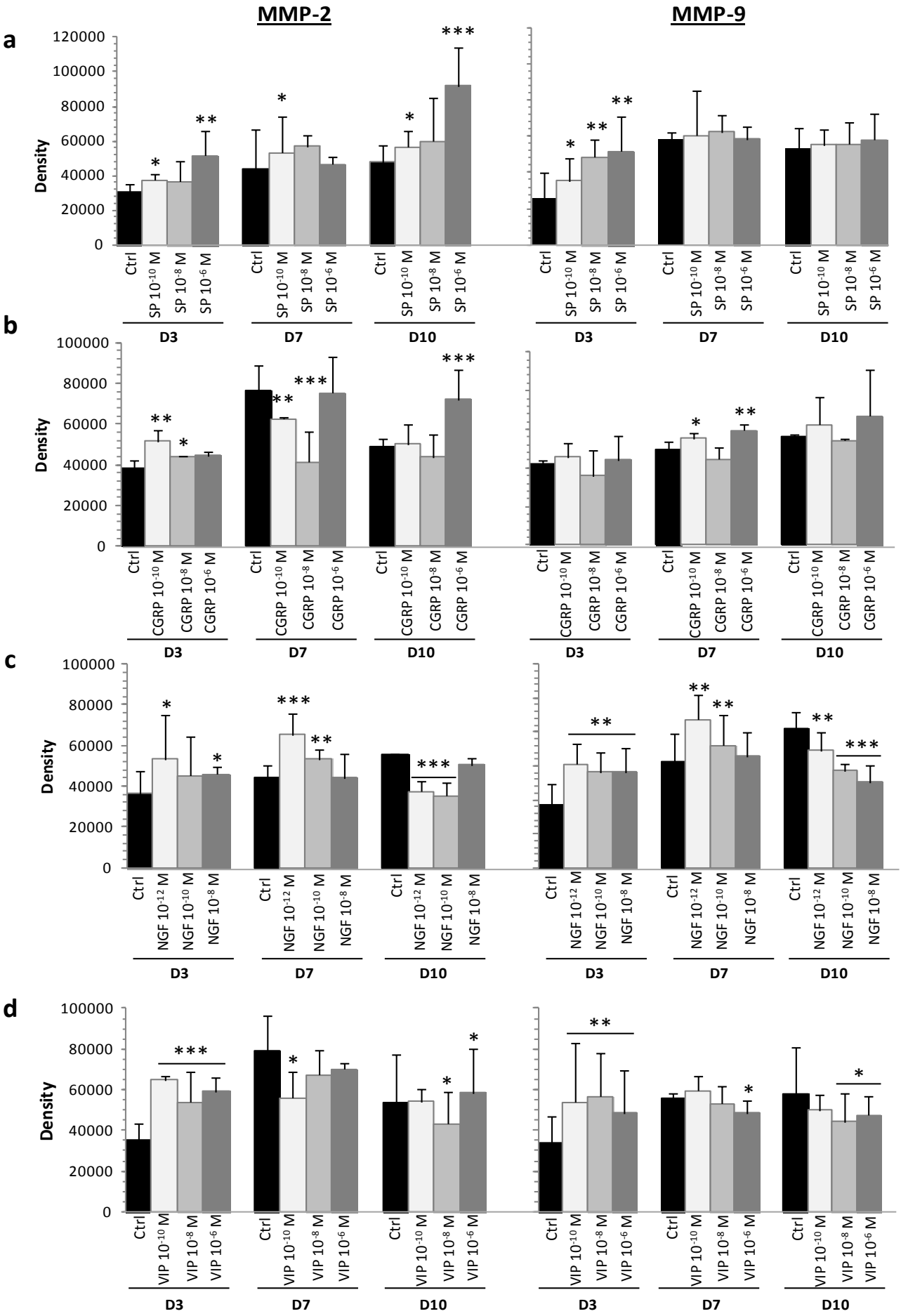


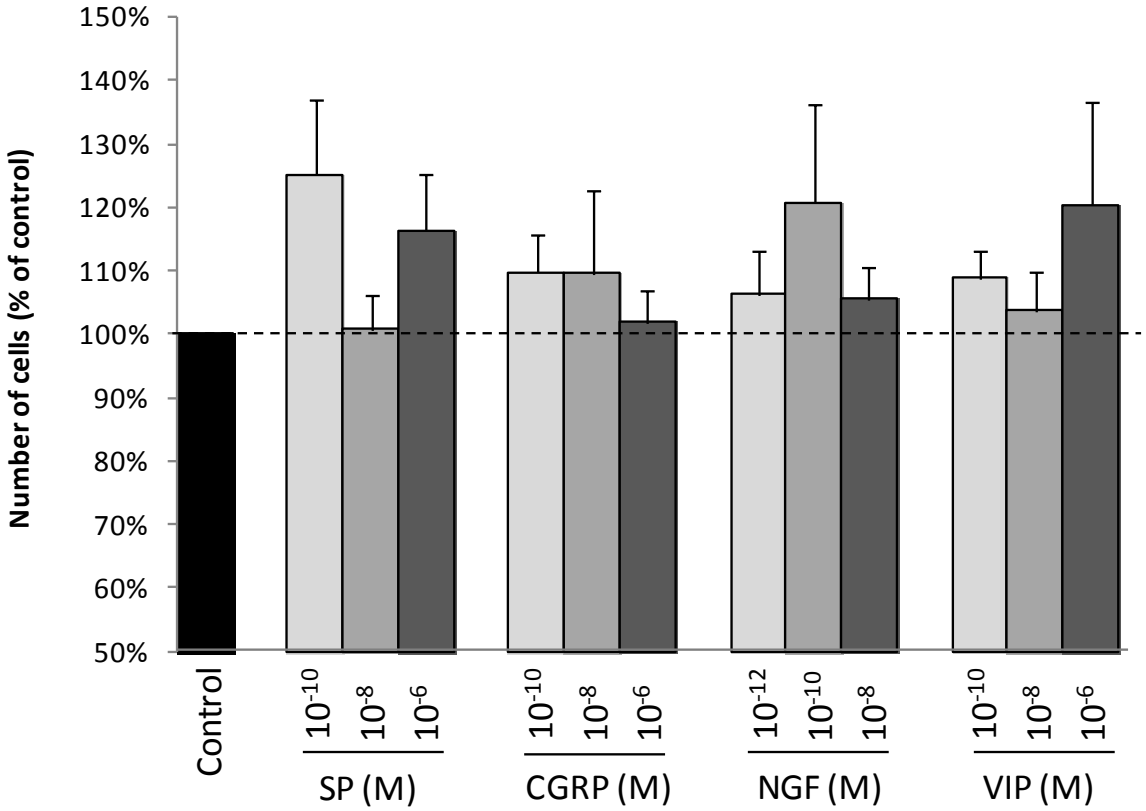
Figure 4. Influence of SP, CGRP, VIP and NGF on the enzymatic activity of MMP-2 and MMP-9.

Discussion

In summary, we demonstrated that neuropeptides and NGF play a role in SWH through complex but coherent effects on keratinocytes and fibroblasts. Hence, close interactions, which can be categorized as components of a “neuro-endocrine-immuno-cutaneous system” (NEICS) (Misery L, 1997; Brazzini B *et al*, 2003; Boulais N and Misery L, 2008), participate in the SWH process.

Different *in vivo* models have been developed to study the SWH process, but skin from animals is different from human skin. Organotypic models using reconstructed human skin are not satisfactory because they do not assess all skin cell types and lack innervation. The primary aims of our model are (i) to use human skin, (ii) to integrate all skin cell types while maintaining the organization of the skin using a 3D organization model, and (iii) to associate the sensory innervation. We demonstrated that SN promoted keratinocytes and fibroblasts proliferation. The positive influence of DRGs on epidermal morphogenesis agrees with previous studies that demonstrated that epidermal thickness and cell density were higher in re-innervated human skin explants than in non-innervated explants (Lebonvallet N *et al*, 2012; Roggenkamp D *et al*, 2013). We demonstrated that the presence of DRGs increased the number of CK-6-positive epidermal cells, which are specific markers of activated keratinocytes, suggesting that SN favored the activation of keratinocytes, specifically at the site of the injury. In parallel to the re-epithelialization process, a remodeling phase begins with the proliferation of dermal fibroblasts. Our results revealed that the presence of DRGs promoted their proliferation from the 3rd day of culture to the 10th day, which is consistent with *in vivo* observations.

a



b

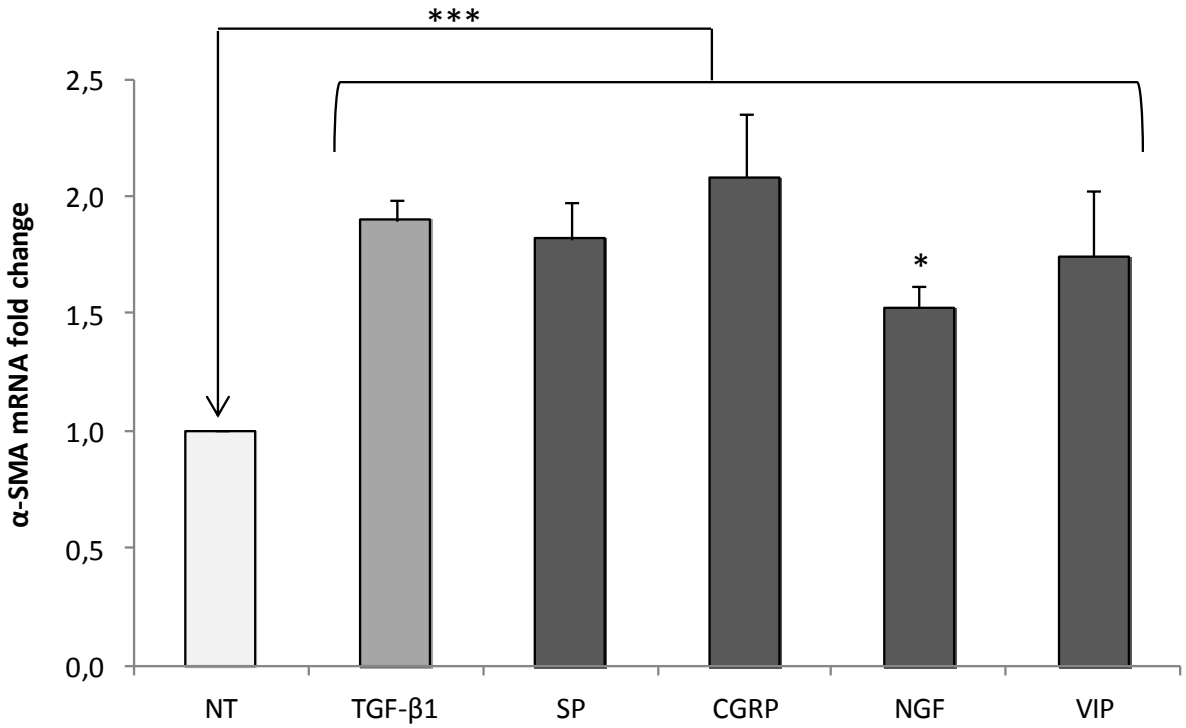


Figure 5. Influence of SP, CGRP, VIP and NGF on the adhesion capacity of human dermal fibroblasts (HDF) (a) and their differentiation into myofibroblasts (b).

The effect on skin cell proliferation was optimal at the 10th day of coculture. Lebonvallet et al and other groups have also described that a neo-innervation of dermis and epidermis by a network of dense sensory nerve fibers could be observed at D10 of coculture between skin explants and DRGs (Lebonvallet N *et al*, 2012; Roggenkamp D *et al*, 2013; Chateau Y *et al*, 2007). We could not exclude a direct interaction between neurites and epidermal cells, thus the effects of SN are likely mediated by the release of soluble factors.

The EIA assays performed on coculture supernatants were able to detect the presence of SP and CGRP. Notably, although SP was detected in culture without DRG, CGRP was only present in the coculture medium. These results confirmed the observation that human skin cells can synthesize and release SP, whereas CGRP (α and β) is exclusively released by sensory neurons. An independent study demonstrated that human keratinocytes released CGRPβ (Hou Q *et al*, 2011), but the experiments were performed with skin from locations afflicted by postherpetic neuralgia. Furthermore, the levels of CGRP quantified in the coculture supernatants were much higher than the levels of SP throughout the culture. This suggests a dominant role for CGRP compared to SP in the SWH process in our model.

SP and CGRP were the most prominent neuropeptides detected in the coculture supernatants. Although our experiments could not detect peaks in the release of significant levels of NGF, the increase of the optical density in the presence of DRGs allows us to investigate the role of this neuroptrohin in the SWH process in our model. To elucidate the role of each molecule in skin proliferation during the wound healing process, we incubated injured human skin explants with SP, CGRP or NGF. We added VIP to the experiments because VIP is overexpressed in DRGs after injury, but its role in wound healing has never been clearly demonstrated (Granoth R *et al*, 2000; Wollina U *et al*, 1997; Rayan GM *et al*, 1995).

SP, CGRP, NGF or VIP stimulated the proliferation of both epidermal and dermal cells in a dose-dependent manner. Numerous studies have demonstrated the promoting role of SP, CGRP and VIP on keratinocyte proliferation but only in rat or murine models and in *in vitro* monoculture models. In the latter models, CGRP, SP and VIP stimulated the proliferation and migration of both human- (HaCaT or primary cells) and murine-cultured keratinocytes (Tanaka T *et al*, 1988; Dallos A *et al*, 2006; Takahashi K *et al*, 1993, Marastoni M *et al*, 1995). The positive effect of NGF on epidermal cell proliferation observed in our organotypic human model is consistent

with previous studies, which demonstrated that a topical application of NGF accelerated the rate of SWH by stimulating keratinocyte proliferation and by protecting the cells from apoptosis *via* an autocrine loop (Nithya M *et al*, 2003; Pincelli C *et al*, 2000; DiMarco E *et al*; 1993).

Our results propose a model that suggests that neuropeptides and NGF influence the human epidermis during the SWH process. In particular, the promoting role of these molecules on the activation of keratinocytes, revealed by the expression of CK-6, has only been previously demonstrated, to our knowledge, in *in vivo* rat models (Martinez-Martinez E *et al*, 2011; Juarranz MG *et al*, 2001; Li WW *et al*, 2010).

The effect of NGF on HDF proliferation is quite surprising and contradicts other reports. Indeed, studies performed on HDF cultures highlighted that the exogenous administration of NGF failed to stimulate HDF proliferation but influenced their migration (Gan H *et al*, 2009; Palazzo E *et al*, 2011). This difference may be explained by the fact that (i) we employed a more complex model (3D versus 2D monoculture) and (ii) their studies analyzed NGF effects at the earliest phases of wound healing (up to 3 days, the time when we initiated ours). However, NGF inhibitory effects at D3 remain quite difficult to explain. It is possible that endogenous NGF production, combined with exogenous NGF, may stimulate a negative feedback. Unsurprisingly, NGF promoted the differentiation of HDF into myofibroblasts by inducing the expression of α-SMA, which correlated with a stimulation of HDF proliferation (Palazzo E *et al*, 2011; Micera A *et al*, 2001, Micera A *et al*, 2007). Furthermore, these effects on HDF were associated with increased adherence. During wound healing, the cell adhesion process is essential for healing to progress and is vital for dermal cell migration and differentiation (Martin P, 1997).

The promotion of DF proliferation, adherence and differentiation into HDM were also observed for all sensory neuropeptides tested. Whereas the potent proliferative effects of SP that we observed confirmed previously observed data, the observed effects for CGRP and VIP were novel (Scholzen T *et al*, 1998; Parenti A *et al*, 1996; Nilsson J *et al*, 1985). Indeed, their effects have only been described in *in vitro* rat and mouse fibroblast models for CGRP (Dahl J *et al*, 2007; Yule KA and White SR, 1999) and in human fibroblasts-like synovial cells for VIP (Carrion M *et al*, 2011). Consequently, their influence on the DF to DM transition has never been investigated. Furthermore, our study indicates that SP may mediate HDF

differentiation by directly governing α-SMA expression, not just by up-regulating TGF-β1 mRNA expression, as shown in a previous study (Hu D *et al*, 2002).

Hence, sensory neuropeptides and NGF influenced the proliferation of connective tissue. To allow different cells to migrate and proliferate during SWH, the ECM must degrade. MMP-2 and MMP-9 are thought to play important roles in this process (Raventi L and Kähäri VM, 2000). Here, we showed that the enzymatic activity of these two MMPs increased in the presence of DRGs, but only in the early phases of the wound healing (D3 and D7), and was inhibited from the 10th day of coculture. Similar analyses with injured human skin explants incubated with each of the molecules demonstrated that NGF, SP, CGRP and VIP increased MMP-2 and MMP-9 activities in a dose-dependent manner. Similar experiments have never been performed using a 3D model of SWH for CGRP and VIP, but similar conclusions were suggested from studies on cell lines (Fernandez-Martinez AB *et al*, 2010; El Zein J *et al*, 2008; Guan CX *et al*, 2007). SP and NGF have been more extensively studied. Thus, in a rat model of burn-induced acute lung injury, high MMP-9 levels correlated with elevated levels of SP (Sio SW *et al*, 2010); however, in contrast with our observations, this study attained these results using an inflammatory SWH process. Increased MMP-9 activity was also described for NGF in several *in vitro* models (Micera A *et al*, 2007; Dagnell C *et al*, 2007; Khan KM *et al*, 2002). Furthermore, although the enhancing effect of SP on MMP-2 activity agrees with previous reports, the increased activity of MMP-2 after NGF incubation has only been described in a few studies (Hecker-Kia A *et al*, 1997; Xie L *et al*, 2010; Tominaga M *et al*, 2009; Park MJ *et al*, 2007). The inhibitory effect observed at D10 of coculture could be explained by the fact that HDF releases molecules, such as TGF-β1, that are known to inhibit MMP activity when HDF differentiates into HDM (Zeng G *et al*, 1996). Interestingly, the finding that DRGs and sensory neuron-derived neuropeptides stimulated the activity of MMP-2 and MMP-9 suggests that SN may promote their own regeneration during SWH. Indeed, increasing evidence indicates that these MMPs are not only involved in ECM turnover but may also exert beneficial effects during neuronal regeneration, in part by stimulating the conversion of pro-NGF to mature NGF, a key player in innervation (Shubayev VI and Myers RR, 2004; Tominaga M *et al*, 2009).

The early phase of SWH is also characterized by the synthesis of collagen III by DM, which is progressively replaced by collagen I, which in turn is more resistant. We demonstrated that DRGs, SP, CGRP and VIP influenced the collagen I/III ratio in favor of collagen I production from the earliest days of tissue reparation. Previous studies employed cultured dermal fibroblasts to assess the effects of NGF on collagen expression but were not able to observe variations in collagen levels (Micera A *et al*, 2001; Gan H *et al*, 2009). Here, we demonstrated a role for NGF. These findings corroborate the hypothesis developed by Nithya *et al* suggesting that NGF enhances the synthesis and deposition of collagens in the wound site (Nithya M *et al*, 2005). To our knowledge, this is the first demonstration that NGF participates in the SWH process and that VIP affects collagen I and/or collagen III production during SWH. We confirmed that CGRP inhibited collagen III accumulation and increased collagen I production (Wang J *et al*, 2006; Zhao Z *et al*, 2013).The results obtained with SP confirmed previous works, which demonstrated that SP *via* its receptor, NK-1R, promotes collagen remodeling (Fong G *et al*, 2013; Carlsson O *et al*, 2011; Burssens P *et al*, 2005; Salo P *et al*, 2007). Recently, experiments with human tenocytes demonstrated that this effect was mediated by increased MMP-3 expression, which is known to degrade collagen III and promote MMP-9 activity (Fong G *et al*, 2013).

