

OLIVIER ROCHETTE-DROUIN

**LA DYNAMIQUE DU POTENTIEL TRANS-  
ÉPITHÉLIAL AU COURS DE LA CICATRISATION DE  
LA PEAU**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire  
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2012

## Résumé

Le potentiel trans-épithélial (PTE) représente la différence de charges qui existe dans un tissu étanche composé de cellules pluristratifiées. La distribution inégale de certains ions à travers l'épiderme est responsable de sa présence dans la peau. Des mesures de PTE ont été effectuées à différents temps lors de la genèse de l'épiderme ainsi que durant la réépithélialisation d'une plaie sur un modèle de peau humaine reconstruite par génie tissulaire. L'intensité du PTE varie en fonction du temps dans les deux conditions et cette cinétique a été confirmée au cours de la réépithélialisation d'une plaie sur un modèle *in vivo*. L'expression des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase varie elles aussi en fonction du temps et l'utilisation de l'amiloride, un inhibiteur du transport cationique, module négativement la cinétique du PTE par rapport au groupe témoin en plus de retarder la réépithélialisation de la plaie.

## Remerciements

En premier lieu, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Dr Lucie Germain, pour m'avoir donné une chance dans son équipe et pour m'avoir fait confiance. Sa rigueur et sa passion pour les sciences m'a amené à me dépasser et à apprendre concrètement ce que c'est que la recherche scientifique. Merci au Dr François A. Auger, directeur du LOEX de m'avoir accueilli dans son établissement et de partager avec nous les réalisations cliniques de la recherche fondamentale. Merci également à ma codirectrice, Véronique Moulin, pour sa disponibilité, ses conseils, son intérêt dans mes recherches et sa supervision. Vous m'avez donné une liberté de travail et une confiance absolue au cours des dernières années.

Un merci bien spécial à Jean Dubé qui a été mon mentor avant de débiter ma maîtrise. Nous avons partagé des réussites et des échecs, mais surtout il m'a montré à sortir des sentiers battus et à penser autrement afin d'innover. Bon vivant, j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec lui, particulièrement lors des interminables mesures du potentiel trans-épithélial.

Merci aussi à tous mes collègues de bureau, Jean-Michel Bourget, Rémi Parenteau-Bareil, Mathieu Blais, Marie-Claude Letellier et les autres étudiants pour votre bonne humeur, votre partage de connaissances et les nombreuses discussions, parfois à caractère scientifique, d'autres fois plus légères, qui m'ont procuré d'heureux moments de détente. Je n'oublie pas tous les autres membres du LOEX qui nous simplifient souvent la tâche en tant qu'étudiant.

Finalement, je remercie du plus profond de mon cœur, mon amour, Émilie, pour son support, sa compréhension, son endurance et son amour.



# Table des matières

RÉSUMÉ.....	II
TABLE DES MATIÈRES .....	IV
LISTE DES TABLEAUX .....	VII
LISTES DES FIGURES .....	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	IX
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION .....	1
<b>1.1. La peau.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Hypoderme .....	2
1.1.2. Derme .....	2
1.1.3. Épiderme .....	3
1.1.3.1. Couche basale.....	4
1.1.3.2. Couche épineuse.....	4
1.1.3.3. Couche granuleuse.....	4
1.1.3.4. Couche cornée .....	4
<b>1.2. Électricité.....</b>	<b>5</b>
1.2.1. Champ électrique .....	6
1.2.2. Différence de potentiel.....	6
1.2.3. Potentiel trans-épithélial (PTE) .....	7
1.2.4. Champ électrique endogène (CEE) .....	9
<b>1.3. Transport sodique dans les kératinocytes .....</b>	<b>10</b>
1.3.1. Distribution ionique .....	11
1.3.2. Les ions Na <sup>+</sup> et Cl <sup>-</sup> .....	12
1.3.3. La diffusion facilitée .....	13
1.3.4. Les canaux épithéliaux sodiques (ENaC) .....	13
1.3.5. Transport actif.....	15
1.3.6. Pompes sodium-potassium.....	15
<b>1.4. La guérison d'une plaie .....</b>	<b>18</b>
1.4.1. L'inflammation .....	19
1.4.2. Formation de nouveaux tissus .....	19
1.4.3. Remodelage .....	21
<b>1.5. La réépithélialisation de la plaie .....</b>	<b>21</b>
1.5.1. La migration.....	22
1.5.2. La prolifération et la différenciation .....	25
<b>1.6. Génie tissulaire .....</b>	<b>25</b>



1.7. La peau produite par génie tissulaire.....	26
1.8. Problématique et objectifs de la recherche .....	27
<b>CHAPITRE 2 : RESTAURATION DU POTENTIEL TRANS-ÉPITHÉLIAL <i>IN VITRO</i> SUR UN MODÈLE DE PEAU RECONSTRUITE PAR GÉNIE TISSULAIRE ET DURANT LE PROCESSUS DE LA GUÉRISON D'UNE PLAIE <i>IN VIVO</i>.</b> .....	<b>32</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1. Résumé</b> .....	<b>33</b>
<b>2.2. Restoration of the Transepithelial Potential Within Tissue-Engineered Human Skin <i>In Vitro</i> and During the Wound Healing Process <i>In Vivo</i>.</b> .....	<b>34</b>
<b>Auteurs</b> .....	<b>34</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>35</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>36</b>
<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>37</b>
Cell Culture .....	37
Human skin produced by tissue engineering .....	38
Wound healing model on TES .....	38
Measurement of TEP on TES and on wounded TES .....	39
Measurement of TEP <i>in vivo</i> .....	39
Reepithelialization rate measurement.....	40
Histology .....	40
Immunofluorescence .....	40
Effect of pharmacological agent on TEP in TES .....	41
Proliferation and pharmacological drugs exposition .....	41
Migration scratch test .....	41
Statistical analyses .....	42
<b>RESULTS</b> .....	<b>42</b>
Meaurement of TEP during formation of the epidermis on TES .....	42
Measurement of TEP during reepithelialization of the epidermis on TES .....	43
Measurement of TEP during wound reepithelialization <i>in vivo</i> .....	44
Measurement of TEP during reepithelialization of the epidermis on TES in the presence of amiloride.....	44
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>45</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>48</b>

<b>ACKNOWLEDGMENTS .....</b>	<b>48</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>56</b>
<b>CHAPITRE 3: DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>58</b>
<b>3.1. Discussion .....</b>	<b>58</b>
3.1.1. La dynamique du PTE .....	58
3.1.2. La différenciation et le PTE.....	59
3.1.3. Les protéines Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase et le potentiel trans-épithélial (PTE) .....	60
3.1.4. L'amiloride et le PTE.....	61
3.1.5. La peau reconstruite et le PTE .....	61
<b>3.2. Perspectives .....</b>	<b>62</b>
3.2.1. La mesure du PTE .....	62
3.2.2. Les pompes Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase .....	63
3.2.3. Le calcium .....	64
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>65</b>
<b>CHAPITRE 4 : BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>67</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1.1. Concentration intracellulaire et extracellulaire des principaux ions.....	12
--	----

## Listes des figures

### Chapitre 1

<b>Figure 1.1.</b> Représentation schématique de la peau.....	1
<b>Figure 1.2.</b> Représentation schématique de l'épiderme.....	3
<b>Figure 1.3.</b> Représentation schématique de la distinction entre le courant circulant dans un circuit conducteur sec par rapport à une solution d'électrolytes.....	5
<b>Figure 1.4.</b> Représentation schématique de la distribution des ions $\text{Na}^+$ dans l'épiderme formant le PTE.....	8
<b>Figure 1.5.</b> Représentation schématique du CEE lors d'une plaie dans la peau.....	10
<b>Figure 1.6.</b> Représentation schématique du canal ENaC.....	14
<b>Figure 1.7.</b> Mécanisme d'action de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase.....	16
<b>Figure 1.8.</b> Représentation schématique des trois principales étapes de réparation lors d'une blessure cutanée.....	20
<b>Figure 1.9.</b> Représentation schématique de la migration cellulaire.....	23
<b>Figure 1.10.</b> Représentation schématique de la polymérisation d'actine lors de la protrusion.....	24

### Chapitre 2

<b>Figure 2.1.</b> Method of transepithelial potential (TEP) measurement <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .....	50
---	----



<b>Figure 2.2.</b> Formation of the epidermis on TES.....	51
<b>Figure 2.3.</b> Restoration of the epidermis on TES.....	52
<b>Figure 2.4.</b> Measurements of TEP according to time during reepithelialization of the skin wounds in pigs. ....	53
<b>Figure 2.5.</b> Measurement of TEP and the rate of reepithelialization of the wound over time in the presence of a cationic transport blocker.....	54

## Liste des abréviations

A : Ampères

ATP : Adénosine triphosphate

ADP : Adénosine diphosphate

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

Ca<sup>2+</sup> : Ions calcium

CEE : Champ électrique endogène

CFTR : *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (Régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique)

Cl<sup>-</sup> : Ions chlore

ΔG : Énergie libre

ΔS : Entropie

EGF : *Epidermal growth factor* (Facteur de croissance épidermique)

ENaC : *Epithelium Sodium Channel* (Canal sodique épithélial)

GAG : Glycosaminoglycanes

GTP : Guanosine triphosphate

H<sup>+</sup> : Ions hydrogène ou protons

I : Courant

K<sup>+</sup> : Ions potassium

KGF : *Keratinocytes growth factor* (Facteur de croissance des kératinocytes)

LOEX : Laboratoire d'organogenèse expérimentale

m : Mètre

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase* (Protéine kinase mitogène activatrice)

MEC : Matrice extracellulaire

Mg<sup>2+</sup> : Ions magnésium

mm : millimètre

mV : millivolt

Na<sup>+</sup> : Ions sodium

N/C : Newton/Coulomb

NMDA : *N-méthyl-D-aspartic acid* (Acide N-méthyle-D-aspartique)

PGE2 : Prostaglandine E2

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PKA : Protéine kinase A

PTE : Potentiel trans-épithélial

R : Résistance

SI : Système International

TGF : *Transforming growth factor* (Facteur de croissance transformant)

VGCC : *Voltage-gated calcium channel* (Canal calcique voltage dépendant)

V/m : Volt/mètre

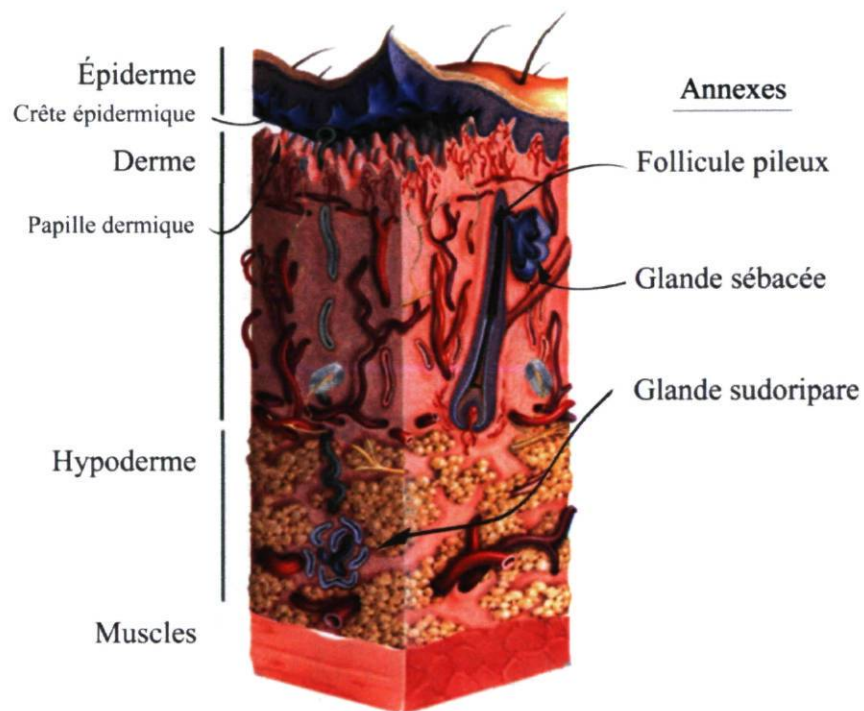
V : Volt



# Chapitre 1 : Introduction

## 1.1. La peau

La peau est l'organe qui recouvre la surface du corps humain. En tenant compte de sa surface et de son poids, c'est l'un des organes les plus importants du corps humain. Au cours d'une vie, elle se renouvelle constamment afin de s'ajuster aux changements ou aux traumatismes physiques que le corps subit. Son