Materials and methods

Primary culture and coculture conditions

Human skin explants (HSE; punches 6mmØ) were obtained from abdominoplasties from adult women. Human experiments and sample collections adhered to the local agreement referenced under DC 2008-214. Injured HSE were obtained by performing an internal injury on the 6mmØ HSE with a smaller punch of 3mmØ. In some experiments, HSE were cocultured with primary SN (PSN) that were extracted from DRGs of neonatal Wistar rats, according to the protocol described previously (Lebonvallet N et al, 2012). The protocol followed the principles expressed in the Declaration of Helsinki and was approved by the veterinary service reference A29115. DRGs were co-cultured with injured HSE for 3, 7, and 10 days in an air-liquid interface in a maintenance medium comprised of a DMEM-F12 3:1 mixture (Lonza, Emerainville, France), insulin (5 µg/ml; Sigma-Aldrich, Saint Quentin

Fallavier, France), and hydrocortisone (400 ng/ml; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). In some conditions, NGF-β was added to the culture (25 ng/ml; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). In a simple culture, injured HSE were maintained in the same medium described above and supplemented with SP, CGRP or VIP (PolyPeptide Laboratories, Strasbourg, France) at 10^{-10} M, 10^{-8} M or 10^{-6} M or NGF-β (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) at 10^{-12} M, 10^{-10} M or 10^{-8} M for 3, 7 and 10 days of culture. Human dermal fibroblasts (HDFs) were extracted from the same skin that was acquired from donors for a skin culture. The HDF medium culture was comprised of DMEM containing 10% of fetal bovine serum (FBS, PAA Laboratories, Les Mureaux, France). All cultures were maintained at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere.

Immunohistochemistry

HSE were fixed in 4% paraformaldehyde and frozen in isopentane chilled with liquid nitrogen. HSE sections (HSES) were obtained by cutting a cryostat (10 µm) and permeabilizing with Triton X-100 and saponin (0.05% and 0.1%, respectively, in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)). Non-specific binding sites were blocked with 2.5% fetal calf serum (PAA Laboratories, Les Mureaux, France) and 2.5% goat serum (Abcam, Paris, France) in 0.1% Tween-20 in DPBS for 15 min. Primary and secondary antibodies were incubated with 1% goat serum and 0.01% Tween-20 in DPBS for 2 h at room temperature. The primary antibodies used were (i) rabbit anti-Ki67 (1:100), (ii) mouse anti-Cytokeratin-6 (1:100), (iii) rabbit anti-collagen III (1:250; Abcam, Paris, France), and (iv) mouse anti-collagen IA (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Goat anti-rabbit immunoglobulin G chromeo 488 (1:1000; Abcam, Paris, France), goat anti-mouse FITC (1:1000, Abcam, Paris, France) and goat anti-mouse TRITC antibodies (1:500; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) were used as secondary antibodies. A negative control was obtained by omitting the primary antibody, and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 100 µg/ml) was used to stain nuclei. Fluorescence analysis was performed using an Axiostar plus system (Carl ZEISS, Microlmaging Gmbh, Germany).

Collagen I/III fluorescence intensity measurement

After immunohistochemistry, collagen fluorescence intensity was measured by selecting an area of 628*628 pixels at the lesion area using the Paint.net software (Rick Brewster and contributors, Microsoft developer division) and the collagen fluorescence intensity of this area was analyzed using the ImageJ software by measuring RGB, as described previously (Haviarova Z et al, 2008; Vrekoussis T et al, 2009). The mean red intensity for collagen I and the mean green intensity for collagen III were collected individually, and a collagen I/III ratio was determined for each condition.

Gelatin Zymography

Supernatant samples (25 µl) were collected at different coculture times (3, 7 or 10 days) and mixed with 5 µl of non-reducing sample buffer (4% SDS, 0,15 M Tris HCl, pH 6,8, 20% v/v glycerol and 0,5% w/v bromophenol blue) and separated on a 10% polyacrylamide gel containing 0,1% gelatin. After electrophoresis, gels were washed three times with 2,5% Triton X-100. Substrate digestion was performed by incubating the gel in 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, containing 200 mM NaCl and 5 mM $CaCl_2$ at 37°C for 16 to 20 h. The gel was stained with 0,1% Coomassie Brilliant Blue for 1 h, and the location of gelatinolytic activities were detected as clear bands after discoloration with distilled water containing 30% methanol and 10% acetic acid. Band quantification was performed by densitometric analysis using the ImageJ software.

EIA Assay

At different coculture times (3, 7 or 10 days), the supernatants were collected and stored at -80°C until use. The levels of SP and CGRP released into the medium were assessed using commercially available EIA (Enzyme Immunometric Assay) kits, and NGF levels were assessed using a sandwich ELISA kit following the manufacturer's recommendations. We used the Substance P EIA kit (Cayman, Ann Arbor, MI, USA), the rat CGRP EIA kit (SpiBio, Montigny le Bretonneux, France) and the Chemikine™ NGF sandwich ELISA kit (Millipore, Guyancourt, France). The detection limit of the CGRP and SP assays were 3.9 pg/ml and 15.6 pg/ml, respectively, for NGF. The optical density of each sample was determined by analyzing each plate at 405 nm for SP and CGRP and at 450 nm for NGF, and sample concentrations were quantified by plotting the ODs of the samples on a standard curve.

Myofibroblast differentiation

HDF were plated in 12-well plates previously coated with fibronectin (10 µg/ml) at 10000 cells/well for 48 H. Cloning rings were inserted into each well before the cells were plated to mimic a scratch. Medium containing neuropeptides or NGF at efficient concentrations, which were previously determined with explanted skin cultures, was added to the cells (500 µl/well), and the cloning rings were removed. All culture conditions were supplemented with 10 µg/ml of mitomycin C to halt cellular proliferation. A positive control for myofibroblast differentiation was performed in parallel by adding 4 ng/ml of TGF-β1 to the medium with mitomycin C. Each condition was performed in triplicate. After 24 or 48 H, cells were rinsed twice with DPBS and stored at -80°C until mRNA extraction.

Reverse Transcription and Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT and QPCR)

Total cellular RNA was extracted from cultures using the RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), and genomic DNA was removed from total RNA using the RNase-free DNase set (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA synthesis was performed for each total RNA (1 µg) sample using the Qiagen Reverse-Transcription system (Qiagen, Courtaboeuf, France). cDNAs were stored at -20°C until use. The expression of the α-Smooth Muscle Actin (α-SMA) gene, a marker of myofibroblasts, in HDF was analyzed by QPCR. cDNA for each sample was used as a template in PCR reactions using buffers and instructions according to the manufacturer's protocol. Reactions contained 1X SYBR Green Supermix (PE Applied Biosystems Inc, Villebon sur Yvette, France) and 0.1 µM of oligonucleotide primer pairs designed to amplify the following genes: 18S 5' GGCTACCACATCCAAGGAAGG 3' (sense) and 5' CCAATTACAGGGCCTCGAAAG 3' (antisense) and α-SMA 5' CCGACCGAATGCAGAAGGA 3' (sense) and 5'ACAGAGTATTTGCGCTCCGAA3' (antisense). cDNA from human fibroblasts activated by TGF-β1 (4 ng/ml) served positive controls for α-SMA expression. Amplifications were performed using the following protocol: 95°C for 2 minutes, 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute, 95°C for 30 seconds in the ABI Prism 7000 Sequence Detector (PE Applied Biosystems Inc, Villebon sur Yvette, France) to record fluorescence measurements. Each reaction was performed in triplicate, and five independent

experiments were analyzed. Cycle numbers were normalized to an 18S control performed simultaneously using the Ct comparative method (Schmittgen TD, Livak KJ, 2008). Targets quantities were normalized to 18S RNA and calibrated using TGFβ1-activated human fibroblasts, which were defined as a value of 1. All quantities were expressed as n-fold relative to the calibrator.

Adhesion assay

HDFs were cultured during 24 H in DMEM supplemented with 0.5% FBS. After dissociation with PBS/EDTA (2 mM), cells were rinsed twice with DMEM containing 0.5% of Bovine Serum Albumin (BSA). Then, cells (20 00 cells/ml) were incubated with SP, CGRP, VIP or NGF at different concentrations in 1.5-ml eppendorf tubes under constant agitation for 1 H, and 100 µl/well was plated in 96-well plates previously coated with fibronectin (10 µg/ml). After 1 H at 37°C, cells were rinsed three times with DPBS, and their adhesion capacity was evaluated using an Acid Phosphatase Assay kit (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) according to the manufacturer's instructions. Acid phosphatase activity was determined by comparing the absorbance at 405 nm with the absorbance of the standard according to the following equation: ((A405[sample] – A405[blank]) x 0.05 x 0.3 x dilution factor) / (A405[standard] x time x volume enzyme) = Units of Acid phosphatase/ml. Each condition was performed in triplicate, and the mean of five independent experiments was calculated.

Conflict of interest statement: The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments: We thank Fondation Le Lous for financial support and Dr Stanislas Valentin and Pr Weiguo Hu for providing skin samples.

References

Blakytny R, Jude E (2006).The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med*. 23(6):594-608.

Boulais N, Misery L (2008). The epidermis: a sensory tissue. *Eur J Dermatol*. 18:119‑27.

Brazzini B, Ghersetich I, Hercogova J, *et al* (2003).The neuro-immuno-cutaneous-endocrine network: relationship between mind and skin. *Dermatol Ther* 16:123-31.

Burssens P, Steyaert A, Forsyth R *et al (2005)*. Exogenously administered substance P and neutral endopeptidase inhibitors stimulate fibroblast proliferation, angiogenesis and collagen organization during Achilles tendon healing. *Foot Ankle Int* 26:832-9.

Carlsson O, Schizas N, Li J *et al* (2011). Substance P injections enhance tissue proliferation and regulate sensory nerve ingrowth in rat tendon repair. *Scand J Med Sci Sports.* 21:562-9.

Carrión M, Juarranz Y, Pérez-García S *et al* (2011). RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide. *Arthritis Rheum.* 63:1626-36

Chateau Y, Dorange G, Clement JF *et al* (2007). In Vitro Reconstruction of Neuro-Epidermal Connections*. J Invest Dermatol* 127: 979-81.

Dagnell C, Kemi C, Klominek J *et al (2007).* Effects of neurotrophins on human bronchial smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Transl Res* 150:303-10.

Dahl J, Li J, Bring DK-I *et al* (2007). Intermittent pneumatic compression enhances neurovascular ingrowth and tissue proliferation during connective tissue healing: a study in the rat. *J Orthop Res* 25:1185‑92.

Dallos A, Kiss M, Polyánka H *et al* (2006). Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and galanin on the production of nerve growth factor and inflammatory cytokines in cultured human keratinocytes. *Neuropeptides* 40:251‑63.

Di Marco E, Mathor M, Bondanza S *et al* (1993). Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop. *J Biol Chem* 268:22838-46.

El Zein N, Badran B, Sariban E (2008). VIP differentially activates beta2 integrins, CR1, and matrix metalloproteinase-9 in human monocytes through cAMP/PKA,

EPAC, and PI-3K signaling pathways via VIP receptor type 1 and FPRL1. *J Leukoc Biol.* 83:972-81.

Fernández-Martínez AB, Bajo AM, Isabel Arenas M *et al* (2010).Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces malignant transformation of the human prostate epithelial cell line RWPE-1.*Cancer Lett* 299:11-21.

Fong G, Backman LJ, Hart DA *et al (2013).*Substance P enhances collagen remodeling and MMP-3 expression by human tenocytes. *J Orthop Res* 31:91-8.

Gan H, Xie H, Chen X, Luo J (2009).[Effects of NGF on proliferation, mitotic cycle, collagen synthesis and migration of human dermal fibroblasts in vitro]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 23:1350-4.

Granoth R, Fridkin M, Gozes I (2000). VIP and the potent analog, stearyl-Nle(17)-VIP, induce proliferation of keratinocytes. *FEBS Lett* 475:78‑83.

Guan CX, Liu YP, Cui YR *et al* (2007). [Effect of calcitonin-gene-related peptide on MMP-9 production in human bronchial epithelial cells].*Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 32:771-5.

Haviarova Z, Janega P, Durdik S *et al* (2008). Comparison of collagen subtype I and III presence in varicose and non-varicose vein walls. *Bratisl Lek Listy*.109:102-5.

Hecker-Kia A, Kolkenbrock H, Orgel D *et al* (1997). Substance P induces the secretion of gelatinase A from human synovial fibroblasts. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.*35:655-60.

Hou Q, Barr T, Gee L *et al* (2011). Keratinocyte expression of calcitonin gene-related peptide β: implications for neuropathic and inflammatory pain mechanisms. Pain 152:2036‑2051.

Hu D, Chen B, Zhu X *et al (2002).* [Substance P up-regulates the TGF-beta 1 mRNA expression of human dermal fibroblasts in vitro].*Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.*18:234-6.

Juarranz MG, Bodega G, Prieto JC, Guijarro LG (2001).Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates rat prostatic epithelial cell proliferation. *Prostate.* 47:285-92.

Khan KM, Falcone DJ, Kraemer R (2002). Nerve growth factor activation of Erk-1 and Erk-2 induces matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells.*J Biol Chem* 277:2353-9.

Lebonvallet N, Boulais N, Le Gall C *et al* (2012). Effets of the re-innervation of organtypic skin explant on the epidermis.*Exp Dermatol* 21: 156-8.

Li WW, Guo TZ, Li XQ *et al* (2010).Fracture induces keratinocyte activation, proliferation, and expression of pro-nociceptive inflammatory mediators.*Pain* 151:843-52

Li AK, Koroly MJ, Schattenkerk ME, Malt RA, Young M (1980). Nerve growth factor: acceleration of the rate of wound healing in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*l 77:4379-4381.

Marastoni M, Scaranari V, Fantini F *et al* (1995). Effects of peptide T derivatives on the proliferation of cultured human keratinocytes. Arzneimittelforschung 45:891-3.

Martin P (1997).Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. Science. 276:75-81.

Martínez-Martínez E, Galván-Hernández CI, Toscano-Márquez B *et* al (2012). Modulatory role of sensory innervation on hair follicle stem cell progeny during wound healing of the rat skin. *PLoS One*.7:e36421.

Micera A, Vigneti E, Pickholtz D *et al*. (2001). Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:6162-7.

Micera A, Lambiase A, Stampachiacchiere B *et al* (2007). Nerve growth factor has a modulatory role on human primary fibroblast cultures derived from vernal keratoconjunctivitis-affected conjunctiva. *Mol Vis* 13:981-7.

Misery L. (1997). Skin, immunity and the nervous system. *Br J Dermatol.* 137(6):843-50.

Nilsson J, Von Euler AM, Dalsgaard CJ (1985). Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 315:61‑3.

Nithya M, Suguna L, Rose C (2003). The effect of nerve growth factor on the early responses during the process of wound healing. *Biochim Biophys Acta* 1620:25-31.

Palazzo E, Marconi A, Truzzi F (2011). Role of neurotrophins on dermal fibroblast survival and differentiation. *J Cell Physiol* 227:1017-25.

Parenti A, Amerini S, Ledda F *et al (*1996). The tachykinin NK1 receptor mediates the migration-promoting effect of substance P on human skin fibroblasts in culture. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol* ;353:475‑81.

Park YM, Kim CW (1999). The effects of substance P and vasoactive intestinal peptide on interleukin-6 synthesis in cultured human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 22:17‑23.

Park MJ, Kwak HJ, Lee HC *et al* (2007).Nerve growth factor induces endothelial cell invasion and cord formation by promoting matrix metalloproteinase-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and AP-2 transcription factor. *J Biol Chem.* 19;282:30485-96

Pincelli C, Marconi A (2000). Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 22:71-9.

Ravanti L, Kähäri VM (2000). Matrix metalloproteinases in wound repair. *Int J Mol Med* 6:391-407.

Rayan GM, Johnson C, Pitha J (1995). Vasoactive intestinal peptide and nerve growth factor effects on nerve regeneration. *J Okla State Med Assoc* 88:337‑41.

Roggenkamp D, Köpnick S, Stäb F *et al (*2013). Epidermal Nerve Fibers Modulate Keratinocyte Growth via Neuropeptide Signaling in an Innervated Skin Model. *J Invest Dermatol* [Epub ahead of print]

Roosterman D, Goerge T, Schneider SW *et al*.(2006). Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev*.86(4):1309-79.

Salo P, Bray R, Seerattan R *et al* (2007). Neuropeptides regulate expression of matrix molecule, growth factor and inflammatory mediator mRNA in explants of normal and healing medial collateral ligament. *Regul Pept.* 5;142:1-6.

Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW *et al* (1998). Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol* 7:81‑96.

Shi CM, Qu JF, Cheng TM (2003). Effects of the nerve growth factor on the survival and wound healing in mice with combined radiation and wound injury. *J Radiat Res* 44:223-8.

Shubayev VI, Myers RR (2004).Matrix metalloproteinase-9 promotes nerve growth factor-induced neurite elongation but not new sprout formation in vitro. *J Neurosci Res* 15;77:229-39.

Schmittgen TD, Livak KJ (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 3:1101-8.

Sio SW, Moochhala S, Lu J *et al (2010).* Early protection from burn-induced acute lung injury by deletion of preprotachykinin-A gene. *Am J Respir Crit Care Med* 181:36-46

Takahashi K, Nakanishi S, Imamura S (1993). Direct effects of cutaneous neuropeptides on adenylyl cyclase activity and proliferation in a keratinocyte cell line: stimulation of cyclic AMP formation by CGRP and VIP/PHM, and inhibition by NPY through G protein-coupled receptors. *J Invest Dermatol* 101:646‑51.

Tanaka T, Danno K, Ikai K *et al* (1988). Effects of substance P and substance K on the growth of cultured keratinocytes. J Invest Dermatol 90:399‑401.

Tominaga M, Ogawa H, Takamori K (2009). Histological characterization of cutaneous nerve fibres containing gastrin-releasing peptide in NC/Nga mice: an atopic dermatitis model. *J Invest Dermatol* 129:2901‑5.

Vedrenne N, Coulomb B, Danigo A, Bonté F, Desmoulière A (2012).The complex dialogue between (myo)fibroblasts and the extracellular matrix during skin repair processes and ageing. *Pathol Biol (Paris).*60(1):20-7

Vrekoussis T, Chaniotis V, Navrozoglou I *et al (2009).* Image analysis of breast cancer immunohistochemistry-stained sections using ImageJ: an RGB-based model. *Anticancer Res* 29:4995-8.

Wang J, Qiu X, Kulkarni A, Hauer-Jensen M (2006)**.** Calcitonin gene-related peptide and substance P regulate the intestinal radiation response. *Clin Cancer Res* 12:4112-8.

Wollina U, Huschenbeck J, Knöll B *et al* (1997). Vasoactive intestinal peptide supports induced migration of human keratinocytes and their colonization of an artificial polyurethane matrix. *Regul. Pept.* 70:29‑36.

Xie L, Moroi Y, Tsuji G *et al (*2010). CD10-bearing fibroblast inhibits matrigel invasive potency of interleukin-1α-producing squamous cell carcinoma by diminishing substance P levels in the tumor microenvironment. *Cancer Sci* 101:2570-8

Yule KA, White SR (1999). Migration of 3T3 and lung fibroblasts in response to calcitonin gene-related peptide and bombesin. *Exp Lung Res* 25:261‑73.

Zhao Z, Fu X, Zhang G *et al* (2013).The influence of RAMP1 overexpression on CGRP-induced osteogenic differentiation in MG-63 cells in vitro: an experimental study. *J Cell Biochem* 114:314-22.

Figure 1. Influence of primary sensory neurons (PSN) on skin cell proliferation and tissue remodeling. PSN extracted from rat DRGs were cocultured with injured human skin explants for 10 days. At D3, D7 and D10 we evaluated the proliferation of dermal cells (a) and epidermal cells (b), the expression ratio between collagen I and collagen III (c), and the enzymatic activities of MMP-2 and MMP-9 (d). (a) Kinetics of Ki67 immunoreactive dermal cells and (b) of CK-6-positive epidermal cells are expressed as a percentage of total cells evaluated by counting DAPI-stained nuclei in the dermis of human skin sections (HSE, 10 µm). (c) Expression kinetics of the ratio collagens I/III assessed after IHC with anti-collagen III (1:250) and anti-collagen IA (1:1000) on HSE (10 µm). The mean red intensity for collagen I and the mean green intensity for collagen III were measured using the ImageJ software and collected individually. The collagen I/III ratio was assessed for each condition. (d) Kinetics of MMP-2 and MMP-9 enzymatic activities. At D3, D7 and D10, supernatant samples were collected and separated on a zymography gel. After electrophoresis and discoloration, the densities of scanned gels were analyzed using ImageJ software. All the results are represented as the mean of 5 experiments ± SEM, which were performed in duplicate for each experimental condition. ** = P< 0.01; *** = p< 0.001. Ctrl = control; D = DRG; N = NGF (25 ng/ml); + = with; - = without.

Figure 2. Influence of SP, CGRP, VIP and NGF on the proliferation of dermal and epidermal cells. Injured human skin explants were incubated or not (Ctrl = control) with SP, CGRP, or VIP (at 10^{-10} M, 10^{-8} M or 10^{-6} M) or NGF at 10^{-12} M, 10^{-10} M or 10^{-8} M for 10 days. At D3, D7 and D10 the proliferation of dermal cells (a, b, c, d) and epidermal cells (e, f, g, h) was evaluated by IHC on human skin sections (10 µm). (a, b, c, d) Kinetics of Ki67 immunoreactive dermal cells and (e, f, g, h) of CK-6-positive epidermal cells expressed as a percentage of total cells evaluated by counting DAPI-stained nuclei in the dermis.The results are represented as the mean of 3 experiments ± SD, which were performed in duplicate for each experimental condition. *** = p< 0.001.

Figure 3. Influence of SP, CGRP, VIP and NGF on the expression ratio between collagen type I and collagen type III. Injured human skin explants were incubated or not (Ctrl = control) with SP, CGRP, or VIP (10^{-10} M, 10^{-8} M or 10^{-6} M) or NGF (10^{-12} M, 10^{-10} M or 10^{-8} M) for 10 days. At D3, D7 and D10, immunostainings on HSE (10 µm) were assessed with anti-collagen III (1:250) and anti-collagen IA (1:1000). The

mean red intensity for collagen I and the mean green intensity for collagen III were measured using ImageJ software and collected individually. The collagen I/III ratios were assessed for each condition. The results are represented as the mean of 3 experiments ± SD, which were performed in duplicate for each experimental condition. ** = P< 0.01; *** = p< 0.001.

Figure 4. Influence of SP, CGRP, VIP and NGF on the enzymatic activity of MMP-2 and MMP-9. Injured human skin explants were incubated or not (Ctrl = control) with SP, CGRP, or VIP (10^{-10} M, 10^{-8} M or 10^{-6} M) or NGF (10^{-12} M, 10^{-10} M or 10^{-8} M) for 10 days. At D3, D7 and D10 supernatant samples (25 µl) were collected and separated on a zymography gel (10% polyacrylamide + 0,1% gelatin). After electrophoresis and discoloration, the gels were scanned and their density analyzed using the ImageJ software. The results are represented as the mean density of 3 experiments ± SD, which were performed in duplicate for each experimental condition. ** = P< 0.01; *** = p< 0.001.

Figure 5. Influence of SP, CGRP, VIP and NGF on the adhesion capacity of human dermal fibroblasts (HDF) and their differentiation into myofibroblasts. HDF were extracted from the same skin donors that were used for injured skin explants. (a) The capacity of HDF to adhere to a fibronectin (FN) matrix was evaluated after incubation with molecules. HDF were cultured for 24 H in DMEM + FBS 0.5%. After dissociation, cells were pretreated (1 H, 37°C) either with SP, CGRP, VIP (10^{-10} M, 10^{-8}M or 10^{-6} M) or NGF (10^{-12} M, 10^{-10} M or 10^{-8} M). Untreated cells served as controls. HDF were seeded in triplicate on FN-coated wells for 1 H at 37°C. Non-adherent cells were removed by washes, and acid phosphatase activity was assayed. The results are expressed as the mean percentage of cells that adhered *versus* control of 3 experiments ± SEM, which were performed in duplicate for each experimental condition. (b) Influence of molecules on α-SMA mRNA expression in HDF. HDF were stimulated or not with TGF-β1 or SP, CGRP, and VIP at 10^{-10} M or NGF at 10^{-12} M. After 48 h, cells were lysed, and mRNA expression was assessed by QPCR. Gene expression levels were normalized to the average expression of the endogenous control gene 18S and set to 1. The results are expressed as the mean expression of 5 experiments ± SEM, which were performed in triplicate for each experimental condition. *** = p< 0.001 *versus* non treated cells (NT); * = P< 0.05 *versus* TGF-β1 treated cells.

C. Effet du NGF et des neuropeptides sur la longueur des languettes de ré-épithélialisation

Comme nous l'avons montré précédemment, la SP, le CGRP, le VIP et le NGF-β favorisent la prolifération kératinocytaire de façon dose-dépendante. Dans le but de confirmer l'effet sur la phase de ré-épithélialisation, nous avons mesuré la longueur des languettes de ré-épithélialisation pour chaque molécule aux différents temps de culture (Figure 26).

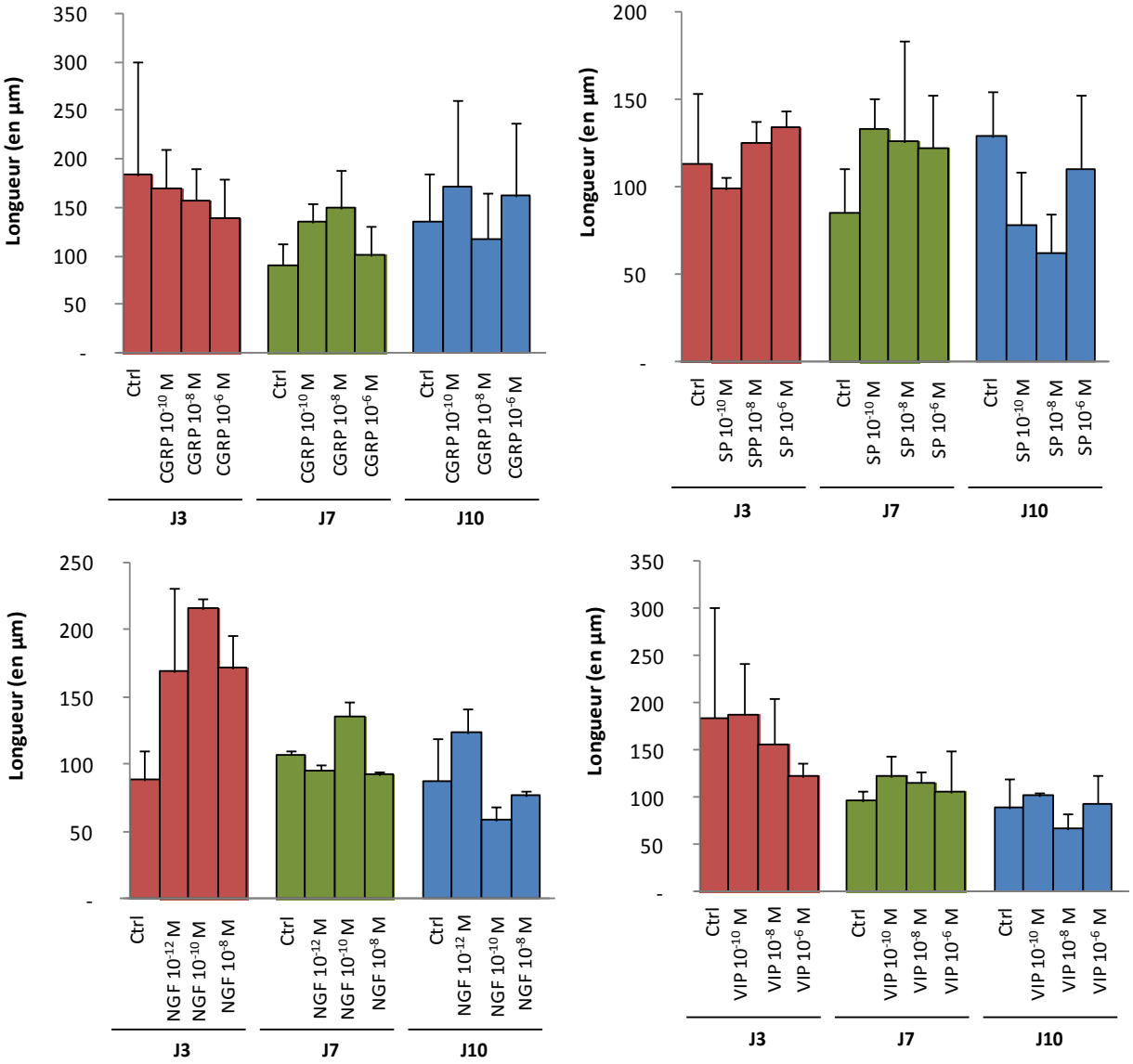


Figure 26. Effet des neuromédiateurs sur la longueur de la languette de ré-épithélialisation sur des explants de peau lésée au cours du temps de culture (J3, J7 et J10).

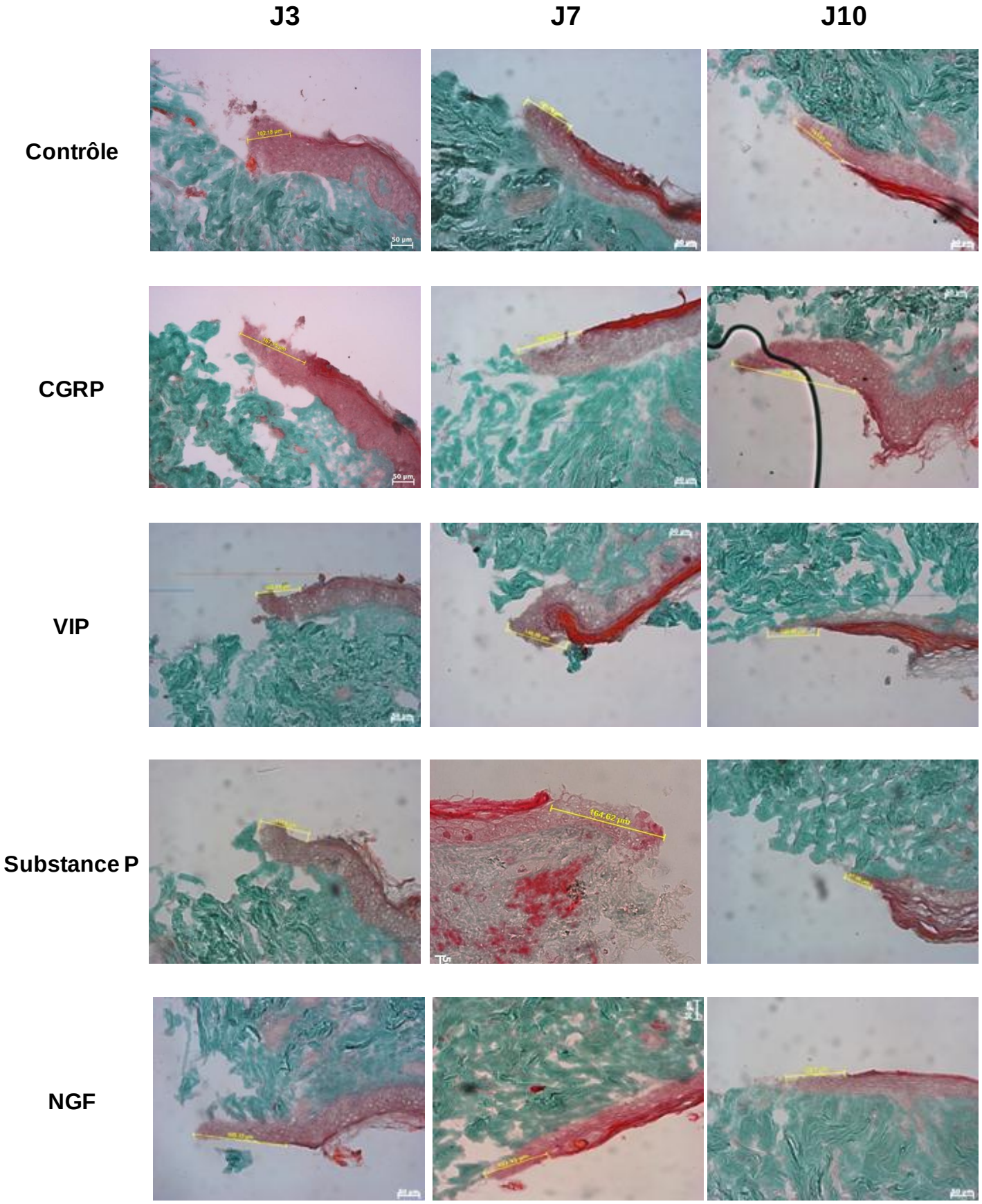


Figure 27. Exemple représentatif des photos obtenues des zones lésées après coloration au Trichrome de Masson pour chaque condition aux trois temps de culture.

Nous avons observé une augmentation de la longueur des languettes de ré-épithélialisation avec un effet plus marqué au 7ème jour de culture par rapport au contrôle non traité. De plus, il apparait que la dose la plus efficace à J7 pour la SP, le VIP et le NGF-β soit la concentration de 10^{-10} M ; pour le CGRP la concentration la plus efficace est 10^{-8} M. Le NGF a un effet important dès J3, alors que l'effet des neuropeptides est essentiellement observé à J7 (Figure 27).

D. Expression d'un acteur important du système fibrinolytique, la neuroserpine, dans la peau humaine (Article 3)

Comme nous avons pu le voir auparavant, le système nerveux périphérique joue un rôle important sur différents mécanismes du processus de cicatrisation cutanée. Afin de continuer dans cette voie, nous nous sommes intéressés à l'un des systèmes impliqué dans la cicatrisation, le système fibrinolytique.

Le système des activateurs du plasminogène est un système protéolytique classique participant à la dégradation de la MEC et à la thrombolyse. L'activation du plasminogène conduit à la formation de la plasmine, capable de dégrader un grand nombre de protéines présentes dans la MEC telles que la fibronectine, la laminine et la fibrine ou encore certaines MMPs. Le clivage du plasminogène en plasmine est réalisé par deux activateurs différents : le premier est l'uPA et le second le tPA. Ce dernier est impliqué dans la thrombolyse alors que l'uPA va agir comme l'une des enzymes clés dans la dégradation des protéines de la MEC, mais également dans une variété de processus impliqué dans la migration cellulaire et la dégradation ou le remodelage des tissus. Plusieurs études ont montré que les kératinocytes sécrétaient les activateurs du plasminogène. Moroka et al ont démontré que les kératinocytes migrant ainsi que les cellules endothéliales présentes en bordure de lésion, sécrétaient plus d'uPA que les kératinocytes des zones non lésées.

D'autres études ont également montré la présence des inhibiteurs de ce système, les serpines, et plus particulièrement de PAI-1 dans la cicatrisation. Cependant, il existe un autre inhibiteur, la neuroserpine principalement retrouvée dans le cerveau et qui a la capacité comme PAI-1 d'inhiber l'uPA et le tPA mais qui possède également la particularité d'agir directement sur la plasmine.

L'expression de la NSP dans la peau n'avait encore jamais fait l'objet d'étude. Partant de ce constat, nous avons analysé son expression dans la peau.

Cette étude a été publiée dans *Experimental Dermatology*.



DOI: 10.1111/j.1600-0625.2012.01541.x
www.blackwellpublishing.com/EXD

Expression of neuroserpin, a selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the human skin

Jérémy Chéret[1], Nicolas Lebonvallet[1], Laurent Misery[1,2] and Christelle Le Gall-Ianotto[1]

[1]Laboratory of Neurosciences of Brest (EA4685), University of Brest, European University of Brittany, Brest, France; [2]Department of Dermatology, University Hospital of Brest, Brest, France

Correspondence: Laurent Misery, Department of Dermatology, University Hospital of Brest, 5 avenue Foch, 29200 Brest, France, Tel.: +33-298-22-33-15, Fax: +33-298-22-33-82, e-mail: laurent.misery@chu-brest.fr

Abstract: Serine protease of the fibrinolytic system and their specific inhibitors, the serine protease inhibitors (SERPINs) are implicated in a number of physiological and pathological processes in skin. The main SERPIN is the plasminogen activator inhibitor-1 (or PAI-1), which is involved in wound healing and in pathogenesis of several diseases including skin fibrosis. Another member of SERPIN superfamily, the neuroserpin (NSP), is widely expressed in the central nervous system. It has been recently detected in different organs such as pancreas, heart, kidney and testis. In this study, we provided evidences for the presence of NSP in the skin, in 10 human skin samples (HSS) at mRNA level (RT-PCR) and protein level (Western blot and immunohistochemistry). The immunohistochemistry analysis showed that this expression was located in dermis around blood vessels.

Key words: fibrinolytic system – human skin – neuroserpin

Accepted for publication 16 May 2012

Background

Serine proteases and their specific inhibitors, the SERPINs, are involved in a number of skin physiological (wound healing…) and pathological processes (fibrotic diseases, metastatic spread of melanoma cells…) (1–6). The fibrinolytic system (FS) is crucial to maintain skin homoeostasis. In this system, serine proteases (tissue plasminogen activator-tPA or urokinase-type plasminogen activator-uPA) converted plasminogen to plasmin, which degrades extracellular matrix proteins. The proteolytic activities are regulated by SERPINs as plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1).

Human neuroserpin (hNSP), another SERPIN, is widely expressed in central nervous system (CNS) (7), where it is implied in synaptic plasticity, neuronal migration and axogenesis (8,9). As PAI-1, NSP regulates the activity of tPA and uPA but could also directly inhibit plasmin (10). More recently, the expression of NSP mRNA and/or protein in different organs such as pancreas, heart, kidney and testis has been shown (11). Until now, the NSP expression in the human skin had not been studied.

Questions addressed

Is the NSP express in the human skin? What could be its location?

Experiment design

Human skin samples and cells culture

Human skin samples (6 mm punchs; HSS) were obtained from women abdominoplasties after informed consent. The human glioblastoma-astrocytoma cell-line, U87-MG, expressing the NSP (personal data) was used as positive control. Briefly, they were cultured in DMEM supplemented with FBS 10% and collected at subconfluence.

Western blotting (WB) and reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total proteins and RNAs were extracted from the 10 HSS and subconfluent U87-MG by Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's protocol. After quantification (DC protein assay, Biorad, Marnes la coquette, France), proteins were electrophoresed on SDS-PAGE 12% gel, transblotted and probed with anti-hNSP primary antibody (1/500; Abcam, Paris, France), followed by an anti-rabbit IgG-Peroxidase (1/1000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Immunoreactive bands were detected using ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham, Orsay, France).

Purified RNA was reverse-transcribed using the ImPromII Reverse-Transcription system (Promega, Charbonnières-les-bains, France). Primers and protocol used to amplify the cDNA are described in Table S1. PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

Immunohistochemistry

HSS were fixed in sucrose 10% after paraformaldehyde 4% and frozen in isopentane chilled with liquid nitrogen. HSS sections (20 μm) were permeabilized (0.5% Triton X-100), and non-specific binding sites blocked with 5% normal goat serum in 0.1% Tween-20 in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline. All HSS sections were double immunostained with anti-hNSP primary antibody (1/50; Abcam) and either a specific marker of dermal fibroblasts, anti-human TE-7 (1/100; Millipore, Guyancourt, France) or a marker of endothelial cells, anti-human CD31 (1/50; Dako, France) followed by incubation with a goat anti-rabbit Chromeo TM488-labelled and a goat anti-mouse TRITC-labelled secondary antibodies (respectively, 1/1000 and 1/500; Abcam). DAPI (c) staining was realized to detect nuclei. Fluorescence analysis was performed using an Axiostar plus system (Carl ZEISS, MicroImaging Gmbh, Le Pecq, France).