**Figure 1.1.** Représentation schématique de la peau.

La peau comprend trois couches. L'épiderme en superficie, le derme au centre et l'hypoderme repose sur les muscles. À la jonction derme-épiderme, le derme forme des papilles dermiques et l'épiderme des crêtes épidermiques pour augmenter la surface de contact des deux composants. Les follicules pileux, les glandes sébacées ainsi que les glandes sudoripares se trouvent également dans la peau. Schéma adapté de Geras. (Geras, 1990)

renouvellement assure aussi le maintien perpétuel de ses fonctions de barrière physique et chimique entre les organes internes et l'environnement, d'isolant thermique, de synthèse de la vitamine D et de prévention contre la déshydratation. De plus, le sens du toucher et la perception des variations de température est possible grâce à des récepteurs spécifiques présents dans la peau reliés au système nerveux central. Cet organe est constitué de trois types de tissus sur une possibilité de quatre et ils sont répartis sur trois couches distinctes (figure 1.1).

### **1.1.1. Hypoderme**

La couche la plus profonde de la peau est l'hypoderme. D'une épaisseur variable selon le site anatomique, elle sert de zone tampon entre le derme et les structures mobiles que sont les muscles et les tendons. C'est un tissu conjonctif lâche fortement vascularisé et constitué d'adipocytes qui entreposent des lipides. Des cellules souches multipotentes isolées à partir de la fraction stromale du tissu adipeux peuvent être cultivées et différenciées *in vitro* vers une lignée de cellules adipogéniques, chondrogéniques ou ostéogéniques (Zuk et al., 2002).

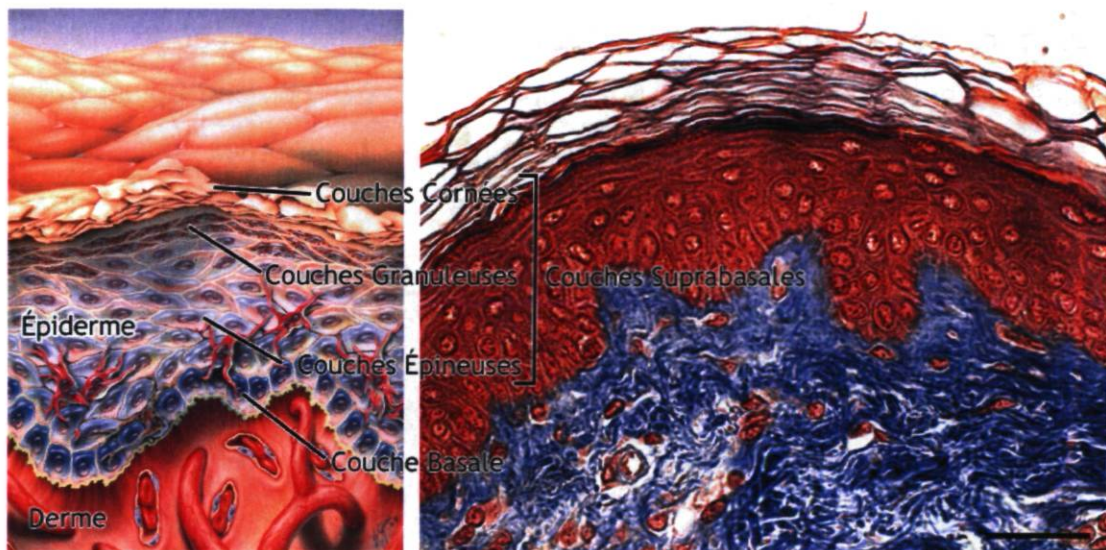
### **1.1.2. Derme**

Au-dessus se trouve une couche de tissu conjonctif plus ferme que l'hypoderme, le derme. Il est principalement constitué de fibroblastes qui produisent et assemblent une charpente dynamique formée de fibres de collagène de type I, III et V de longueurs variables sur lequel l'épiderme s'ancre. Les fibroblastes sécrètent aussi des cytokines et de l'interféron  $\beta$  collaborant au système immunitaire. Des fibres d'élastines apportent souplesse et élasticité à la structure dont l'espace est occupé par un réseau de capillaires sanguins et lymphatiques qui apporte les nutriments et élimine les déchets par diffusion. En plus, le derme contient des cellules nerveuses qui forment un autre réseau et qui participent à la transmission des influx nerveux (Steven and Stevens, 1999; Tortora and Grabowski, 1994).



### 1.1.3. Épiderme

L'épiderme, la couche superficielle de la peau, repose sur le derme et assure l'étanchéité du corps via des jonctions intercellulaires. La jonction dermo-épidermique est assurée par la membrane basale, une couche de matrice extracellulaire (MEC) spécialisée. L'épiderme, un tissu épithélial stratifié non-vascularisé, contient des terminaisons nerveuses reliées au réseau dermique. Il est composé presque exclusivement de kératinocytes qui forment quatre couches distinctes selon leur stade de différenciation : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et finalement la couche cornée (Briggaman and Wheeler, 1975). La figure 1.2 illustre bien les différentes couches.