Results

Reverse transcriptase – polymerase chain reaction performed on cDNA prepared from the 10 HSS using hNSP-specific primers showed an unique band at the expected size (148 bp) in each HSS sample (Fig. 1a).

To determine whether hNSP is expressed at the protein level, we performed WB analysis. The incubation with the antibody specifically directed against hNSP revealed two bands, respectively, at 45 and 55 kDa in all skin samples (Fig. 1b).

Immunohistochemistry on each HSS sections showed that hNSP expression was only seen in dermis, essentially around blood vessels (Fig. 2). Coimmunohistochemistry with an anti-CD31 allowed to

© 2012 John Wiley & Sons A/S

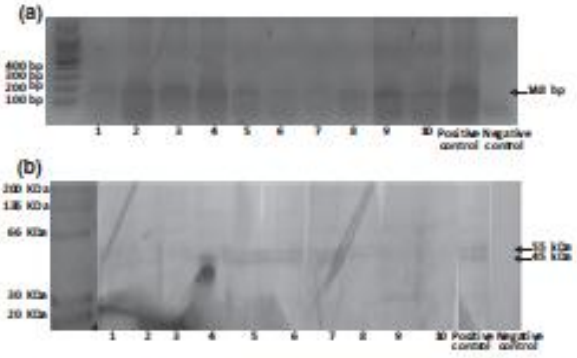


Figure 1. Expression of the NSP in the human skin. hNSP mRNA expression (a) and protein (b) expression were detected by RT-PCR and immunoblotting analysis in HSS (punch of 6 mm ø) as described in the experiment design. The 10 HSS (number 1–10) are shown, as well as positive (U87-MG) and negative controls.

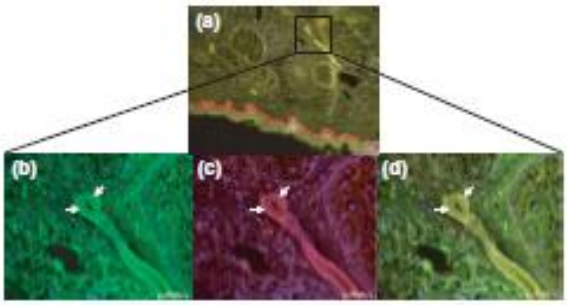


Figure 2. Analysis of the expression of the NSP in the human skin by immunohistochemistry (representative photographs in one HSS; thickness = 20 μm). Double immunostaining for hNSP (a, b) and anti-human CD31 (c) as described in the experiment design. Negative controls were performed by omitting the primary antibody. The epidermis is delimited by the dashed red Line (a). Nuclei are blue-stained by DAPI (c) (4′,6-diamidino-2-phenylindole). Panel (d) combines images of the anti-human hNSP and anti-human CD31 staining. An example of the hNSP staining is indicated by white arrows.

confirm that hNSP was exclusively expressed in dermal endothelial cells (Fig. 2c) while the coimmunostaining with the anti-TE7, a fibroblast marker, did not show any colocalization (data not shown). The staining of cellular nuclei by DAPI allowed to precise that this expression was only pericellular (Fig. 2c).

Conclusion

In this study, we showed the hNSP expression in human skin at mRNA and protein levels by using RT-PCR and WB analysis. Although the hNSP expression in organs other than CNS is not a new data, to our knowledge, its presence in human skin had never been explored yet unlike other family members of SERPINs (2).

Western blotting analysis revealed a double band, respectively, at 45 and 55 kDa. This result is in agreement with the literature showing a non-glycosylated secreted form at 45 kDa and a higher molecular mass of the fully glycosylated form of the NSP at 55 kDa (11).

Coimmunohistostainings confirmed its presence in skin and allowed to locate its expression exclusively in dermis around blood vessels. In studies analysing NSP expression in other organs than CNS, only few characterized cell types expressing NSP: endocrine cells in adrenal and pituitary glands in rats (12) and hematopoietic cells in human myeloid lineage (13). In their study on rat brain, Lebeurrier N *et al.* (14) showed that NSP was expressed in microvessels but not in the brain microvessel-derived endothelial cells without explaining this result. So, and to our knowledge, the expression of NSP in human endothelial cells that we describe had never been showed before. This location is not so surprising because of its role in the control of processes such as inflammation, blood coagulation and mainly fibrinolysis (8,15).

Serine protease inhibitors are implicated in a large variety of skin processes, and NSP expression in human skin indicates not yet identified and potentially broader functions for this SERPIN in the physiology and maybe physiopathology of the skin. So, briefly, by its effect on components of the FS (t-PA, u-PA, plasmin), NSP could be involved in skin wound healing and in the inhibition of tumoral processes (tumor growth, invasion and metastasis) as its structurally and functionally close-related SERPIN family member, PAI-1 (3,6,16).

Another interesting aspect of the NSP is its role in the regulation of axonal growth and in mechanisms related to the development of synaptic plasticity (9,17). The nervous system plays a significant role in skin physiology as well as in pathophysiology of many skin diseases (18). So, its expression in skin suggests its possible implication in the physiological and/or pathophysiological interactions processes between skin and nervous system.

It is only working hypothesis, and the exact role of NSP in skin has to be clearly identified.

Acknowledgements

We thank the Fondation Le Lous for financial support, Dr Valentin and his staff for the human skin samples, and Pr Jean-Luc Carré for gift of U87-MG cell-line.

Authors' contribution

J.C. performed the research and wrote the paper; N.L. read over and corrected the paper; L.M. designed the research study and corrected the paper; C.L. designed the research study and wrote the paper.

Conflict of interest

The authors have declared no conflicting interests.

References

1 Ovaere P, Lippens S, Vandenabeele P *et al.* Trends Biochem Sci 2009: **34**: 453–463.
2 Roupé K M, Alberius P, Schmidtchen A *et al.* Exp Dermatol 2010: **19**: e329–e332.
3 Torisawa M, Kähäri V M. Cell Mol Life Sci 2009: **66**: 203–224.
4 Tuan T L, Zhu J Y, Sun B *et al.* J Invest Dermatol 1996: **106**: 1007–1011.
5 Wei J, Ghosh A K, Sargent J L *et al.* PLoS ONE 2010: **5**: e13778.
6 de Vries T J, van Muijen G N, Ruiter D J. Melanoma Res 1996: **6**: 79–88.
7 Osterwalder T, Contartese J, Stoeckli E T *et al.* The EMBO J 1996: **15**: 2944–2953.
8 Yepes M, Lawrence D A. Thromb Haemost 2004: **91**: 457–464.
9 Parmar P K, Coates L C, Pearson J F *et al.* J Neurochem 2002: **82**: 1406–1415.
10 Osterwalder T, Cinelli P, Baici A *et al.* J Biol Chem 1998: **273**: 2312–2321.
11 Miranda E, Lomas D A. Cell Mol Life Sci 2006: **63**: 709–722.
12 Hill R M, Parmar P K, Coates L C *et al.* Biochem J 2000: **345**: 595–601.
13 Kennedy S A, van Diepen A, van den Hurk C M *et al.* Thromb Haemost 2007: **97**: 394–399.
14 Lebeurrier N, Liot G, Lopez-Atalaya J P *et al.* Mol Cell Neurosci 2005: **30**: 552–558.
15 Rijken D C, Lijnen H R. J Thromb Haemost 2009: **7**: 4–13.
16 Ma D, Gerard R D, Li X Y *et al.* Blood 1997: **90**: 2738–2746.
17 Stoeckli E T, Lemkin P F, Kuhn T B *et al.* Eur J Biochem 1989: **180**: 249–258.
18 Misery L. Clin Rev Allergy Immunol 2011: **41**: 259–266.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Oligonucleotides and protocol of amplification used in the RT-PCR analysis.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

© 2012 John Wiley & Sons A/S

DISCUSSION

Chapitre VI. Discussion

A. Les différents modèles d'étude de la cicatrisation cutanée

L'analyse des mécanismes impliqués dans la cicatrisation cutanée a fait l'objet d'un certain nombre d'études. Certaines de ces études se sont attachées à mieux comprendre l'implication des molécules d'origine neuronale dans ce processus à l'échelle moléculaire, cellulaire ou tissulaire. Pour cela, plusieurs modèles animaux ou humains, en 2 ou 3 dimensions (2D, 3D) ainsi que des modèles *in vivo* ont été utilisés. Quand nous parlons des modèles humains *in vivo*, nous considérons les biopsies cutanées réalisées sur des patients et non mis en culture avant la réalisation des différentes analyses (moléculaires, immunohistochimiques ou biochimiques). Le tableau 8 répertorie ces différents modèles d'étude.

Ainsi, nous constatons que le nombre de modèles 2D à partir de cellules humaines est relativement important alors que les modèles 3D et *in vivo* sont essentiellement d'origine animale, et plus particulièrement murine.

Même si les modèles murins sont majoritairement utilisés, il existe cependant des différences structurales majeures entre la peau murine et humaine : épaisseur totale de la peau plus fine, structure vasculaire superficielle, absence d'adhérence aux tissus sous-cutanés, organisation du système immunitaire, nombre et caractéristiques des follicules pilo-sébacés…De plus, la cicatrisation produit peu de tissu de granulation des rongeurs contrairement à l'Homme. Les modèles murins demeurent cependant intéressants pour l'étude de certains paramètres précis de la cicatrisation. L'utilisation de la peau du porc domestique a permis de palier à ces inconvénients. En effet, elle présente un processus cicatriciel similaire à celui de l'homme du fait des caractéristiques structurales et fonctionnelles semblables.

Les modèles expérimentaux de culture simples (lignées cellulaires ou cellules primaires dissociées) ont souvent été utilisés et ont permis des avancées significatives dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la cicatrisation. Malgré tout, les limites de ce genre de modèle sont très vite apparues du fait qu'ils ne prennent pas en compte les interactions entre cellules ou cellules-matrice, très importantes pour ce processus.

<table>
<tr><th></th><th>Animaux</th><th>Humains</th></tr>
<tr><td rowspan="5">2D</td><td rowspan="5">Lignée cellulaire épidermique de souris Pam212
[113, 114]</td><td>Cellules endothéliales vasculaires (DMVEC, HMEC et HUVEC)
[1-11]</td></tr>
<tr><td>Lignée cellulaire kératinocytaire
[12-16]</td></tr>
<tr><td>Lignée cellulaire fibroblastique
[17]</td></tr>
<tr><td>Kératinocytes primaires
[13, 16, 18- 38]</td></tr>
<tr><td>Fibroblastes primaires
[1, 29,38, 39-49, 115]</td></tr>
<tr><td rowspan="4">3D</td><td>Culture d’explant cutané de souris
[50,51]</td><td rowspan="2">Peaux reconstruites
[55]</td></tr>
<tr><td>Culture d’explant cutané de mouton
[52]</td></tr>
<tr><td>Culture d’explant cutané de porc
[53, 26,30]</td><td rowspan="2">Culture d’explant cutané humain
[56, 30]</td></tr>
<tr><td>Co-culture GRD/Explant cutané de souris
[54]</td></tr>
<tr><td rowspan="4">In vivo</td><td>Lésion sur cochon d’Inde
[57]</td><td rowspan="4">Biopsies cutanées de patients
[19, 33, 36,99- 112]</td></tr>
<tr><td>Lésions sur lapins
[58]</td></tr>
<tr><td>Lésions sur souris
[19, 29, 38,51, 59-70]</td></tr>
<tr><td>Lésions sur rats
[54, 71-98]</td></tr>
</table>

Tableau 8. Modèles d’étude. HUVEC = Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HMEC = Human Mammary Epithelial Cells; DMVEC = Dermal MicroVascular Endothelial Cells; GRD = Ganglions Rachidiens Dorsaux

Quoi qu'il en soit, modèles 2D ou 3D, le système nerveux périphérique n'est généralement pas associé ou que très rarement intégré dans ces modèles. Son rôle dans la cicatrisation cutanée étant crucial, il était important de développer un modèle 3D humain intégrant le système nerveux périphérique.

Partant de ce constant, l'utilisation d'un modèle 3D de co-culture entre un explant de peau humaine lésée (Kratz G, 1998) et des neurones primaire issus de ratons nouveau-nés, « détourné » d'un modèle existant dans notre laboratoire, s'avère être original et nous a permis d'analyser l'influence des fibres nerveuses sensorielles de rats ainsi que de facteurs sécrétés par les neurones sensoriels sur la prolifération cellulaire et le remodelage tissulaire.

B. Détermination du milieu de culture

Nous avons déterminé le milieu de culture adéquat pour nos expériences en nous basant tout d'abord sur celui qui était utilisé au sein de notre laboratoire et qui permettait de cultiver un explant de peau humaine avec des neurones provenant de GRDs de rats nouveau-nés et qui permettait de garder une viabilité cellulaire pendant nos 10 jours de culture (Lebonvallet N *et al*, 2012). Nous avons ensuite croisé ses informations avec celles de Kratz G, qui travaillait sur un explant de peau humaine lésé en son centre et qui utilisait du DMEM/F12 (3:1) comme au sein de notre laboratoire auquel il était également additionné de l'insuline et de l'hydrocortisone mais dans des quantités différentes (5 µg/ml d'insuline et 0,4 µg/ml d'hydrocortisone). Ces quantités d'insuline et d'hydrocortisone sont également retrouvées dans d'autres études sur la cicatrisation (Haegerstrand A *et al*, 1989 ; Duong HS *et al*, 2005).

C. L'effet des neurones primaires sur la cicatrisation cutanée

Le premier objectif de notre travail a été de regarder l'effet des neurones périphériques lors de la cicatrisation cutanée.

Nous avons ainsi mis en évidence que la présence de neurones lors de la cicatrisation augmentait la prolifération des cellules épidermiques et des cellules dermiques au cours des 10 jours de cultures avec un pic de prolifération à partir du 7ème jour correspondant au début de la phase de prolifération. Des études précédentes (Lebonvallet N *et al, 2012* ; Roggenkamp D *et al*, 2013) ont démontré que l'innervation cutanée influençait positivement la densité cellulaire et l'épaisseur de l'épiderme corroborant ainsi nos résultats. Cependant en fonction du modèle utilisé, cet effet peut être associé à une augmentation de la prolifération des kératinocytes. Dans notre modèle de cicatrisation, nous montrons clairement une augmentation des cellules épidermiques exprimant la cytokératine-6, un marqueur spécifique de la prolifération kératinocytaire, suggérant tout comme Huang IT et al dans son modèle de cicatrisation chez le rat, que l'innervation cutanée entraine une activation des kératinocytes et plus particulièrement au niveau du site de la lésion (Huang IT *et al*, 1999). De plus, la présence de NGF dans le milieu en présence ou non de GRDs potentialise l'augmentation de la prolifération des cellules dermiques et épidermiques, ce qui était déjà connu.

Ces effets observés sur la prolifération cellulaire lors de la cicatrisation peuvent être dus à d'autres facteurs solubles que le NGF, sécrétés par les terminaisons nerveuses. Partant de cette hypothèse, nous avons réalisé des dosages par la technique EIA sur les surnageants de nos co-cultures pour détecter la présence de SP et CGRP.

La présence de SP a été retrouvée à la fois en présence ou absence de GRDs alors que le CGRP n'est détecté que dans les conditions comprenant les GRDs. Ces résultats confirment le fait que les cellules de la peau humaine sont capables de synthétiser et sécréter de la SP alors que le CGRP serait exclusivement relargué par les neurones sensoriels. Pourtant, le CGRP était relargué en plus

grande quantité que la SP, ce qui peut suggérer un rôle plus important du CGRP par rapport à la SP dans la cicatrisation sur notre modèle de co-culture.

Nos expériences ne nous ont pas permis de mettre en évidence un relargage de NGF dans le surnageant mais des augmentations de densité optique en présence de GRDs ont pu être observées. Le kit de dosage EIA que nous avons utilisé n'était donc probablement pas assez sensible dans ces conditions. Nous avons donc étudié le rôle de cette neurotrophine dans le processus de cicatrisation cutanée au sein de notre modèle.

Nous avons aussi étudié le rôle du VIP, car plusieurs études (Granoth R *et a*l, 2000 ; Wollina U *et al*, 1997 ; Rayan GM *et al*, 1995) ont montré une augmentation de l'expression du VIP dans les GRDs après une blessure, sans que son rôle n'ait été étudié dans la cicatrisation cutanée.

Ainsi, nous avons ajouté au milieu de culture de nos explants lésés chacune de ces molécules (SP, CGRP, VIP, NGF) pour étudier leurs effets sur la prolifération cellulaire durant la cicatrisation. Ces 4 molécules stimulent la prolifération à la fois des cellules dermiques et épidermiques de façon dose-dépendante. Cet effet pour la SP, le CGRP et le VIP confirme les observations faites par plusieurs études qui ont montré un effet positif de ces molécules sur la prolifération et la migration kératinocytaire mais ces études ont été menées soit sur des modèles murins sur des modèles *in vitro* de culture simple de kératinocytes humains ou murins (Tanaka T *et al,* 1988; Dallos A *et al*, 2006 ; Takahashi K *et al*, 1993 ; Marastoni M *et al*, 1995).

L'effet positif du NGF sur la prolifération épidermique dans notre modèle rejoint des études précédentes qui ont montré que l'application topique de NGF accélérait la cicatrisation en stimulant la prolifération kératinocytaire (Nithya M *et al*, 2003 ; Pincelli C *et al*, 2000 ; DiMarco E *et al*, 1993). Nous montrons clairement l'influence positive de nos molécules sur la cicatrisation cutanée et plus particulièrement sur les kératinocytes et la CK-6, puisque cet effet n'était, à notre connaissance uniquement connu dans des modèles *in vivo* chez le rat (Martinez-Martinez E *et al*, 2001 ; Juarranz MG *et al*, 2001 ; Li WW *et al*, 2010). En mesurant les languettes de ré-épithélialisation, nous avons également constaté que le VIP, le CGRP, la SP et le NGF augmentaient la longueur de ces languettes, indiquant ainsi un effet sur la migration kératinocytaire.

L'effet du NGF sur la prolifération des fibroblastes humains est un peu surprenant et en contradiction avec les autres études. En effet, des études précédentes réalisées sur des cultures de fibroblastes humains ont démontré que l'administration exogène de NGF ne stimulait pas leur prolifération mais favorisait leur migration (Gan H *et al*, 2009 ; Palazzo E *et al*, 2011). Cette différence peut s'expliquer par le fait que nous sommes dans un modèle plus complexe (3D contre monoculture) mais également plus proche des conditions physiologiques. Le fait que nous réalisions nos analyses à partir du 3ème jour alors que les deux autres études s'arrêtaient au 3ème jour constitue aussi une explication. Il est également possible que la production endogène de NGF (Gan H *et al*, 2009 ; Roggenkamp D *et al*, 2012) combinée à l'addition exogène de NGF entraine un rétro-contrôle négatif.

Nous avons également montré que le NGF provoquait la différenciation en myofibroblastes par l'induction de l'expression de l'α-SMA. Ce résultat est confirmé par plusieurs études (Micera A *et al*, 2001, Palazzo E *et al*, 2011) qui ont montré que le NGF (à différentes doses) entraine une augmentation de l'expression de l'α-SMA dans les fibroblastes cutanés. Cet effet sur les fibroblastes est associé à une augmentation de leur adhérence, qui est importante lors de la cicatrisation cutanée et notamment pour permettre à ces cellules de migrer et se différencier (Martin P, 1997).