**Figure 1.2.** Représentation schématique de l'épiderme.

L'épiderme est constitué d'un empilement de kératinocytes à divers stades de différenciation. La couche basale est la plus profonde et la moins différenciée. Les couches suprabasales comprennent la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée. Ces couches se distinguent par leur stade de différenciation. Une coupe histologique colorée au trichrome de Masson (à droite) donne un aperçu de ce à quoi ressemble l'épiderme de la peau humaine. Schéma adapté de Geras. (Geras, 1990)



### **1.1.3.1. Couche basale**

La première couche de cellules épithéliales sur le derme, la couche basale, s'ancre à la membrane basale via des complexes protéiques, les hémidesmosomes, dont ses composants établissent des contacts directs avec la MEC. Environ 10% des kératinocytes qui composent cette couche, la plus profonde de l'épiderme, sont des cellules souches épithéliales cruciales au renouvellement de l'épiderme (Michel et al., 1996; Steven and Stevens, 1999; Tortora and Grabowski, 1994). Des mélanocytes, des cellules de Merkel et des cellules de Langherans sont également présents dans cette couche (Alberts et al., 2002).

### **1.1.3.2. Couche épineuse**

La seconde couche, la couche épineuse, est produite par la division ou la différenciation des cellules de la couche basale. Elle comporte plusieurs couches cellulaires et les jonctions intercellulaires sont assurées par de nombreux desmosomes. Près de la couche basale, les cellules ont un aspect épineux dû au processus de kératinisation débutant dans cette couche et entraînant l'aplatissement des kératinocytes dans la partie supérieure de la couche (Steven and Stevens, 1999).

### **1.1.3.3. Couche granuleuse**

Les kératinocytes contenant des corps lamellaires et des grains de kératohyaline forment la couche granuleuse, la troisième couche de l'épiderme (Steven and Stevens, 1999; Tortora and Grabowski, 1994). Les dernières étapes de différenciation des cellules se déroulent à ce niveau. Ce sont les dernières cellules nucléées de l'épiderme.

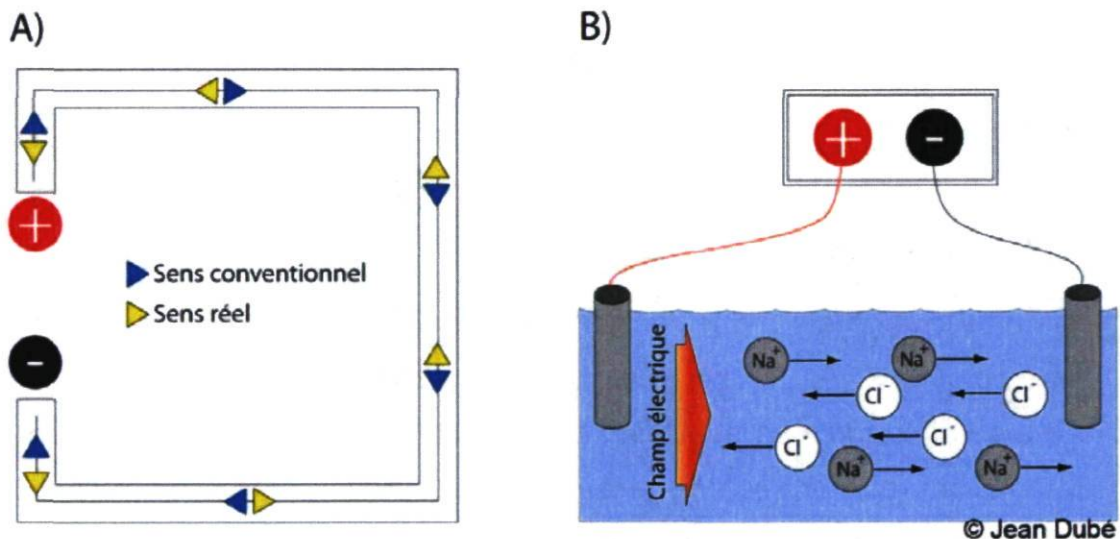
### **1.1.3.4. Couche cornée**

La quatrième et dernière couche, la couche cornée, est constituée de kératinocytes en état de différenciation terminale, les cornéocytes, dans la partie

supérieure de l'épiderme. En fait, l'agrégation des filaments de kératines et la réticulation supplémentaire de la loricrine par la transglutaminase-1 forment une enveloppe cornifiée étanche et résistante aux stress mécaniques (Candi et al., 2005). Ces cellules mortes s'accumulent sur 20 à 30 rangées d'épaisseur avant d'être éliminées par desquamation (Tortora and Grabowski, 1994).

## 1.2. Électricité

Luigi Galvani fut le premier à mettre en évidence l'électricité animale et ces travaux sur les cuisses de grenouilles menèrent à l'invention de la pile électrique par



**Figure 1.3.** Représentation schématique de la distinction entre le courant circulant dans un circuit conducteur sec par rapport à une solution d'électrolytes.

A) La direction conventionnelle du courant (flèches bleues) contraste avec le sens réel (flèches jaunes) du mouvement des électrons. Les électrons sont des particules chargées négativement, ils migrent donc vers l'électrode positive. B) Une solution aqueuse de NaCl est conductrice. Les ions  $\text{Na}^+$  migrent vers la cathode tandis que les ions  $\text{Cl}^-$  migrent vers l'anode. Par convention, le champ électrique est orienté vers la cathode (flèche orange).



Alessandro Giuseppe Antonio Anastasio Volta en 1800. De nos jours, les piles sont indispensables à notre mode de vie nord américain, mais à l'époque, la poursuite des travaux de Galvani conduisit à un nouveau champ d'étude : l'électrophysiologie. La découverte du potentiel d'action et du potentiel de blessure découle directement des observations de Galvani. Il faut toutefois faire la distinction entre l'électricité qui circule dans un circuit sec par rapport à la propagation de courant dans une solution d'électrolytes (Figure 1.3). Dans un circuit composé de conducteurs métalliques, c'est le déplacement des électrons libres du conducteur vers la borne positive (anode) qui permet le transport de l'électricité (Figure 1.3 A). Dans une solution, les ions remplacent les électrons et ils sont attirés à la borne inverse de leur polarité (Figure 1.3 B). Malgré le sens réel de circulation des électrons, soit de la borne négative vers la borne positive, par convention, on utilise l'inverse. Voici quelques rappels sur des notions de base de l'électricité tirées d'Électricité et Magnétisme qui seront utiles avant de poursuivre (Serway and Raymond, 1986).

### **1.2.1. Champ électrique**

Un corps chargé électriquement exerce une force attractive ou répulsive sur un autre corps chargé. Le champ électrique représente la partie de l'espace où les effets de cette force se manifestent. L'intensité de cette force diminue lorsque la distance par rapport à sa source augmente et l'unité SI du champ électrique est le newton par coulomb (N/C), mais il est fréquemment représenté en volt par mètre (V/m).

### **1.2.2. Différence de potentiel**

Le potentiel électrique est une quantité scalaire définissant l'état électrique d'un point de l'espace et il est exprimé en volt. En pratique, c'est la différence de potentiel électrique qui est utilisée. Elle représente la quantité de travail que doit accomplir un agent extérieur pour déplacer un corps chargé à l'intérieur d'un champ électrique. Elle se mesure à l'aide d'un multimètre placé en parallèle. À



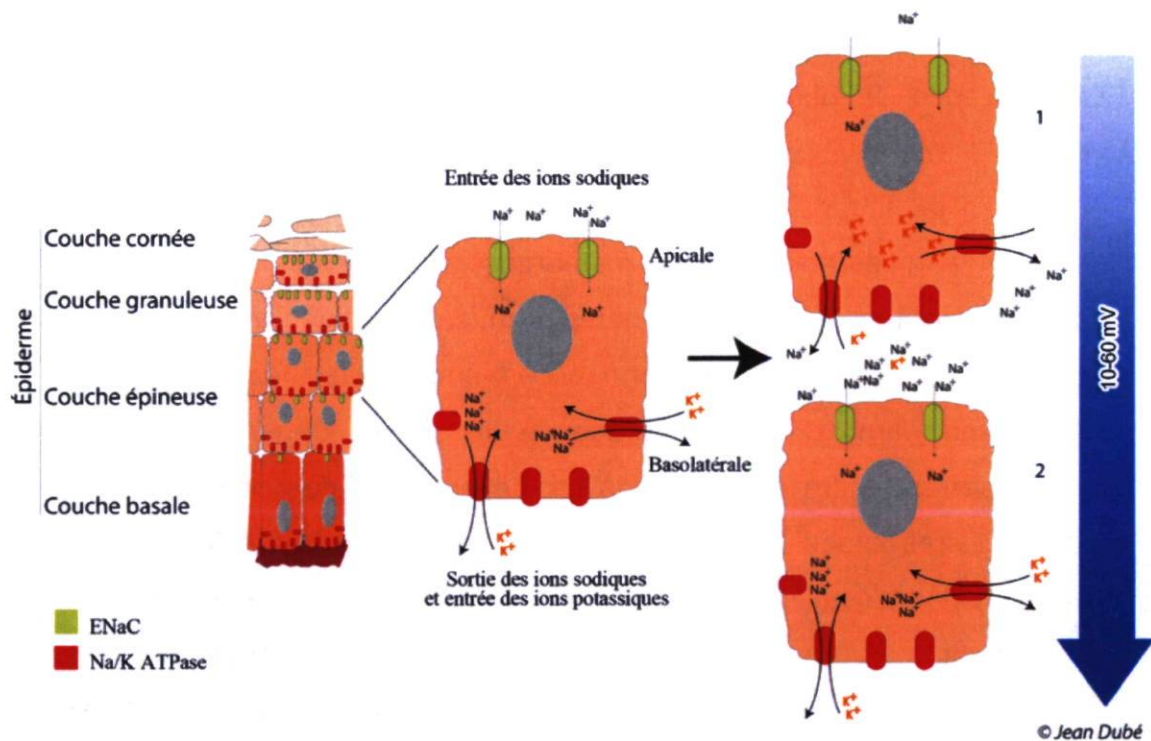
partir de la différence de potentiel électrique, il est possible de calculer la résistance d'un dispositif si l'intensité de courant électrique est connue. L'équation de la loi d'Ohm,  $\Delta V=RI$ , décrit cette relation où  $I$  est le courant électrique,  $R$  la résistance et  $\Delta V$  la différence de potentiel du système. Le courant représente le débit d'écoulement des charges à travers un milieu conducteur par unité de temps et l'unité SI est l'ampère (A). La résistance dépend de l'environnement que doit traverser le courant, de la distance à parcourir ainsi que de la surface. C'est l'opposition au passage des charges et l'unité SI de la résistance est l'ohm ( $\Omega$ ).

La différence de potentiel est d'une importance cruciale au niveau des êtres vivants. À l'échelle cellulaire, la différence de concentration des ions  $K^+$  et  $Na^+$  entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire suffit à créer une différence de potentiel mesurable. C'est la membrane cellulaire qui maintient et régule cette homéostasie. Les cellules neuronales et musculaires sont bien connues pour être en mesure de manipuler l'imperméabilité membranaire grâce au potentiel d'action (Faber and Korn, 1989). La présence de canaux dépendant du voltage à la membrane engendre une variation rapide et locale des concentrations ioniques intracellulaires lorsqu'ils s'ouvrent, propageant un courant à travers le réseau de cellules activatrices. Ces variations de la différence de potentiel sont la pierre angulaire des études en électrophysiologie ainsi qu'une majorité des travaux en neuroscience. Il existe toutefois un autre potentiel moins connu, dont les effets se manifestent lors d'une blessure, il s'agit du potentiel de blessure. Il serait impliqué dans la régénération ainsi que dans le processus de guérison. Des courants ont été mesurés à la bordure d'une plaie à la surface de l'œil ainsi que de la peau (Guo et al., 2010; Reid et al., 2005). Dans les deux cas, l'épaisseur et l'étanchéité du tissu épithélial est essentielle parce qu'elle permet de maintenir une différence de potentiel tissulaire dans ces organes.