La stimulation de la prolifération, l'adhérence et la différenciation sont également retrouvés pour les neuropeptides testés. Les effets de la SP que nous avons observé sur la prolifération fibroblastique sont confirmés par des études antérieures mais en ce qui concerne le CGRP et le VIP, nous apportons de nouvelles données sur leurs actions chez l'humain (Scholzen T *et al*, 1998 ; Parenti A *et al*, 1996 ; Nilsson J *et al*, 1985). En effet, les effets du CGRP sur les fibroblastes ne sont décrits *in vitro* que chez le rat et la souris (Dahl J *et al*, 2007 ; Yule KA and White SR 1999) et dans des cellules de type fibroblastes de la membrane synoviale (Carrion M *et al*, 2011). Par conséquent, leurs effets sur la différenciation myofibroblastique n'ont jamais été étudiés.

Notre étude montre que la SP a une action sur la différenciation myofibroblastique en agissant sur l'expression de l'α-SMA. Ce résultat vient en

complément de l'étude de Hu et col qui ont montré que la SP augmente l'expression du TGF-β1 dans les fibroblastes en culture (Hu D *et al*, 2002).

Comme nous venons de le voir, les neuropeptides étudiés ainsi que le NGF influencent la prolifération cellulaire. Pour que cette dernière ainsi que la migration soient possible lors de la cicatrisation cutanée, une dégradation préalable de la matrice extracellulaire (MEC) est nécessaire. Les métalloprotéases matricielles (MMP) vont alors jouer un rôle important, particulièrement les MMP-2 et -9 (Raventi L and Kähäri VM, 2000). Nous montrons que l'activité enzymatique de ces deux MMPs est augmentée en présence de GRDs mais uniquement dans les phases initiales de la cicatrisation (J3 et J7) et qu'elle est inhibée à partir du 10ème jour de culture. Des analyses, identiques à celles réalisées pour les co-cultures, ont été effectuées sur les explants lésés incubés en présence de CGRP, VIP, SP et NGF et ont montré une augmentation de l'activité des deux MMPs dépendante de la dose ajoutée. Les effets du CGRP et VIP sur ces deux MMPs n'avaient jamais été démontrés dans un modèle 3D de cicatrisation mais des études sur des lignées cellulaires l'ont suggéré (Fernandez-Martinez AB *et al*, 2010 ; El Zein J *et al*, 2008 ; Guan CX *et al*, 2007). La SP et le NGF ont été plus étudiés que les deux autres neuropeptides. En effet, une augmentation de l'activité de la MMP-9 provoquée par le NGF a été décrite dans plusieurs modèles *in vitro* (Micera A *et al*, 2007 ; Dagnell C *et al*, 2007 ; Khan KM *et al*, 2002). De plus, l'augmentation de l'activité de la MMP-2 sous SP et NGF que nous avons observé, est en accord avec les études précédentes (Hecker-Kia A *et al*, 1997 ; Xie L *et al*, 2010 ; Tominaga M *et al*, 2009 ; Park MJ *et al*, 2007).

L'effet inhibiteur observé sur nos cultures à J10 pour ces deux MMPs peut s'expliquer par le fait que les fibroblastes libèrent différentes molécules lors de leur différenciation en myofibroblastes, comme notamment le TGFβ1 qui est connu pour inhiber l'activité des MMPs (Zeng G *et al*, 1996).

Il est intéressant de noter que les GRDs ainsi que les neuropeptides provenant des neurones sensoriels stimulent l'activité des MMP-2/-9 suggérant que les neurones sensoriels pourraient promouvoir leur propre régénération durant la cicatrisation cutanée. En effet, il est bien évident que ces deux MMPs ne sont pas uniquement impliquées dans le remodelage de la MEC mais elles peuvent également avoir des effets bénéfiques lors de la régénération neuronale en stimulant

le clivage du pro-NGF en NGF mature qui joue un rôle important dans l'innervation (Shubayev VI and Myers RR, 2004 ; Tominaga M *et al,* 2009).

Les phases initiales de la cicatrisation cutanée sont caractérisées par la synthèse de collagène de type III, qui progressivement au cours du processus de cicatrisation sera remplacé par du collagène de type I plus résistant. Nous montrons que les GRDs ainsi que nos différentes molécules influencent le ratio collagène I/III en faveur du collagène I au cours du temps. Pour le NGF, des études précédentes réalisées sur des cultures de fibroblastes n'ont pas montré de variations des niveaux de collagènes (Micera A *et al*, 2001; Gan H *et al,* 2009) alors que nous nous montrons clairement un rôle du NGF sur la production de collagène. Nos résultats tendent à confirmer l'hypothèse de Nithya et al, qui suggère que le NGF augmente la synthèse et le dépôt de collagène dans le site de la lésion (Nithya M *et al*, 2003). Nos résultats confirment également que le CGRP inhibe l'accumulation du collagène III et augmente la production du collagène I (Wang J *et al*, 2006 ; Zhao Z *et al*, 2013). Cependant, l'action du VIP sur la production de collagène I et III lors de la cicatrisation cutanée est à notre connaissance une nouveauté puisqu'il n'a jamais été étudié. Enfin, en ce qui concerne la SP, nos résultats sont confirmés par des études précédentes qui ont conclus que la SP augmentait le remodelage du collagène via son récepteur NK-1R (Fong G *et al*, 2013 ; Carlsson O *et al*, 2011 ; Burssens P *et al*, 2005; Salo P *et al*, 2007). Récemment, l'équipe de Fong a montré dans une culture de ténocytes humains que cet effet était médié par une augmentation de l'expression de la MMP-3, connue pour dégrader le collagène III et augmenter l'activité de la MMP-9 (Fong G *et al*, 2013).

D. Expression de la neuroserpine, un inhibiteur des activateurs du plasminogène, dans la peau

Nous avons mis en évidence, pour la première fois, que la neuroserpine humaine est exprimée dans la peau humaine et qu'elle se localise exclusivement dans le derme. Les co-marquages réalisés dans le derme nous ont permis de montrer que la neuroserpine était exprimée par les cellules endothéliales. Ce résultat

vient confirmer une observation faite par Lebeurrier N et col qui ont montré chez le rat que la neuroserpine était exprimée par les micro-vaisseaux (Lebeurrier N *et al*, 2005). De plus, le fait de retrouver la neuroserpine au niveau des vaisseaux n'est pas une surprise puisqu'elle joue un rôle dans le contrôle de processus comme l'inflammation, la coagulation sanguine ou la fibrinolyse (Yepes M and Lawrence DA, 2004 ; Rijken DC and Lijnen HR, 2009).

Les inhibiteurs des sérines protéases sont impliqués dans une grande variété de processus physiologiques cutanés et l'expression de la neuroserpine dans la peau humaine pourrait, comme les autres SERPINEs, jouer aussi un rôle en pathologie cutanée. De par ses effets sur les membres du système fibrinolytique (uPA, tPA, Plasmine), la neuroserpine est probablement impliquée dans la cicatrisation cutanée. En effet, le système fibrinolytique joue un rôle important dans la cicatrisation en participant tout d'abord à la formation du clôt de fibrine. Ce système intervient également au niveau du remodelage tissulaire en agissant sur le clivage des pro-MMPs en MMP active mais également dans la phase de ré-épithélialisation puisque plusieurs études ont montré que les kératinocytes sécrétés à la fois le tPA et l'uPA et lorsque les kératinocytes acquièrent un phénotype migratoire, ils peuvent également sécréter l'autre inhibiteur de ce système, l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type-1 (PAI-1), qui régulera ainsi l'adhérence et le détachement des cellules lors de leur migration. La neuroserpine, au contraire de PAI-1, a également la possibilité d'inhiber spécifiquement la plasmine et pourrait ainsi inhiber la dégradation tissulaire en réduisant l'activité des MMPs via leur clivage par la plasmine (Figure 28) (He CS *et al*, 1989; Okumura Y et al, 1997; Ramos-DeSimone N *et al*, 1999).

Un autre aspect intéressant de la neuroserpine est son rôle dans la régulation de la croissance axonale et dans les mécanismes liés au développement de la plasticité synaptique (Parmar PK *et al*, 2002 ; Stoeckli ET *et al*, 1989). Comme nous avons pu le voir précédemment, le système nerveux joue un rôle important dans le processus de cicatrisation et le fait que la neuroserpine soit sécrétée notamment par les GRDs (Stoeckli ET *et al*, 1989), est en faveur du rôle de cet inhibiteur dans les mécanismes de cicatrisation induits par les neurones.

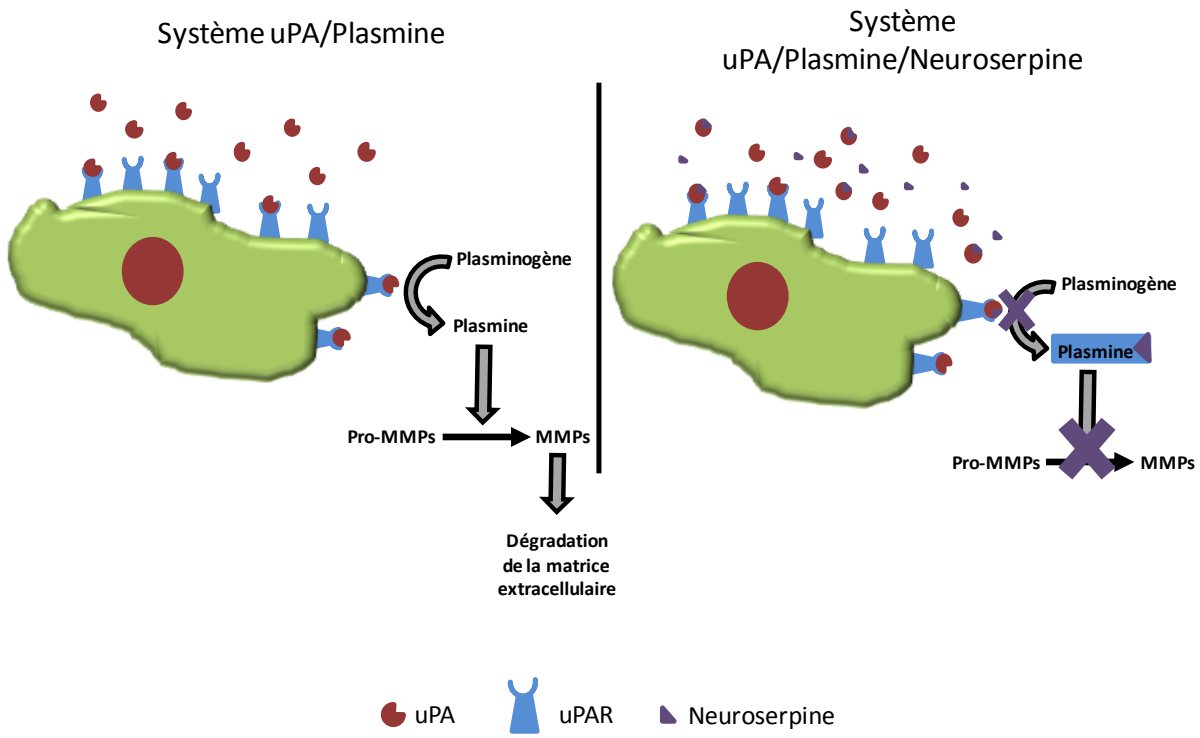


Figure 28. Représentation des rôles hypothétiques de la neuroserpine dans le processus de cicatrisation cutanée.

Chapitre VII. Conclusion et Perspectives

Conclusion

Le système nerveux périphérique joue un rôle important dans la cicatrisation cutanée puisque celle-ci est fortement altérée chez les patients atteints de neuropathies. Les fibres nerveuses sensorielles vont libérer des neuropeptides qui pourront agir sur les différentes phases de la cicatrisation. En effet, après 7 jours de culture on observe que la SP, le CGRP, le VIP et le NGF vont augmenter la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes ainsi que la migration des kératinocytes. Ces différentes molécules vont également induire le remodelage tissulaire en augmentant l'expression du collagène de type I au cours de notre étude et en augmentant l'activité des MMP-2 et -9 aux temps de culture précoces. Enfin, nos molécules vont favoriser la différenciation myofibroblastique ainsi que l'adhérence des fibroblastes humains, permettant ainsi une contraction de la plaie. Tous ces effets sur les mécanismes de cicatrisation ont également été retrouvés dans nos co-cultures entre les explants de peau humaine lésés et les GRDs de rats nouveau-nés montrant ainsi l'importance de l'innervation lors de la cicatrisation.

Perspectives

Dans le but d'étudier l'influence du système nerveux dans la cicatrisation, nous pourrons étudier grâce à notre modèle les effets d'autres neuropeptides ou neurotrophines sur les mécanismes de cicatrisation.

Nous étudierons également les niveaux d'expression des neuropeptides étudiés (SP, CGRP, VIP) chez des patients atteints de neuropathies par PCR quantitative, en les comparer à ceux de sujets sains.

A contrario, nous suggérons l'utilisation de ce modèle pour étudier les effets de molécules neuro-pharmacologiques sur les différents mécanismes de la cicatrisation cutanée, notre modèle ayant l'avantage de se rapprocher des conditions physiologiques bien plus que des cultures monocellulaires.

Nous étudierons également le rôle de la neuroserpine que nous avons identifié pour la première fois dans la peau, dans la cicatrisation cutanée. En effet, à la vue du rôle du système fibrinolytique dans la cicatrisation mais aussi de PAI-1, la neuroserpine pourrait avoir un rôle important. Nous commencerons par étudier son effet sur l'activité des MMP qui sont notamment activées par la plasmine qui elle est inhibé directement par la neuroserpine grâce aux zymogrammes pour l'uPA et le tPA et à la PCR quantitative. Nous étudierons ensuite son expression par les kératinocytes en migration au niveau des languettes de ré-épithélialisation, car des études ont montré une augmentation de l'expression de PAI-1 lors de la migration des kératinocytes.

Enfin, nous suggérons d'étudier le rôle de la neuroserpine dans les fibroses cutanées puisque l'absence du récepteur de l'uPA est associée à cette pathologie. La présence de la neuroserpine pourrait ainsi jouer un rôle dans la progression de la pathologie en bloquant ce récepteur ou bien en réduisant son expression.

Comme nous le voyons, l'étude du système nerveux dans la cicatrisation grâce à notre modèle peut ouvrir de nouvelles études fondamentales mais également participer au développement de nouvelles molécules favorisant la cicatrisation.

La découverte de la neuroserpine dans la peau ouvre de nouvelles perspectives d'études dans la compréhension de certains mécanismes physiopathologiques cutanés puisqu'elle a la capacité d'inhiber à la fois l'uPA et le tPA mais aussi la plasmine au contraire de PAI-1.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre VIII. Bibliographie

Bibliographie de la thèse

Abercrombie M, Flint MH, James DW, Wound contraction in relation to collagen formation in scorbutic Guinea-pigs. J Embryol Exp Morphol. 1956; 4:167-75.

Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. J Biol Chem. 1995 Mar 17;270(11):5872-6.

Akaishi S, Ogawa R, Hyakusoku H. Keloid and hypertrophic scar: neurogenic inflammation hypotheses. Med Hypotheses 2008;71:32–8.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell, Garland Science, New York, 2002.

Allt G, Lawrenson JG. Pericytes: cell biology and pathology. Cells Tissues Organs. 2001;169(1):1-11.

Arck PC, Slominski A, Theoharides TC, Peters EM, Paus R. Neuroimmunology of stress: skin takes center stage. J Invest Dermatol 2006; 126: 1697-704.

Bassaglia Y. *Biologie cellulaire*, Maloine, Paris, 2001.

Bellini A and Mattoli S The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. Lab Invest 2007; 87, 858-870.

Botchkarev VA, Yaar M, Peters EM, Raychaudhuri SP, Botchkareva NV, Marconi A, Raychaudhuri SK, Paus R, Pincelli C. Neurotrophins in skin biology and pathology. J Invest Dermatol 2006; 126: 1719-27.

Boulais N, Misery L. The epidermis: a sensory tissue. Eur J Dermatol 2008; 18: 119-27.

Boulais N, Pereira U, Lebonvallet N, Gobin E, Dorange G, Rougier N, Chesne C, Misery L. Merkel cells as putative regulatory cells in skin disorders: an in vitro study. PLoS One. 2009 Aug 11;4(8):e6528.

Braverman IM, Yen A. Ultrastructure of the human dermal microcirculation. II. The capillary loops of the dermal papillae. J Invest Dermatol 1977; 68: 44–52.

Brazzini B, Ghersetich I, Hercogova J, Lotti T. The neuro-immuno-cutaneous-endocrine network: relationship between mind and skin. Dermatol Ther 2003; 16: 123-31.

Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. Mol Med 1994;1:71–81.

Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. Rook's Textbook of Dermatology, 8ème Edition, 2010.

Burssens P, Steyaert A, Forsyth R, van Ovost EJ, Depaepe Y, Verdonk R. Exogenously administered substance P and neutral endopeptidase inhibitors stimulate fibroblast proliferation, angiogenesis and collagen organization during Achilles tendon healing. Foot Ankle Int 2005; 26:832-9.

Carrión M, Juarranz Y, Pérez-García S, Jimeno R, Pablos JL, Gomariz RP, Gutiérrez-Cañas I. RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide. Arthritis Rheum. 2011; 63:1626-36.

Carlsson O, Schizas N, Li J, Ackermann PW. Substance P injections enhance tissue proliferation and regulate sensory nerve ingrowth in rat tendon repair. Scand J Med Sci Sports. 2011;. 21:562-9.

Chen WP, Chang YC, Hsieh ST. Trophic interactions between sensory nerves and their targets. J Biomed Sci 1999; 6: 79-85.

Chodon T, Sugihara T, Igawa HH, Funayama E, Furukawa H. Keloid-derived fibroblasts are refractory to Fas-mediated apoptosis and neutralization of autocrine transforming growth factor-betal can abrogate this resistance. 2000; Am J Pathol 157, 1661-1669

Crivellato E, Travan L, Damiani D, Fusaroli P, Mallardi F. Visualization of PGP 9.5 immunoreactive nerve terminals in the mouse snout epidermis. Acta Histochem. 1994 Jun;96(2):197-203.

Dagnell C, Kemi C, Klominek J, Eriksson P, Sköld CM, Eklund A, Grunewald J, Olgart Höglund C. Effects of neurotrophins on human bronchial smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase-9 secretion. Transl Res. 2007; 150:303-10.

Dahl J, Li J, Bring DK, Renström P, Ackermann PW. Intermittent pneumatic compression enhances neurovascular ingrowth and tissue proliferation during connective tissue healing: a study in the rat. J Orthop Res. 2007; 25:1185-92.

Dallos A, Kiss M, Polyánka H, Dobozy A, Kemény L, Husz S. Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and galanin on the production of nerve growth factor and inflammatory cytokines in cultured human keratinocytes. Neuropeptides. 2006; 40:251‑63.

Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. Lab Invest 1990;63:21–9.

Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. Int Rev Cytol. 2007;257:143-79.

Davis KD. Cold-induced pain and prickle in the glabrous and hairy skin. Pain. 1998 Mar;75(1):47-57.

Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-b1 induces a-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. J Cell Biol 1993;122:103–11.

Desmouliere, A., Guyot, C, and Gabbiani, G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. Int J Dev Biol. 2004; 48, 509-517.

Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. Wound Repair Regen. 2005 Jan-Feb;13(1):7-12.

De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. Int J Cancer. 2008; 123, 2229-2238

Di Marco E, Mathor M, Bondanza S, Cutuli N, Marchisio PC, Cancedda R, De Luca M. Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop. J Biol Chem 1993; 268:22838-46.

Docagne F, Nicole O, Marti HH, MacKenzie ET, Buisson A, Vivien D. Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. FASEB J. 1999 Aug;13(11):1315-24.

Duong HS, Zhang Q, Kobi A, Le A, Messadi DV. Assessment of morphological and immunohistological alterations in long-term keloid skin explants. Cells Tissues Organs. 2005;181(2):89-102.

Dyck PJ, Karnes JL, O'Brien PC, Litchy WJ, Low PA, Melton LJ, 3rd. The Rochester Diabetic Neuropathy Study: reassessment of tests and criteria for diagnosis and staged severity. Neurology 1992; 42: 1164-70.