### **1.2.3. Potentiel trans-épithélial (PTE)**

La peau possède une différence de potentiel électrique localisée à l'épiderme

appelée potentiel trans-épithélial ou pile épidermique. La présence de gradients ioniques de  $\text{Na}^+$  à travers les différentes couches de l'épiderme explique la présence du PTE. Chez l'humain, il varie de 10 à 60 mV selon l'épaisseur de la peau au site anatomique (Barker et al., 1982; Foulds and Barker, 1983). La figure 1.4 aide à visualiser ce phénomène biologique. Les kératinocytes, les cellules épithéliales de l'épiderme, forment une barrière à la diffusion passive des ions par le biais de liens intercellulaires étanches, les jonctions serrées et de la membrane



**Figure 1.4.** Représentation schématique de la distribution des ions  $\text{Na}^+$  dans l'épiderme formant le PTE.

L'épiderme est constitué d'un empilement de kératinocytes. La portion basolatérale d'une cellule exprime majoritairement des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase tandis que la face apicale exprime les canaux ENaC. Le mouvement ionique se produit donc vers la couche basale créant une différence de concentration d'ions  $\text{Na}^+$  à travers l'épiderme. Cela produit une différence de potentiel de 10 à 60 mV selon le site anatomique.

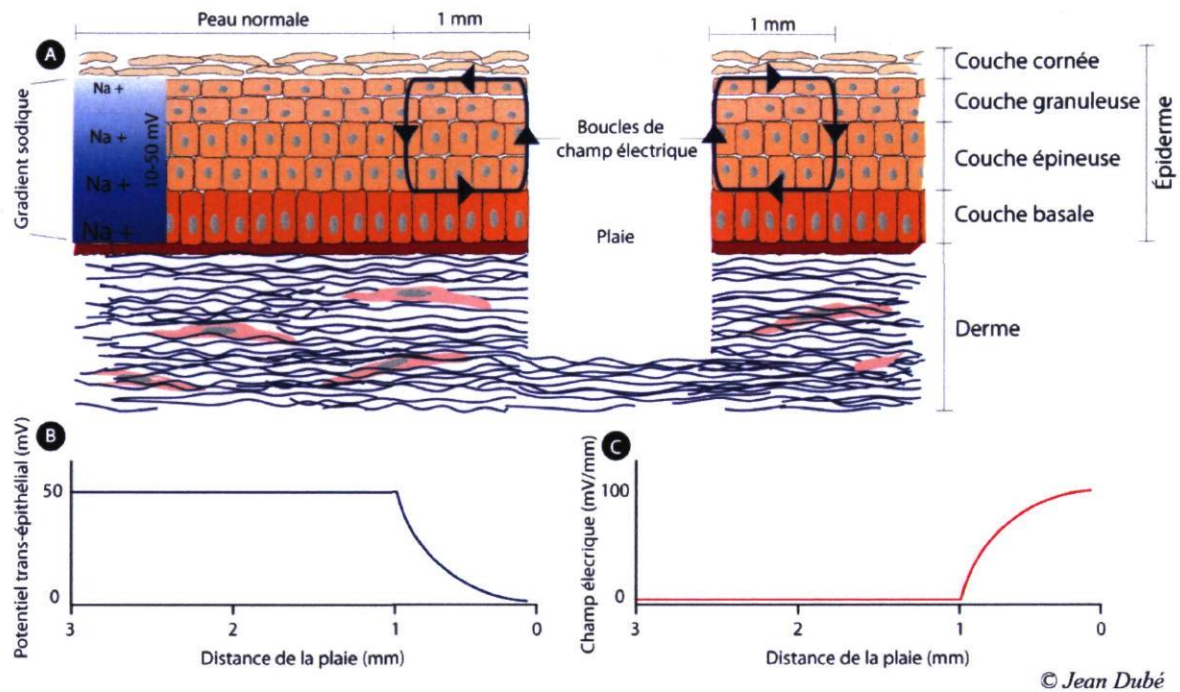


plasmique (Alberts et al., 2002). De la couche basale à la couche cornée, le mouvement ionique tissulaire est ainsi dépendant de canaux et de pompes protéiques traversant la membrane plasmique des cellules. Les ions sodiques franchissent les diverses couches de l'épiderme en voyageant à travers les cellules épithéliales via le milieu intracellulaire. Ce transport contrôlé établit un gradient ionique à travers l'épiderme produisant une différence de potentiel. Le rôle physiologique du PTE est inconnu, mais il existe un lien étroit entre le PTE et le champ électrique endogène qui apparaît lorsque la peau est endommagée.

#### **1.2.4. Champ électrique endogène (CEE)**

La présence de particules chargées induit un champ électrique dans l'environnement, mais l'étanchéité du tissu épithélial isole le milieu extracellulaire avec les ions qu'il contient à travers l'épiderme. Le mouvement des ions y est donc restreint et le champ électrique est trop faible pour avoir une influence sur les cellules. Par contre, lors d'une plaie, la peau est endommagée et l'intégrité du tissu épithélial est affectée jusqu'à 1 millimètre à l'extérieur de la plaie. Le maintien du gradient sodique tissulaire est impossible dans ces conditions entraînant la disparition du PTE au niveau de la plaie. Par contre, cette situation offre un milieu conducteur adéquat, où les lois de la diffusion passive s'appliquent, favorisant l'augmentation du champ électrique. Ce mouvement libre des charges, illustré à la figure 1.5, forme une boucle de courant provenant des bords de la plaie, orientée vers le centre de la plaie et retournant plus profondément dans la peau intacte par le dessous de la couche cornée (Nuccitelli, 1992). L'intensité du champ électrique décroît graduellement jusqu'à ce que la plaie soit recouverte (Barker et al., 1982; Sta Iglesia and Vanable, 1998). Le CEE chez l'humain varie de 100 à 200 mV/mm. Sa présence est un élément important de la cicatrisation de la peau (Altizer et al., 2002; Jenkins et al., 1996) et il est essentiel à la régénération chez certains animaux. Sur des cellules en monocouches il dirige la migration cellulaire des kératinocytes vers la cathode, il polarise la localisation de protéines impliquées dans la migration cellulaire en plus de provoquer une augmentation du calcium

intracellulaire (Nishimura et al., 1996; Onuma and Hui, 1988; Zhao et al., 2002). Toutefois, son mécanisme d'action demeure peu connu.