El-Nour H, Santos A, Nordin M, Jonsson P, Svensson M, Nordlind K, Berg M. Neuronal changes in psoriasis exacerbation. J Eur Acad Dermatol Venereol 2009; 23: 1240-5.

El Zein N, Badran B, Sariban E. VIP differentially activates beta2 integrins, CR1, and matrix metalloproteinase-9 in human monocytes through cAMP/PKA, EPAC, and PI-3K signaling pathways via VIP receptor type 1 and FPRL1. J Leukoc Biol. 2008; 83:972-81.

Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. J Invest Dermatol. 2007 Mar;127(3):514-25.
Fernández-Martínez AB, Bajo AM, Isabel Arenas M Sánchez-Chapado M, Prieto JC, Carmena MJ. Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces malignant transformation of the human prostate epithelial cell line RWPE-1.Cancer Lett. 2010; 299:11-21.

Flannery CR. MMPs and ADAMTSs: functional studies. Front Biosci. 2006 Jan 1;11:544-69.

Fong G, Backman LJ, Hart DA Danielson P, McCormack B, Scott A. Substance P enhances collagen remodeling and MMP-3 expression by human tenocytes. J Orthop Res. 2013; 31:91-8.

Fontana V, Silva PS, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension.Clin Chim Acta. 2012 Apr 11;413(7-8):656-62

Franzke CW, Bruckner P, Bruckner-Tuderman L. Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology. J Biol Chem. 2005 Feb 11;280(6):4005-8. Epub 2004 Nov 23.

Gabbiani G, Ryan GB, Majno G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. Experientia 1971;27:549–50.

Galéra P, Park RW, Ducy P, Mattéi MG, Karsenty G. c-Krox binds to several sites in the promoter of both mouse type I collagen genes. Structure/function study and developmental expression analysis. J Biol Chem. 1996 Aug 30;271(35):21331-9.

Gan H, Xie H, Chen X, Luo J.[Effects of NGF on proliferation, mitotic cycle, collagen synthesis and migration of human dermal fibroblasts in vitro]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2009; 23:1350-4.

Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. J Leukoc Biol. 2001 Apr;69(4):513-21.

Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. Int J Biochem Cell Biol. 2008;40(6-7):1334-47.

Goldman R. Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. Adv Skin Wound Care. 2004 Jan-Feb;17(1):24-35.

Granoth R, Fridkin M, Gozes I. VIP and the potent analog, stearyl-Nle(17)-VIP, induce proliferation of keratinocytes. FEBS Lett. 2000; 475:78-83.

Grøndahl-Hansen J, Lund LR, Ralfkiaer E, Ottevanger V, Danø K. Urokinase- and tissue-type plasminogen activators in keratinocytes during wound reepithelialization in vivo. J Invest Dermatol. 1988 Jun;90(6):790-5.

Guan CX, Liu YP, Cui YR, Yu F, Sun GY, Liu HJ. [Effect of calcitonin-gene-related peptide on MMP-9 production in human bronchial epithelial cells].Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2007 ; 32:771-5.

Haegerstrand A, Jonzon B, Dalsgaard CJ, Nilsson J. Vasoactive intestinal polypeptide stimulates cell proliferation and adenylate cyclase activity of cultured human keratinocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Aug;86(15):5993-6.

Haviarova Z, Janega P, Durdik S, Kovac P, Mraz P, Stvrtinova V (2008). Comparison of collagen subtype I and III presence in varicose and non-varicose vein walls. Bratisl Lek Listy.109:102-5.

HE CS, Wilhelm SM, Pentland AP, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Goldberg GI. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Apr;86(8):2632-6.

Hecker-Kia A, Kolkenbrock H, Orgel D, Zimmermann B, Sparmann M, Ulbrich N. Substance P induces the secretion of gelatinase A from human synovial fibroblasts. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1997;35:655-60.

Heino J. Biology of tumor cell invasion: interplay of cell adhesion and matrix degradation. Int J Cancer. 1996 Mar 15;65(6):717-22.

Hinek A, Wang Y, Liu K, Mitts TF, Jimenez F. Proteolytic digest derived from bovine Ligamentum Nuchae stimulates deposition of new elastin-enriched matrix in cultures and transplants of human dermal fibroblasts. J Dermatol Sci. 2005 Sep;39(3):155-66.

Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C. (2003) Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. Mol Biol Cell 14, 2508-2519

Hsieh ST, Choi S, Lin WM, Chang YC, McArthur JC, Griffin JW. Epidermal denervation and its effects on kératinocytes and Langerhans cells. J Neurocytol 1996; 25: 513-24.

Hsieh ST, Lin WM, Chiang HY, Huang IT, Ko MH, Chang YC, Chen WP. Skin Innervation and Its Effects on the Epidermis. J Biomed Sci 1997; 4: 264-268.

Hu D, Chen B, Zhu X, Tao K, Tang C, Wang J. [Substance P up-regulates the TGF-beta 1 mRNA expression of human dermal fibroblasts in vitro].Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi. 2002 ; 18:234-6.

Huang IT, Lin WM, Shun CT, Hsieh ST. Influence of cutaneous nerves on kératinocyte proliferation and epidermal thickness in mice. Neuroscience 1999; 94: 965-73.

Jiang CK, Magnaldo T, Ohtsuki M Freedberg IM, Bernerd F, Blumenberg M. Epidermal growth factor and transforming growth factor-α specifically induce the activation- and hyperproliferation associated keratins 6 and 16. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 6786–90.

Juarranz MG, Bodega G, Prieto JC, Guijarro LG.Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates rat prostatic epithelial cell proliferation. Prostate. 2001; 47:285-92.

Kawamoto K and Matsuda H. Nerve growth factor and wound healing. Prog Brain Res. 2004;146:369-84.

Kelly EJ, Terenghi G, Hazari A, Wiberg M. Nerve fibre and sensory end organ density in the epidermis and papillary dermis of the human hand. Br J Plast Surg. 2005 Sep;58(6):774-9.

Khan KM, Falcone DJ, Kraemer R. Nerve growth factor activation of Erk-1 and Erk-2 induces matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells.J Biol Chem 2002; 277:2353-9.

Kim M, Hong JW, Nho M, Na YJ, Shin JH. Tensile stress regulation of NGF and NT3 in human dermal fibroblast. IFMBE Proceedings 2009;5:1935–7.

Kouba DJ, Nakano H, Nishiyama T, Kang J, Uitto J, Mauviel A. Tumor necrosis factor-alpha induces distinctive NF-kappa B signaling within human dermal fibroblasts. J Biol Chem. 2001 Mar 2;276(9):6214-24. Epub 2000 Nov 21.

Kratz G. Modeling of wound healing processes in human skin using tissue culture.Microsc Res Tech. 1998 Sep 1;42(5):345-50.

Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ. Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. Hum Mutat. 1997;9(4):300-15.

Lacraz S, Isler P, Vey E, Welgus HG, Dayer JM. Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression. J Biol Chem. 1994 Sep 2;269(35):22027-33.

Larochelle S, Langlois C, Thibault I, Lopez-Valle CA, Roy M, Moulin V. Sensitivity of myofibroblasts to H202-mediated apoptosis and their antioxidant cell network. J Cell Physiol. 2004; 200, 263-271

Lebeurrier N, Liot G, Lopez-Atalaya JP, Orset C, Fernandez-Monreal M, Sonderegger P, Ali C, Vivien D. The brain-specific tissue-type plasminogen activator inhibitor, neuroserpin, protects neurons against excitotoxicity both in vitro and in vivo. Mol Cell Neurosci. 2005 Dec;30(4):552-8.

Lebonvallet N, Boulais N, Le gall C, Pereira U, Gauché D, Gobin E, Jeanmaire C, Danoux L, Pauly G, Misery L. Effects of the re-innervation of organotypic skin explants on the epidermis. PlosOne 2010.

Lebonvallet N, Boulais N, Le Gall C, Pereira U, Gauché D, Gobin E, Pers JO, Jeanmaire C, Danoux L, Pauly G, Misery L. Effects of the re-innervation of organotypic skin explants on the epidermis. Exp Dermatol. 2012 Feb;21(2):156-8.

Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. Am J Pathol. 1975 Jan;78(1):71-100.

Lemaître V, D'Armiento J. Matrix metalloproteinases in development and disease. Birth Defects Res C Embryo Today. 2006 Mar;78(1):1-10.

Li J, Qu X, Bertram JF. Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice. Am J Pathol. 2009; 175, 1380-1388.

Li WW, Guo TZ, Li XQ, Kingery WS, Clark JD. Fracture induces keratinocyte activation, proliferation, and expression of pro-nociceptive inflammatory mediators.Pain. 2010;151:843-52

Li Y, Hsieh ST, Chien HF, Zhang X, McArthur JC, Griffin JW. Sensory and motor denervation influence epidermal thickness in rat foot glabrous skin. Exp Neurol 1997; 147: 452-62.

Lin SL, Kisseleva T, Brenner DA, Duffield JS. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. Am J Pathol. 2008; 173, 1617-1627.

Luckett LR, Gallucci RM. Interleukin-6 (IL-6) modulates migration and matrix metalloproteinase function in dermal fi broblasts from IL-6KO mice. Br J Dermatol 2007; 156: 1163–71.

Marconi A, Dumas M, Fila C, Truzzi F, Atzei P, Pignatti M, Bonté F., Giannetti A., Pincelli C. The neurotrophin network in human skin. Exp Dermatol 2004;13:588.

Marastoni M, Scaranari V, Fantini F, Sevignani C, Tomatis R. Effects of peptide T derivatives on the proliferation of cultured human keratinocytes. Arzneimittelforschung. 1995 ; 45:891-3.

Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. Science. 1997 Apr 4;276(5309):75-81.

Martínez-Martínez E, Galván-Hernández CI, Toscano-Márquez B, Gutiérrez-Ospina G. Modulatory role of sensory innervation on hair follicle stem cell progeny during wound healing of the rat skin. PLoS One. 2012 ;7:e36421.

McCarthy BG, Hsieh ST, Stocks A, Hauer P, Macko C, Cornblath DR, Griffin JW, McArthur JC. Cutaneous innervation in sensory neuropathies: evaluation by skin biopsy. Neurology 1995; 45: 1848-55.

McCawley LJ, O'Brien P, Hudson LG. Epidermal growth factor (EGF)- and scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF)- mediated keratinocyte migration is

coincident with induction of matrix metalloproteinase (MMP)-9. J Cell Physiol. 1998 Aug;176(2):255-65.

Meaume S, Dereure O, Téot L, *Plaies et cicatrisations*, Masson, Paris, 2005.

Mélissopopoulos A, Levacher C, *La peau : Structure et physiologie*, Tec & Doc Lavoisier (Editions), Paris.1998.

Micera A, Vigneti E, Pickholtz D, Reich R, Pappo O, Bonini S, Maquart FX, Aloe L, Levi-Schaffer F. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98:6162-7.

Micera A, Lambiase A, Stampachiacchiere B , Sgrulletta R, Normando EM, Bonini S, Bonini S. Nerve growth factor has a modulatory role on human primary fibroblast cultures derived from vernal keratoconjunctivitis-affected conjunctiva. Mol Vis. 2007; 13:981-7.

Midwood KS, Schwarzbauer JE, Tenascin-C modulates matrix contraction via focal adhesion and Rho-mediated signaling patways. Mol Biol Cell 13, 3601-3613, 2002.
Mignatti P, Rifkin DB, Welgus HG, Parks WC. Proteinases and tissue remodelling. In: Clark RAF, ed. The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. New York: Plenum Press, 1996: 427–75.

Miranda E, Lomas DA. Neuroserpin: a serpin to think about. Cell Mol Life Sci. 2006 Mar;63(6):709-22.

Misery L. Skin, immunity and the nervous system. Br J Dermatol 1997; 137: 843-50.

Montaño JA, Pérez-Piñera P, García-Suárez O, Cobo J, Vega JA. Development and neuronal dependence of cutaneous sensory nerve formations: Lessons from neurotrophins. Microsc Res Tech. 2010 May;73(5):513-29.

Moroguchi A, Ishimura K, Okano K, Wakabayashi H, Maeba T, Maeta H.. Interleukin-10 suppresses proliferation and remodelling of extracellular matrix of cultured human skin fibroblasts. Eur Surg Res 2004; 36: 39–44.

Morris VL, Chan BM. Interaction of epidermal growth factor, Ca2+, and matrix metalloproteinase-9 in primary keratinocyte migration. Wound Repair Regen 2007; 15: 907–15.

Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. Trends Genet. 2004 Jan;20(1):33-43.

Moulin V, Larochelle S, Langlois C, Thibault I, Lopez-Valle CA, Roy M. Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblasts have differential responses to apoptotic inductors. J Cell Physiol. 2004; 198, 350-358.

Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999 Jul 30;274(31):21491-4.

Nilsson J, Von Euler AM, Dalsgaard CJ. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. Nature. 1985; 315:61‑3.

Nithya M, Suguna L, Rose C. The effect of nerve growth factor on the early responses during the process of wound healing. Biochim Biophys Acta. 2003; 1620:25-31.

Nolano M, Provitera V, Crisci C, Stancanelli A, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Santoro L. Quantification of myelinated endings and mechanoreceptors in human digital skin. Ann Neurol. 2003 Aug;54(2):197-205.

Norton PA, Hynes RO. Alternative splicing of chicken fibronectin in embryos and in normal and transformed cells. Mol Cell Biol. 1987 Dec;7(12):4297-307

Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, Sato H, Seiki M. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. Lab Invest. 1995 Mar;72(3):311-22.

Okumura Y, Sato H, Seiki M, Kido H. Proteolytic activation of the precursor of membrane type 1 matrix metalloproteinase by human plasmin. A possible cell surface activator. FEBS Lett. 1997 Feb 3;402(2-3):181-4.

Osterwalder T, Cinelli P, Baici A, Pennella A, Krueger SR, Schrimpf SP, Meins M, Sonderegger P. The axonally secreted serine proteinase inhibitor, neuroserpin, inhibits plasminogen activators and plasmin but not thrombin. J Biol Chem. 1998 Jan 23;273(4):2312-21.

Palazzo E, Marconi A, Truzzi F (2011). Role of neurotrophins on dermal fibroblast survival and differentiation. J Cell Physiol 227:1017-25.

Parenti A, Amerini S, Ledda F , Maggi CA, Ziche M. The tachykinin NK1 receptor mediates the migration-promoting effect of substance P on human skin fibroblasts in culture. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 1996;353:475‑81.

Park MJ, Kwak HJ, Lee HC , Yoo DH, Park IC, Kim MS, Lee SH, Rhee CH, Hong SI. Nerve growth factor induces endothelial cell invasion and cord formation by promoting matrix metalloproteinase-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and AP-2 transcription factor. J Biol Chem. 2007;19;282:30485-96

Parmar PK, Coates LC, Pearson JF, Hill RM, Birch NP. Neuroserpin regulates neurite outgrowth in nerve growth factor-treated PC12 cells. J Neurochem. 2002 Sep;82(6):1406-15.

Pincelli C, Marconi A. Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes. J Dermatol Sci 2000; 22:71-9.

Rajkumar, V. S., Shiwen, X., Bostrom, M., Leoni, P., Muddle, J., Ivarsson, M., Gerdin, B., Denton, C. P., Bou-Gharios, G., Black, C. M., and Abraham, D. J. (2006) Platelet-derived growth factor-beta receptor activation is essential for fibroblast and pericyte recruitment during cutaneous wound healing. Am J Pathol 169, 2254-2265

Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Sipley J, Nagase H, French DL, Quigley JP. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. J Biol Chem. 1999 May 7;274(19):13066-76.

Ravanti L, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in wound repair. Int J Mol Med. 2000; 6:391-407.

Rayan GM, Johnson C, Pitha J. Vasoactive intestinal peptide and nerve growth factor effects on nerve regeneration. J Okla State Med Assoc. 1995;88:337-41.

Reznik M. [Structure and functions of the cutaneous nervous system]. Pathol Biol (Paris) 1996; 44: 831-7.

Rijken DC and Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. J Thromb Haemost. 2009 Jan;7(1):4-13.

Risau W. Differentiation of endothelium. FASEB J. 1995 Jul;9(10):926-33.

Roggenkamp D, Köpnick S, Stäb F, Wenck H, Schmelz M, Neufang G. Epidermal Nerve Fibers Modulate Keratinocyte Growth via Neuropeptide Signaling in an Innervated Skin Model. J Invest Dermatol. 2013 .

Roggenkamp D, Falkner S, Stäb F, Petersen M, Schmelz M, Neufang G. Atopic keratinocytes induce increased neurite outgrowth in a coculture model of porcine dorsal root ganglia neurons and human skin cells. J Invest Dermatol. 2012 Jul;132(7):1892-900.

Romer J, Lund LR, Eriksen J Ralfkiaer E, Zeheb R, Gelehrter TD, Danø K, Kristensen P. Differential expression of urokinase-type plasminogen activator and its type-1 inhibitor during healing of mouse skin wounds. J Invest Dermatol 1991; 97: 803–11.

Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. Physiol Rev 2006; 86: 1309-79.

Ryan TJ. Cutaneous circulation. In: Goldsmith LA, ed. Biochemistry and Physiology of the Skin. New York: Oxford University Press, 1983: 817–77.

Saarialho-Kere UK, Kovacs SO, Pentland AP, Olerud JE, Welgus HG, Parks WC. Cell-matrix interactions modulate interstitial collagenase expression by human keratinocytes actively involved in wound healing. J Clin Invest. 1993 Dec;92(6):2858-66.

Salo P, Bray R, Seerattan R, Reno C, McDougall J, Hart DA. Neuropeptides regulate expression of matrix molecule, growth factor and inflammatory mediator mRNA in explants of normal and healing medial collateral ligament. Regul Pept. 2007 ; 5;142:1-6.

Salo T, Mäkelä M, Kylmäniemi M, Autio-Harmainen H, Larjava H. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. Lab Invest. 1994 Feb;70(2):176-82.

Säterö P, Klingenstierna U, Karlsson T, Olausson B. Pain threshold measurements with cutaneous argon laser, comparing a forced choice and a method of limits. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2000 Apr;24(3):397-407.

Sato Y, Ohshima T, Kondo T. Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Nov;265(1):194-9.

Sawicki G, Marcoux Y, Sarkhosh K, Tredget EE, Ghahary A. Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors. Mol Cell Biochem. 2005 Jan;269(1-2):209-16.

Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc. 2008; 3:1101-8.

Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. Exp Dermatol. 1998; 7:81‑96.

Serini G and Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. Exp Cell Res. 1999; 250, 273-283

Shaw LM, Olsen BR. FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. Trends Biochem Sci. 1991 May;16(5):191-4.

Shubayev VI, Myers RR.Matrix metalloproteinase-9 promotes nerve growth factor-induced neurite elongation but not new sprout formation in vitro. J Neurosci Res. 2004; 15;77:229-39

Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. N Engl J Med. 1999 Sep 2;341(10):738-46.

Smith HW, Marshall CJ. Regulation of cell signalling by uPAR. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Jan;11(1):23-36.

Sismanopoulos N, Delivanis DA, Alysandratos KD, Angelidou A, Therianou A, Kalogeromitros D, Theoharides TC. Mast cells in allergic and inflammatory diseases. Curr Pharm Des. 2012;18(16):2261-77.

Slominski A. Neuroendocrine system of the skin. Dermatology 2005; 211: 199-208.

Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Clonal characterization of fibroblasts in the superficial layer of the adult human dermis. *Cell Tissue Res* 2007; **327**: 499–510.

Stoeckli ET, Lemkin PF, Kuhn TB, Ruegg MA, Heller M, Sonderegger P. Identification of proteins secreted from axons of embryonic dorsal-root-ganglia neurons. Eur J Biochem. 1989 Mar 15;180(2):249-58.

Tanaka T, Danno K, Ikai K, Imamura S. Effects of substance P and substance K on the growth of cultured keratinocytes. J Invest Dermatol. 1988 ; 90:399‑401.