**Figure 1.5.** Représentation schématique du CEE lors d'une plaie dans la peau.

**A)** Représentation schématique d'une coupe transversale de la peau représentant les boucles de CEE à l'intérieur de la zone lésée (1 mm). **B)** Graphique du PTE en fonction de la distance par rapport à la marge de la plaie. **C)** Graphique du CEE en fonction de la distance par rapport à la marge de la plaie. Schéma adapté de (Stalglesia & Vanable 1998).

### 1.3. Transport sodique dans les kératinocytes

Tel que mentionné précédemment, la clé du PTE réside dans la distribution des ions sodiques à travers l'épiderme (Barker et al., 1982). Un amalgame de protéines transmembranaires composé de canaux et de pompes régule et maintient cette distribution inégale du sodium. Toutefois, le niveau de différenciation des kératinocytes influence les niveaux d'expression de certains transporteurs d'ions  $\text{Na}^+$  tels que les canaux sodiques épithéliaux (ENaC) qui



acheminent les ions  $\text{Na}^+$  à l'intérieur de la cellule (Guitard et al., 2004). De plus, l'épiderme est constitué d'un empilement de kératinocytes et la portion apicale d'une cellule, où les canaux ENaC se retrouvent majoritairement, juxtapose la partie basolatérale d'une autre cellule. Comme les pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase se situent principalement dans cette portion de la cellule et qu'ils expulsent le sodium à l'extérieur de la cellule, il en résulte un mouvement des ions  $\text{Na}^+$  de la face apicale vers la partie basolatérale d'une cellule. Ces principaux acteurs participent ainsi au déplacement des ions  $\text{Na}^+$ , mais ils utilisent des mécanismes de transport différents. Avant d'aller plus loin, il est toutefois nécessaire d'expliquer pourquoi le sodium est si important dans le PTE de l'épiderme humain.

### **1.3.1. Distribution ionique**

À l'échelle cellulaire, la membrane plasmique est une barrière sélective entre l'intérieur de la cellule et l'environnement extracellulaire. Elle bloque toutes les particules chargées ainsi que les grosses molécules polaires. Seuls les gaz et les petites molécules polaires non chargées peuvent traverser la membrane sans restriction, mais ils ne représentent qu'une infime portion du milieu intracellulaire. Par conséquent, pour la majorité des molécules, la perméabilité de la membrane d'un type cellulaire donné dépend de l'organisation et des caractéristiques des lipides et des protéines qui la constituent. Ces protéines de transport traversent la bicouche lipidique et régulent l'entrée et la sortie des éléments essentiels tels les ions, le glucose, les acides aminés, les lipides, les intermédiaires métaboliques ainsi que les déchets produits par la cellule. Elles sont responsables de l'établissement et du maintien des concentrations ioniques intracellulaires qui diffèrent par rapport au milieu extracellulaire (tableau 1.1). Cette distribution ionique inégale engendre un gradient électrochimique de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule pour les ions sodiques et chloriques et un gradient électrochimique inversé pour les ions potassiques et calciques. Les protéines de transport doivent donc être en mesure de contrer ces gradients électrochimiques pour maintenir cette homéostasie.

Ions	Concentration intracellulaire (mM)	Concentration extracellulaire (mM)
Na <sup>+</sup>	5-15	145
K <sup>+</sup>	140	5
Mg <sup>2+</sup>	0,5	1-2
Ca <sup>2+</sup>	1 x 10 <sup>-4</sup>	1-2
H <sup>+</sup>	7 x 10 <sup>-5</sup>	4 x 10 <sup>-5</sup>
Cl <sup>-</sup>	5-15	110

Tableau 1.1. Concentration intracellulaire et extracellulaire des principaux ions. Tableau adapté de Alberts et al., (Alberts et al., 2002).

### 1.3.2. Les ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>

Les différences de concentration de ces deux ions à l'extérieur de la cellule permettent de supposer un rôle au niveau de la polarité ionique tissulaire. La présence d'un gradient sodique dans l'épiderme de la peau humaine est connue depuis plusieurs années tout comme le transport des ions Na<sup>+</sup> (Barker et al., 1982). D'autres organes possèdent un potentiel ionique tissulaire et dans ces cas, les ions Cl<sup>-</sup> jouent un rôle important puisque leur transport est un phénomène normal et continu. Par exemple, les cellules épithéliales de la cornée de l'œil pompent le chlore de la couche basale vers l'extérieur de l'œil. Ce mouvement ionique a d'ailleurs été manipulé par une équipe sur des cornées de rats à l'aide de la prostaglandine E2 (PGE<sub>2</sub>) et de l'aminophylline, des modulateurs pharmacologiques du transport du Cl<sup>-</sup> (Song et al., 2002). Ils ont ainsi réussi à induire une augmentation du potentiel trans-cornéen de 300% avec l'aminophylline et de 425% avec la PGE<sub>2</sub>. Par contre, il n'existe aucune preuve démontrant la présence d'un gradient de concentration ou d'un mouvement des ions Cl<sup>-</sup> à travers l'épiderme humain. Son implication dans le PTE y paraît donc nul ou négligeable. Par conséquent, les ions Na<sup>+</sup> semblent être les principaux ions qui permettent d'expliquer la polarité ionique de l'épiderme humain.