Takahashi K, Nakanishi S, Imamura S. Direct effects of cutaneous neuropeptides on adenylyl cyclase activity and proliferation in a keratinocyte cell line: stimulation of cyclic AMP formation by CGRP and VIP/PHM, and inhibition by NPY through G protein-coupled receptors. J Invest Dermatol. 1993; 101:646‑51.

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002; 3, 349-363

Tominaga M, Tengara S, Kamo A, Ogawa H, Takamori K. Psoralen-ultraviolet A therapy alters epidermal Sema3A and NGF levels and modulates epidermal innervation in atopic dermatitis. J Dermatol Sci 2009.

Toriseva M, Kähäri VM. Proteinases in cutaneous wound healing. Cell Mol Life Sci. 2009 Jan;66(2):203-24. doi: 10.1007/s00018-008-8388-4.

Tortora GA, *Principles of human anatomy*. Joh Wiley & Sons, Inc, 2005

Van der Straaten HM, Canninga-van Dijk MR, Verdonck LF, Castigliego D, Borst HP, Aten J, Fijnheer R. Extra-domain-A fibronectin: a new marker of fibrosis in cutaneous graft-versus-host disease. J Invest Dermatol. 2004 Dec;123(6):1057-62.

Vaalamo M, Mattila L, Johansson N, Kariniemi AL, Karjalainen-Lindsberg ML, Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds. J Invest Dermatol. 1997 Jul;109(1):96-101.

Vrekoussis T, Chaniotis V, Navrozoglou I Dousias V, Pavlakis K, Stathopoulos EN, Zoras O.(2009). Image analysis of breast cancer immunohistochemistry-stained sections using ImageJ: an RGB-based model. Anticancer Res 29:4995-8.

Wang J, Qiu X, Kulkarni A, Hauer-Jensen M. Calcitonin gene-related peptide and substance P regulate the intestinal radiation response. Clin Cancer Res 2006; 12:4112-8.

Wen GY, Wisniewski HM, Blondal H, Benedikz E, Frey H, Pirttila T, Rudelli R, Kim KS. Presence of non-fibrillar amyloid beta protein in skin biopsies of Alzheimer's disease (AD), Down's syndrome and non-AD normal persons. Acta Neuropathol 1994; 88: 201-6.

White ES, Baralle FE, Muro AF. New insights into form and function of fibronectin splice variants. J Pathol. 2008 Sep;216(1):1-14. doi: 10.1002/path.2388.

Wollina U, Huschenbeck J, Knöll B, Sternberg B, Hipler UC. Vasoactive intestinal peptide supports induced migration of human keratinocytes and their colonization of an artificial polyurethane matrix. Regul. Pept. 1997; 70:29-36.

Yepes M, Lawrence DA. Neuroserpin: a selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the central nervous system. Thromb Haemost. 2004 Mar;91(3):457-64.

Young PK, Grinell F. Metalloproteinase activation cascade after burn injury: a longitudinal analysis of the human wound environment. J Invest Dermatol 1994; 103: 660–4.

Xie J, Bian H, Qi S Xu Y, Tang J, Li T, Liu X. Effects of basic fibroblast growth factor on the expression of extracellular matrix and matrix metalloproteinase-1 in wound healing. Clin Exp Dermatol 2008; 33: 176–82.

Yang J and Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. Am J Pathol. 2001; 159, 1465-1475

Xie L, Moroi Y, Tsuji G , Liu M, Hayashida S, Takahara M, Fukagawa S, Takeuchi S, Shan B, Nakahara T, Uchi H, Yokomizo T, Furue M. CD10-bearing fibroblast inhibits matrigel invasive potency of interleukin-1α-producing squamous cell carcinoma by diminishing substance P levels in the tumor microenvironment. Cancer Sci. 2010; 101:2570-8

Yule KA, White SR. Migration of 3T3 and lung fibroblasts in response to calcitonin gene-related peptide and bombesin. Exp Lung Res. 1999; 25:261‑73.

Zeng G, McCue HM, Mastrangelo L, Millis AJ. Endogenous TGF-beta activity is modified during cellular aging: effects on metalloproteinase and TIMP-1 expression. Exp Cell Res. 1996 Nov 1;228(2):271-6.

Zhang K, Kramer RH. Laminin 5 deposition promotes keratinocyte motility. Exp Cell Res. 1996 Sep 15;227(2):309-22.

Zhao Z, Fu X, Zhang G, Li Y, Wu M, Tan Y. The influence of RAMP1 overexpression on CGRP-induced osteogenic differentiation in MG-63 cells in vitro: an experimental study. J Cell Biochem. 2013; 114:314-22.

Zylka MJ, Rice FL, Anderson DJ. Topographically distinct epidermal nociceptive circuits revealed by axonal tracers targeted to Mrgprd. Neuron. 2005 Jan 6;45(1):17-25.

Bibliographie correspondant au Tableau 8.

1. Nilsson J, Von Euler AM, Dalsgaard CJ. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. Nature. 2 mai 1985;315(6014):61‑63.

2. Jain M, LoGerfo FW, Guthrie P, Pradhan L. Effect of hyperglycemia and neuropeptides on interleukin-8 expression and angiogenesis in dermal microvascular endothelial cells. J. Vasc. Surg. juin 2011;53(6):1654‑1660.e2.

3. Wiedermann CJ, Auer B, Sitte B, Reinisch N, Schratzberger P, Kähler CM. Induction of endothelial cell differentiation into capillary-like structures by substance P. Eur. J. Pharmacol. 18 mars 1996;298(3):335‑338.

4. Gibran NS, Tamura R, Tsou R, Isik FF. Human dermal microvascular endothelial cells produce nerve growth factor: implications for wound repair. Shock. févr 2003;19(2):127‑130.

5. Ghersi G, Chen W, Lee EW, Zukowska Z. Critical role of dipeptidyl peptidase IV in neuropeptide Y-mediated endothelial cell migration in response to wounding. Peptides. mars 2001;22(3):453‑458.

6. Zukowska-Grojec Z, Karwatowska-Prokopczuk E, Rose W, Rone J, Movafagh S, Ji H, et al. Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. Circ. Res. 27 juill 1998;83(2):187‑195.

7. Movafagh S, Hobson JP, Spiegel S, Kleinman HK, Zukowska Z. Neuropeptide Y induces migration, proliferation, and tube formation of endothelial cells bimodally via Y1, Y2, and Y5 receptors. FASEB J. sept 2006;20(11):1924‑1926.

8. Haegerstrand A, Dalsgaard CJ, Jonzon B, Larsson O, Nilsson J. Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. mai 1990;87(9):3299‑3303.

9. Bocci G, Culler MD, Fioravanti A, Orlandi P, Fasciani A, Colucci R, et al. In vitro antiangiogenic activity of selective somatostatin subtype-1 receptor agonists. Eur. J. Clin. Invest. sept 2007;37(9):700‑708.

10. Matsuda S, Fujita T, Kajiya M, Takeda K, Shiba H, Kawaguchi H, et al. Brain-derived neurotrophic factor induces migration of endothelial cells through a TrkB-ERK-integrin αVβ3-FAK cascade. J. Cell. Physiol. mai 2012;227(5):2123-2129.

11. Sun C, Hu Y, Chu Z, Huang J, Zhang L. The effect of brain-derived neurotrophic factor on angiogenesis. J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. avr 2009;29(2):139-143.

12. Yu X-J, Li C-Y, Xu Y-H, Chen L-M, Zhou C-L. Calcitonin gene-related peptide increases proliferation of human HaCaT keratinocytes by activation of MAP kinases. Cell Biol. Int. nov 2009;33(11):1144‑1148.

13. Granoth R, Fridkin M, Gozes I. VIP and the potent analog, stearyl-Nle(17)-VIP, induce proliferation of keratinocytes. FEBS Lett. 16 juin 2000;475(2):78‑83.

14. Wollina U, Huschenbeck J, Knöll B, Sternberg B, Hipler UC. Vasoactive intestinal peptide supports induced migration of human keratinocytes and their colonization of an artificial polyurethane matrix. Regul. Pept. 14 mai 1997;70(1):29‑36.

15. Yu X-J, Ren X-H, Xu Y-H, Chen L-M, Zhou C-L, Li C-Y. Vasoactive intestinal peptide induces vascular endothelial growth factor production in human HaCaT keratinocytes via MAPK pathway. Neuropeptides. oct 2010;44(5):407‑411.

16. Dallos A, Kiss M, Polyánka H, Dobozy A, Kemény L, Husz S. Galanin receptor expression in cultured human keratinocytes and in normal human skin. J. Peripher. Nerv. Syst. juin 2006;11(2):156‑164.

17. Yule KA, White SR. Migration of 3T3 and lung fibroblasts in response to calcitonin gene-related peptide and bombesin. Exp. Lung Res. mai 1999;25(3):261‑273.

18. McGovern UB, Jones KT, Sharpe GR. Intracellular calcium as a second messenger following growth stimulation of human keratinocytes. Br. J. Dermatol. juin 1995;132(6):892‑896

19. Hou Q, Barr T, Gee L, Vickers J, Wymer J, Borsani E, et al. Keratinocyte expression of calcitonin gene-related peptide β: implications for neuropathic and inflammatory pain mechanisms. Pain. sept 2011;152(9):2036‑2051.

20. Takahashi K, Nakanishi S, Imamura S. Direct effects of cutaneous neuropeptides on adenylyl cyclase activity and proliferation in a keratinocyte cell line: stimulation of cyclic AMP formation by CGRP and VIP/PHM, and inhibition by NPY through G protein-coupled receptors. J. Invest. Dermatol. nov 1993;101(5):646‑651.

21. Dallos A, Kiss M, Polyánka H, Dobozy A, Kemény L, Husz S. Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and galanin on the production of nerve growth factor and inflammatory cytokines in cultured human keratinocytes. Neuropeptides. août 2006;40(4):251‑263.

22. Park YM, Kim CW. The effects of substance P and vasoactive intestinal peptide on interleukin-6 synthesis in cultured human keratinocytes. J. Dermatol. Sci. déc 1999;22(1):17‑23.

23. Kakurai M, Demitsu T, Umemoto N, Kobayashi Y, Inoue-Narita T, Fujita N, et al. Vasoactive intestinal peptide and inflammatory cytokines enhance vascular endothelial growth factor production from epidermal keratinocytes. Br. J. Dermatol. déc 2009;161(6):1232‑1238.

24. Vockel M, Pollok S, Breitenbach U, Ridderbusch I, Kreienkamp H-J, Brandner JM. Somatostatin inhibits cell migration and reduces cell counts of human keratinocytes and delays epidermal wound healing in an ex vivo wound model. PLoS ONE. 2011;6(5):e19740.

25. Baroni A, Perfetto B, Canozo N, Braca A, Farina E, Melito A, et al. Bombesin: a possible role in wound repair. Peptides. juill 2008;29(7):1157‑1166.

26. Yamaguchi Y, Hosokawa K, Nakatani Y, Sano S, Yoshikawa K, Itami S. Gastrin-releasing peptide, a bombesin-like neuropeptide, promotes cutaneous wound healing. Dermatol Surg. avr 2002;28(4):314‑319.

27. Marconi A, Terracina M, Fila C, Franchi J, Bonté F, Romagnoli G, et al. Expression and function of neurotrophins and their receptors in cultured human keratinocytes. J. Invest. Dermatol. déc 2003;121(6):1515-1521.

28. Bigliardi PL, Büchner S, Rufli T, Bigliardi-Qi M. Specific stimulation of migration of human keratinocytes by mu-opiate receptor agonists. J. Recept. Signal Transduct. Res. nov 2002;22(1-4):191-199.

29. Terao M, Murota H, Kimura A, Kato A, Ishikawa A, Igawa K, et al. 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase-1 is a novel regulator of skin homeostasis and a candidate target for promoting tissue repair. PLoS ONE. 2011;6(9):e25039.

30. Vukelic S, Stojadinovic O, Pastar I, Rabach M, Krzyzanowska A, Lebrun E, et al. Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury. J. Biol. Chem. 25 mars 2011;286(12):10265-10275.

31. Nissen JB, Kragballe K. Enkephalins modulate differentiation of normal human keratinocytes in vitro. Exp. Dermatol. oct 1997;6(5):222-229.

32. Di Marco E, Mathor M, Bondanza S, Cutuli N, Marchisio PC, Cancedda R, et al. Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop. J. Biol. Chem. 25 oct 1993;268(30):22838-22846.

33. Grewe M, Vogelsang K, Ruzicka T, Stege H, Krutmann J. Neurotrophin-4 production by human epidermal keratinocytes: increased expression in atopic dermatitis. J. Invest. Dermatol. juin 2000;114(6):1108-1112.

34. Kanda N, Koike S, Watanabe S. Prostaglandin E2 enhances neurotrophin-4 production via EP3 receptor in human keratinocytes. J. Pharmacol. Exp. Ther. nov 2005;315(2):796-804.

35. Zanello SB, Jackson DM, Holick MF. An immunocytochemical approach to the study of beta-endorphin production in human keratinocytes using confocal microscopy. Ann. N. Y. Acad. Sci. 20 oct 1999;885:85-99.

36. Cirillo N, Prime SS. Keratinocytes synthesize and activate cortisol. J. Cell. Biochem. juin 2011;112(6):1499-1505.

37. Hannen RF, Michael AE, Jaulim A, Bhogal R, Burrin JM, Philpott MP. Steroid synthesis by primary human keratinocytes; implications for skin disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 7 janv 2011;404(1):62-67.

38. Bigliardi-Qi M, Gaveriaux-Ruff C, Zhou H, Hell C, Bady P, Rufli T, et al. Deletion of delta-opioid receptor in mice alters skin differentiation and delays wound healing. Differentiation. avr 2006;74(4):174-185.

39. Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Dolara P, Maggi CA. NK1-receptors mediate the proliferative response of human fibroblasts to tachykinins. Br. J. Pharmacol. mai 1990;100(1):11‑14.

40. Parenti A, Amerini S, Ledda F, Maggi CA, Ziche M. The tachykinin NK1 receptor mediates the migration-promoting effect of substance P on human skin fibroblasts in culture. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. avr 1996;353(5):475‑481.

41. Palazzo E, Marconi A, Truzzi F, Dallaglio K, Petrachi T, Humbert P, et al. Role of neurotrophins on dermal fibroblast survival and differentiation. J. Cell. Physiol. mars 2012;227(3):1017-1025.

42. Hattori A, Hayashi K, Kohno M. Tumor necrosis factor (TNF) stimulates the production of nerve growth factor in fibroblasts via the 55-kDa type 1 TNF receptor. FEBS Lett. 29 janv 1996;379(2):157-160.

43. Micera A, Lambiase A, Stampachiacchiere B, Sgrulletta R, Normando EM, Bonini S, et al. Nerve growth factor has a modulatory role on human primary fibroblast cultures derived from vernal keratoconjunctivitis-affected conjunctiva. Mol. Vis. 2007;13:981-987.

44. Slominski A, Zbytek B, Szczesniewski A, Wortsman J. Cultured human dermal fibroblasts do produce cortisol. J. Invest. Dermatol. mai 2006;126(5):1177-1178.

45. Böhm M, Schulte U, Kalden H, Luger TA. Alpha-melanocyte-stimulating hormone modulates activation of NF-kappa B and AP-1 and secretion of interleukin-8 in human dermal fibroblasts. Ann. N. Y. Acad. Sci. 20 oct 1999;885:277-286.

46. Dunlevy JR, Couchman JR. Interleukin-8 induces motile behavior and loss of focal adhesions in primary fibroblasts. J. Cell. Sci. janv 1995;108 (Pt 1):311-321.

47. Böhm M, Wolff I, Scholzen TE, Robinson SJ, Healy E, Luger TA, et al. alpha-Melanocyte-stimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. J. Biol. Chem. 18 févr 2005;280(7):5795-5802.

48. Pratsinis H, Dimozi A, Pilichos K, Tsagarakis S, Yiacoumettis AM, Kletsas D. Previous chronic exogenous glucocorticoid administration in vivo does not affect functional characteristics and cellular lifespan of human skin fibroblasts in vitro. Exp. Dermatol. juin 2011;20(6):529-531.

49. Rassouli O, Liapakis G, Lazaridis I, Sakellaris G, Gkountelias K, Gravanis A, et al. A novel role of peripheral corticotropin-releasing hormone (CRH) on dermal fibroblasts. PLoS ONE. 2011;6(7):e21654.

50. Paus R, Heinzelmann T, Robicsek S, Czarnetzki BM, Maurer M. Substance P stimulates murine epidermal keratinocyte proliferation and dermal mast cell degranulation in situ. Arch. Dermatol. Res. 1995;287(5):500‑502.

51. Botchkarev VA, Metz M, Botchkareva NV, Welker P, Lommatzsch M, Renz H, et al. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 act as « epitheliotrophins » in murine skin. Lab. Invest. mai 1999;79(5):557-572.

52. Gold LI, Sung JJ, Siebert JW, Longaker MT. Type I (RI) and type II (RII) receptors for transforming growth factor-beta isoforms are expressed subsequent to transforming growth factor-beta ligands during excisional wound repair. Am. J. Pathol. janv 1997;150(1):209-222.

53. Regauer S, Compton CC. Cultured keratinocyte sheets enhance spontaneous re-epithelialization in a dermal explant model of partial-thickness wound healing. J. Invest. Dermatol. sept 1990;95(3):341‑346.

54. Beggs S, Alvares D, Moss A, Currie G, Middleton J, Salter MW, et al. A role for NT-3 in the hyperinnervation of neonatally wounded skin. Pain 2012; 153 (10):2133-9

55. Engelhart K, El Hindi T, Biesalski H-K, Pfitzner I. In vitro reproduction of clinical hallmarks of eczematous dermatitis in organotypic skin models. Arch. Dermatol. Res. juill 2005;297(1):1-9.

56. Bigliardi PL, Sumanovski LT, Büchner S, Rufli T, Bigliardi-Qi M. Different expression of mu-opiate receptor in chronic and acute wounds and the effect of beta-endorphin on transforming growth factor beta type II receptor and cytokeratin 16 expression. J. Invest. Dermatol. janv 2003;120(1):145-152.

57. Kishimoto S. The regeneration of substance P-containing nerve fibres in the process of burn wound healing in the guinea pig skin. J. Invest. Dermatol. sept 1984;83(3):219‑223.

58. Pradhan L, Cai X, Wu S, Andersen ND, Martin M, Malek J, et al. Gene expression of pro-inflammatory cytokines and neuropeptides in diabetic wound healing. J. Surg. Res. 15 mai 2011;167(2):336‑342.

59. Spenny ML, Muangman P, Sullivan SR, Bunnett NW, Ansel JC, Olerud JE, et al. Neutral endopeptidase inhibition in diabetic wound repair. Wound Repair Regen. oct 2002;10(5):295‑301.

60. Muangman P, Tamura RN, Muffley LA, Isik FF, Scott JR, Xie C, et al. Substance P enhances wound closure in nitric oxide synthase knockout mice. J. Surg. Res. 15 mai 2009;153(2):201‑209.

61. Gibran NS, Jang YC, Isik FF, Greenhalgh DG, Muffley LA, Underwood RA, et al. Diminished neuropeptide levels contribute to the impaired cutaneous healing response associated with diabetes mellitus. J. Surg. Res. nov 2002;108(1):122‑128.

62. Scott JR, Tamura RN, Muangman P, Isik FF, Xie C, Gibran NS. Topical substance P increases inflammatory cell density in genetically diabetic murine wounds. Wound Repair Regen. août 2008;16(4):529‑533.

63. Toda M, Suzuki T, Hosono K, Kurihara Y, Kurihara H, Hayashi I, et al. Roles of calcitonin gene-related peptide in facilitation of wound healing and angiogenesis. Biomed. Pharmacother. août 2008;62(6):352‑359.

64. Seike M, Ikeda M, Morimoto A, Matsumoto M, Kodama H. Increased synthesis of calcitonin gene-related peptide stimulates keratinocyte proliferation in murine UVB-irradiated skin. J. Dermatol. Sci. févr 2002;28(2):135‑143.

65. Collado B, Carmena MJ, Clemente C, Prieto JC, Bajo AM. Vasoactive intestinal peptide enhances growth and angiogenesis of human experimental prostate cancer in a xenograft model. Peptides. sept 2007;28(9):1896‑1901.

66. Shi C-M, Qu J-F, Cheng T-M. Effects of the nerve growth factor on the survival and wound healing in mice with combined radiation and wound injury. J. Radiat. Res. sept 2003;44(3):223-228.

67. McLaughlin PJ, Keiper CL, Verderame MF, Zagon IS. Targeted overexpression of OGFr in epithelium of transgenic mice suppresses cell proliferation and impairs full-thickness wound closure. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. mai 2012;302(9):R1084-1090.

68. Younan G, Ogawa R, Ramirez M, Helm D, Dastouri P, Orgill DP. Analysis of nerve and neuropeptide patterns in vacuum-assisted closure-treated diabetic murine wounds. Plast. Reconstr. Surg. juill 2010;126(1):87‑96.

69. Holmes FE, Mahoney S-A, Wynick D. Use of genetically engineered transgenic mice to investigate the role of galanin in the peripheral nervous system after injury. Neuropeptides. juin 2005;39(3):191‑199.

70. Muffley LA, Zhu KQ, Engrav LH, Gibran NS, Hocking AM. Spatial and temporal localization of the melanocortin 1 receptor and its ligand α-melanocyte-stimulating hormone during cutaneous wound repair. J. Histochem. Cytochem. mars 2011;59(3):278-288.

71. Khalil Z, Helme R. Sensory peptides as neuromodulators of wound healing in aged rats. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. sept 1996;51(5):B354‑361.

72. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Exogenous administration of Substance P enhances wound healing in a novel skin-injury model. Exp. Biol. Med. (Maywood). avr 2005;230(4):271‑280.

73. Rook JM, McCarson KE. Delay of cutaneous wound closure by morphine via local blockade of peripheral tachykinin release. Biochem. Pharmacol. 1 sept 2007;74(5):752‑757.

74. Rook JM, Hasan W, McCarson KE. Morphine-induced early delays in wound closure: involvement of sensory neuropeptides and modification of neurokinin receptor expression. Biochem. Pharmacol. 1 juin 2009;77(11):1747‑1755.

75. Walsh DA, Hu DE, Mapp PI, Polak JM, Blake DR, Fan TP. Innervation and neurokinin receptors during angiogenesis in the rat sponge granuloma. Histochem. J. nov 1996;28(11):759‑769.

76. Benrath J, Zimmermann M, Gillardon F. Substance P and nitric oxide mediate would healing of ultraviolet photodamaged rat skin: evidence for an effect of nitric oxide on keratinocyte proliferation. Neurosci. Lett. 10 nov 1995;200(1):17‑20.

77. Sterne GD, Brown RA, Green CJ, Terenghi G. NT-3 modulates NPY expression in primary sensory neurons following peripheral nerve injury. J. Anat. août 1998;193 (Pt 2):273‑281.

78. Hashim MA, Tadepalli AS. Cutaneous vasomotor effects of neuropeptide Y. Neuropeptides. nov 1995;29(5):263‑271.

79. Ekstrand AJ, Cao R, Bjorndahl M, Nystrom S, Jonsson-Rylander A-C, Hassani H, et al. Deletion of neuropeptide Y (NPY) 2 receptor in mice results in blockage of NPY-induced angiogenesis and delayed wound healing. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 13 mai 2003;100(10):6033‑6038.

80. Engin C. Effects of calcitonin gene-related peptide on wound contraction in denervated and normal rat skin: a preliminary report. Plast. Reconstr. Surg. juin 1998;101(7):1887‑1890.

81. Yang J, Zong CH, Zhao ZH, Hu XD, Shi QD, Xiao XL, et al. Vasoactive intestinal peptide in rats with focal cerebral ischemia enhances angiogenesis. Neuroscience. 30 juin 2009;161(2):413‑421.

82. Rayan GM, Johnson C, Pitha J, Cahill S, Said S. Vasoactive intestinal peptide and nerve growth factor effects on nerve regeneration. J Okla State Med Assoc. août 1995;88(8):337‑341.

83. Green PG, Basbaum AI, Levine JD. Sensory neuropeptide interactions in the production of plasma extravasation in the rat. Neuroscience. oct 1992;50(3):745‑749.

84. Nithya M, Suguna L, Rose C. The effect of nerve growth factor on the early responses during the process of wound healing. Biochim. Biophys. Acta. 17 mars 2003;1620(1-3):25-31.

85. Li AK, Koroly MJ, Schattenkerk ME, Malt RA, Young M. Nerve growth factor: acceleration of the rate of wound healing in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. juill 1980;77(7):4379-4381.

86. Apkarian RP, Curtis JC. Hormonal regulation of capillary fenestrae in the rat adrenal cortex: quantitative studies using objective lens staging scanning electron microscopy. Scan Electron Microsc. 1986;(Pt 4):1381-1393.

87. Shekhter AB, Solov'eva AI, Spevak SE, Titov MI. [Effects of opioid peptide dalargin on reparative processes in wound healing]. Biull Eksp Biol Med. oct 1988;106(10):487-490.

88. Kohl A, Werner A, Buntrock P, Diezel W, Adrian K, Titov MI. [The effect of the peptide dalargin on wound healing]. Dermatol Monatsschr. 1989;175(9):561-572.

89. Vinogradov VA, Spevak SE, Larygin KN, Korobov NV, Solov'eva AI. [Opioid activity of peptides and wound healing of the skin]. Biull Eksp Biol Med. juill 1987;104(7):89-91.

90. Lai X, Wang Z, Wei L, Wang L. Effect of substance P released from peripheral nerve ending on endogenous expression of epidermal growth factor and its receptor in wound healing. Chin. J. Traumatol. juin 2002;5(3):176‑179.

91. Wallengren J, Chen D, Sundler F. Neuropeptide-containing C-fibres and wound healing in rat skin. Neither capsaicin nor peripheral neurotomy affect the rate of healing. Br. J. Dermatol. mars 1999;140(3):400‑408.

92. Cavallini M, Casati A. A prospective, randomized, blind comparison between saline, calcium gluconate and diphoterine for washing skin acid injuries in rats: effects on substance P and beta-endorphin release. Eur J Anaesthesiol. mai 2004;21(5):389‑392.

93. Dahl J, Li J, Bring DK-I, Renström P, Ackermann PW. Intermittent pneumatic compression enhances neurovascular ingrowth and tissue proliferation during connective tissue healing: a study in the rat. J. Orthop. Res. sept 2007;25(9):1185‑1192.

94. Jimenez-Andrade JM, Zhou S, Du J, Yamani A, Grady JJ, Castañeda-Hernandez G, et al. Pro-nociceptive role of peripheral galanin in inflammatory pain. Pain. juill 2004;110(1-2):10‑21.

95. Jimenez-Andrade JM, Zhou S, Yamani A, Valencia de Ita S, Castañeda-Hernandez G, Carlton SM. Mechanism by which peripheral galanin increases acute inflammatory pain. Brain Res. 21 sept 2005;1056(2):113‑117.

96. Hasan W, Zhang R, Liu M, Warn JD, Smith PG. Coordinate expression of NGF and alpha-smooth muscle actin mRNA and protein in cutaneous wound tissue of developing and adult rats. Cell Tissue Res. avr 2000;300(1):97-109.

97. Lee KF, Li E, Huber LJ, Landis SC, Sharpe AH, Chao MV, et al. Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. Cell. 29 mai 1992;69(5):737-749.

98. Cheng B, Liu H, Fu X, Sheng Z, Qiu J, Cao R. [Expression of beta-endorphin and micro-opioid receptor during wound healing process in rat with deep partial-thickness scald]. Zhonghua Shao Shang Za Zhi. févr 2007;23(1):36-39.

99. Dunnick CA, Gibran NS, Heimbach DM. Substance P has a role in neurogenic mediation of human burn wound healing. J Burn Care Rehabil. oct 1996;17(5):390‑396.

100. Scott JR, Muangman PR, Tamura RN, Zhu KQ, Liang Z, Anthony J, et al. Substance P levels and neutral endopeptidase activity in acute burn wounds and hypertrophic scar. Plast. Reconstr. Surg. avr 2005;115(4):1095‑1102.

101. Altun V, Hakvoort TE, Van Zuijlen PP, Van der Kwast TH, Prens EP. Nerve outgrowth and neuropeptide expression during the remodelling of human burn wound scars. A 7-month follow-up study of 22 patients. Burns. nov 2001;27(7):717‑722.

102. Olerud JE, Usui ML, Seckin D, Chiu DS, Haycox CL, Song IS, et al. Neutral endopeptidase expression and distribution in human skin and wounds. J. Invest. Dermatol. juin 1999;112(6):873‑881.

103. Levy DM, Karanth SS, Springall DR, Polak JM. Depletion of cutaneous nerves and neuropeptides in diabetes mellitus: an immunocytochemical study. Diabetologia. juill 1989;32(7):427‑433.

104. Antezana M, Sullivan SR, Usui M, Gibran N, Spenny M, Larsen J, et al. Neutral endopeptidase activity is increased in the skin of subjects with diabetic ulcers. J. Invest. Dermatol. déc 2002;119(6):1400‑1404.

105. Crowe R, Parkhouse N, McGrouther D, Burnstock G. Neuropeptide-containing nerves in painful hypertrophic human scar tissue. Br. J. Dermatol. avr 1994;130(4):444‑452.

106. Onuoha GN, Alpar EK. Levels of vasodilators (SP, CGRP) and vasoconstrictor (NPY) peptides in early human burns. Eur. J. Clin. Invest. mars 2001;31(3):253‑257.

107. Ahlborg G, Lundberg JM. Exercise-induced changes in neuropeptide Y, noradrenaline and endothelin-1 levels in young people with type I diabetes. Clin Physiol. nov 1996;16(6):645‑655.

108. Pincelli C, Fantini F, Romualdi P, Sevignani C, Lesa G, Benassi L, et al. Substance P is diminished and vasoactive intestinal peptide is augmented in psoriatic lesions and these peptides exert disparate effects on the proliferation of cultured human keratinocytes. J. Invest. Dermatol. avr 1992;98(4):421‑427.

109. Björklund H, Dalsgaard CJ, Jonsson CE, Hermansson A. Sensory and autonomic innervation of non-hairy and hairy human skin. An immunohistochemical study. Cell Tissue Res. 1986;243(1):51‑57.

110. Giannetti A, Fantini F, Cimitan A, Pincelli C. Vasoactive intestinal polypeptide and substance P in the pathogenesis of atopic dermatitis. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh). 1992;176:90‑92.

111. Raap U, Goltz C, Deneka N, Bruder M, Renz H, Kapp A, et al. Brain-derived neurotrophic factor is increased in atopic dermatitis and modulates eosinophil functions compared with that seen in nonatopic subjects. J. Allergy Clin. Immunol. juin 2005;115(6):1268-1275.

112. Wintzen M, Ostijn DM, Polderman MC, Le Cessie S, Burbach JP, Vermeer BJ. Total body exposure to ultraviolet radiation does not influence plasma levels of immunoreactive beta-endorphin in man. Photodermatol Photoimmunol Photomed. déc 2001;17(6):256-260.

113. Tanaka T, Danno K, Ikai K, Imamura S. Effects of substance P and substance K on the growth of cultured keratinocytes. J. Invest. Dermatol. mars 1988;90(3):399‑401.

114. Burbach GJ, Kim KH, Zivony AS, Kim A, Aranda J, Wright S, et al. The neurosensory tachykinins substance P and neurokinin A directly induce keratinocyte nerve growth factor. J. Invest. Dermatol. nov 2001;117(5):1075‑1082.

115. Hill RP, Wheeler P, MacNeil S, Haycock JW. Alpha-melanocyte stimulating hormone cytoprotective biology in human dermal fibroblast cells. Peptides. juill 2005;26(7):1150-1158.

Annexe

Curriculum Vitae

Jérémy CHERET
5, rue Bois d'amour
29200 Brest
Port : 06.75.79.49.53.
E-Mail : jeremy.cheret@hotmail.fr
26 ans
Permis B

FORMATION

2009 – 2012 Thèse Biologie de la santé – Agroparitech, école doctorale ABIES (75)

Juin 2009 Master 2 Recherche – Université de Caen Basse Normandie (14) :
«Biologie de la santé, option Neurosciences »

Juin 2008 Master 1 – Université de Caen Basse Normandie (14) :
«Biologie Fondamentale et Appliquée, option Neurosciences »

Juin 2007 Licence Professionnelle – Institut Universitaire de Technologie de Caen (14) :
« Biologie Analytique et Expérimentale » - Mention Assez bien

Juin 2006 Brevet de Technicien Supérieur – Lycée Le Gros Chêne de Pontivy (56) :
« Analyses Agricoles Biologiques et Biotechnologiques »

Juin 2004 Baccalauréat Technologique - ESAT de Giel Courteilles (61) :
« Sciences et Technologies de l'Agronomie et de l'Environnement »

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

Novembre 2009 – Avril 2013
Laboratoire de Neurosciences de Brest – EA 4695 (29200 Brest)
(Thèse de sciences sous la direction du Pr L. Misery et du Dr C Legall-Ianotto)

- « Effet du système nerveux périphérique sur la cicatrisation cutanée »

Septembre 2008 – Juin 2009
Centre CYCERON (14032 Caen)
(Stage Master 2 Recherche sous la responsabilité du Pr F. Mouriaux et du Dr O. Nicole)

- « Etude du promoteur de la neuroserpine dans les processus tumoraux »

Mai - juin 2008

Centre CYCERON (14032 Caen)
(Stage bibliographique Master 1 sous la responsabilité du Pr A. Buisson et du Dr O. Nicole)

- « Rôle de l'épigénétique dans la physiopathologie du système nerveux central »

Mars - juin 2007

Centre CYCERON (14032 Caen)
(Stage Licence Professionnelle sous la responsabilité du Dr O. Nicole)

- « Etude de la surexpression de Neuroserpine dans les tumeurs cérébrales »

Décembre 2005 – Février 2006

Laboratoire Départemental de l'Orne (61000 Alençon) - Unité de virologie
(Stage Brevet de Technicien Supérieur sous la responsabilité du Dr H. **Achour**)

- « Amélioration de la technique d'immunofluorescence indirecte *Neospora caninum* »

Août 2003

EARL des Tilleuls (61510 Château d'Almenêches)
(Stage Baccalauréat Technologique)

- « Etude de différentes stratégies fongiques sur le blé »

Travail saisonnier :

Argentan Distribution – E. LECLERC (61200 Argentan)

- Employé commercial
- Mise en rayon, conseil auprès des clients.

COMPETENCES TECHNIQUES

- Culture cellulaire :
  - Lignée cellulaire humaine tumorale,
  - Transfections stables et transitoires,
  - Cellules VERO (cellules de rein) de singe vert d'Afrique,
  - Culture d'explants de peau humaine,
  - Extraction et culture de DRGs de rats.

- Biologie Moléculaire :
  - Kits ELISA,
  - Immunofluorescence indirecte (détection d'anticorps spécifiques dans des sérums bovins),
  - Techniques d'histologie (colorations, coupes cryostat)
  - Immunohistochimie,
  - RT-PCR, PCR quantitative,
  - Etude de la méthylation de l'ADN,
  - Western Blot,
  - Technique de clonage.

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

- Loisirs : Rugby, V.T.T., Lecture
- Anglais : Lu, Ecrit, Parlé.
- Informatique: Word, Excel, Power point.

COMMUNICATION SCIENTIFIQUE

Articles Scientifiques :

Article Soumis: **Influence of sensory neuropeptides and NGF on human cutaneous wound healing process**
Chéret J., Lebonvallet N., Buhé V., Misery L., Le Gall-Ianotto C.

Role of neurotransmitters, neurotrophins and neurohormones in skin wound healing
Chéret J., Lebonvallet N., Misery L., Le Gall-Ianotto C.

Expression of neuroserpin, a selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the human skin.
Chéret J, Lebonvallet N, Misery L, Le Gall-Ianotto C. Exp Dermatol. 2012 Sep;21(9):710-1

Characterization of neurons from adult human skin-derived precursors in serum-free medium : a PCR array and immunocytological analysis.
Lebonvallet N, Boulais N, Le Gall C, **Chéret J**, Pereira U, Mignen O, Bardey V, Jeanmaire C, Danoux L, Pauly G, Misery L. Exp Dermatol. 2012 Mar;21(3):195-200

Congrés :

Congrès international ‘‘International Investigative Dermatology’’ (IID) à Edimbourg (Ecosse) ; 8 au 11 mai 2013
Poster : **Chéret J**., Le Gall C., Lebonvallet N., Misery L
Effect of the peripheral nervous system on skin wound healing

Congrés annuel des ‘‘Journées Dermatologiques de Paris’’ (JDP) à Paris; 11 au 15 Décembre 2012
Communication Orale: **Chéret J**., Le Gall C., Lebonvallet N., Misery L.
Expression d’un inhibiteur des sérines-protéases, la neuroserpine, dans la peau.

Congrés annuel des ‘‘Journées Dermatologiques de Paris’’ (JDP) à Paris; 11 au 15 Décembre 2012
Communication Orale: **Chéret J**., Le Gall C., Lebonvallet N., Misery L.
Effets du NGF et de neuromédiateurs sur la cicatrisation cutanée.

Journée des Jeunes Chercheurs à Brest; 19 Octobre 2012
Communication orale: **Chéret J**., Le Gall C., Lebonvallet N., Misery L.
Effets du NGF et de neuromédiateurs sur la cicatrisation cutanée.

Congrés annuel de ‘‘European Society for Dermatological Research’’ (ESDR) à Venise (Italie); 19 au 22 Septembre 2012

Poster: **Chéret J**., Le Gall C., Lebonvallet N., Misery L.
Expression of neuroserpin, a serine-protease inhibitor, in the human skin.

Congrés annuel de ‘‘European Society for Dermatological Research’’ (ESDR) à Venise (Italie); 19 au 22 Septembre 2012
Poster: **Chéret J.**, Le Gall C., Lebonvallet N., Misery L.
Effects of neuromediators and Nerve Growth Factor on skin wound healing

Congrés annuel de la recherche en dermatologie (CARD) à Lausanne; 21 au 22 Juin 2012
Poster: **Chéret J**., Le Gall C., Lebonvallet N., Misery L.
Effets de molécules d'origine neuronale sur l'adhérence des fibroblastes humains et sur leur différenciation en myofibroblastes.

Congrés annuel de la recherche en dermatologie (CARD) à Besançon; 23 au 24 Juin 2011
Communication Orale: **Chéret J**., Le Gall C., Lebonvallet N., Misery L.
Expression d’un inhibiteur des sérines-protéases, la neuroserpine, dans la peau.

Congrés annuel de la recherche en dermatologie (CARD) à Besançon; 23 au 24 Juin 2011
Communication Orale: **Chéret J**., Le Gall C., Lebonvallet N., Misery L.
Effets du NGF et de neuromédiateurs sur la cicatrisation cutanée.

Congrés annuel de “The association for research in vision and ophthalmology” à Fort Lauderdale en Floride (USA); 2 au 7 Mai 2009
Poster: Calipel A., Abonnet V., **Cheret J.**, Nicole O., Mascarelli F., Mouriaux F.
Involvement of reduced expression of RASSF1in uveal Melanoma Cells proliferation through Erk1/2 pathway

9ème Colloque de la Société des Neurosciences à Bordeaux; 26 au 29 Mai 2009
Poster: El gaamouch F., Moustié O., **Cheret J.,** Buisson A., Nicole O.
NMDAR-induced ERK activation is dependent on calcium/calmodulin dependant protein kinases II compartmentalization: role of F-actin and β CamKII interactions