### 1.3.3. La diffusion facilitée

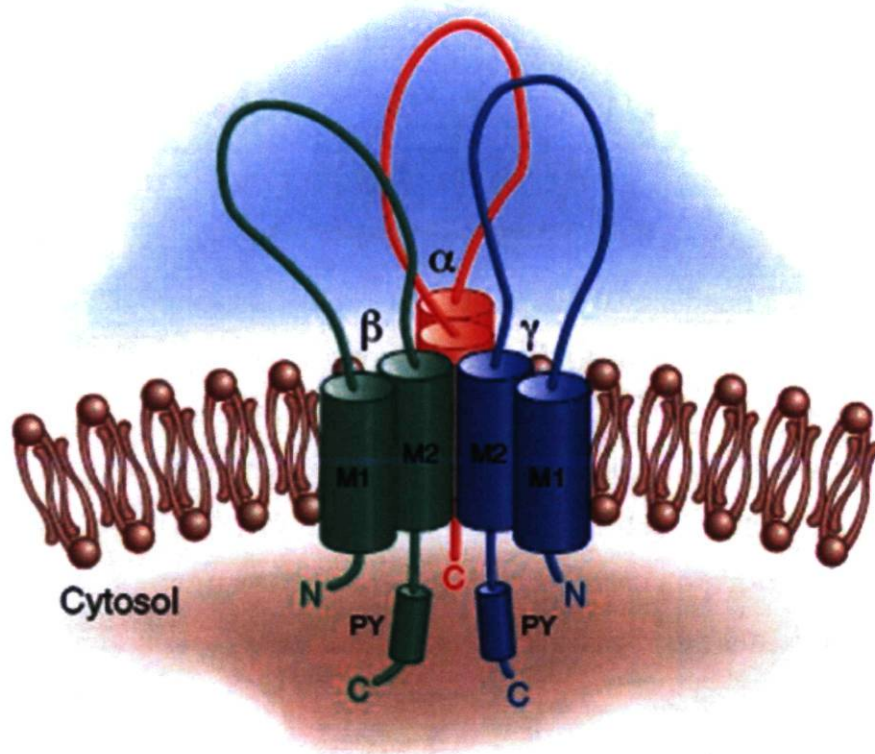
Le sodium voyage à travers le tissu de différentes façons. Il utilise entre autres la diffusion facilitée, un type de transport qui lui permet de traverser la bicouche de phospholipides de la membrane via des pores protéiques formant des canaux (Alberts et al., 2002). Ces canaux peuvent être ouverts constitutivement ou s'ouvrir en réponse à un signal électrique ou chimique. Les substances passant par ces protéines obéissent aux lois de la diffusion passive. Elles n'ont pas besoin d'énergie métabolique parce qu'elles suivent le gradient électrochimique. Cette réaction est spontanée puisqu'elle augmente l'entropie ( $\Delta S$ ) et elle diminue l'énergie libre ( $\Delta G$ ). L'ENaC participe à ce mode de transport et son activité est indépendante du voltage.

### 1.3.4. Les canaux épithéliaux sodiques (ENaC)

Les canaux épithéliaux sodiques (ENaC) sont constitués de protéines hétérotrimériques dont chaque sous-unité possède deux hélices transmembranaires reliées entre elles par une boucle extracellulaire. Trois des quatre sous-unités homologues  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  s'assemblent pour former une protéine membranaire avec une longue portion extracellulaire et un court domaine intracellulaire (Alvarez de la Rosa et al., 2000; Yamamura et al., 2008). Différentes combinaisons ont été rapportées dans la littérature,  $2\alpha/\beta/\gamma$  (Firsov et al., 1998) et  $3\alpha/3\beta/3\gamma$  (Snyder et al., 1998) mais la plus commune est  $\alpha/\beta/\gamma$  (Figure 1.6). La présence d'une sous-unité  $\alpha$  ou  $\delta$  est essentielle à l'activité du canal et leur addition aux sous-unités  $\beta\gamma$  produit un courant ionique de l'extérieur de la cellule vers l'intérieur (Waldmann et al., 1995). Ces canaux contrôlent l'absorption du sodium dans les reins, le côlon, les poumons et les glandes sudoripares. Ce contrôle est essentiel à la balance ionique corporelle qui se répercute sur la pression sanguine (Snyder, 2002), les fonctions rénales (Shimkets et al., 1994) et la balance fluidique des poumons (Hummler et al., 1996). Dans ce dernier cas, ils interagissent avec le *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), la protéine responsable de la mucoviscidose. Cette maladie génétique est causée



par la mutation du gène codant pour cette protéine, un canal ionique perméable au chlore, produisant une protéine altérée et dysfonctionnelle. Les cellules des personnes atteintes de cette maladie produisent un mucus plus épais et visqueux qui obstruent entre autres les bronches. Pour confirmer le diagnostic de la fibrose kystique, le test de la sueur est souvent utilisé. Un dérèglement au niveau de la balance ionique corporelle, dans ce cas précis, engendre de la sueur à concentration élevée en sels chez les personnes atteintes.



**Figure 1.6.** Représentation schématique du canal ENaC.

La combinaison des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  est la forme la plus commune du canal ENaC. Chaque sous-unité possède des extrémités N- et C-terminales intracellulaires, 2 domaines transmembranaires (M1 et M2) et un motif proline et tyrosine (PY) sur les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . Image adaptée de (Bhalla & Hallows 2008) (Bhalla and Hallows, 2008). Structure proposée par Jasti et al., (Jasti et al., 2007).

Plusieurs cellules épithéliales dont les kératinocytes de la peau humaine ont des canaux ENaC polarisés à la face apicale de la membrane. De plus, le marquage et l'expression croissante de la couche basale à la couche cornée des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  de ENaC ont mis en évidence la relation entre l'expression des sous-unités, le transport sodique et le niveau de différenciation des kératinocytes humains (Brouard et al., 1999; Yamamura et al., 2008). Ainsi, les canaux ENaC épidermiques sont associés au maintien du potentiel transmembranaire et au processus de différenciation (Mauro et al., 2002). L'utilisation de l'amiloride, un bloqueur des canaux ENaC, empêche l'entrée des ions  $\text{Na}^+$ . Ce déséquilibre de l'homéostasie sodique engendre une variation du potentiel transmembranaire. Lorsque cette variation atteint le seuil de déclenchement des canaux calciques dépendants du voltage, ces derniers s'ouvrent et un influx de calcium extracellulaire pénètre dans la cellule. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  influencent le processus de maturation de l'épiderme puisqu'ils sont un élément important pour l'induction de la différenciation des kératinocytes (Guitard et al., 2004). Cependant, pour conserver la concentration intracellulaire d'ions  $\text{Na}^+$  à l'équilibre, les ions nouvellement entrés doivent être compensés par l'expulsion de sodium à l'extérieur de la cellule et c'est la pompe sodium potassium qui remplit ce rôle via le transport actif.

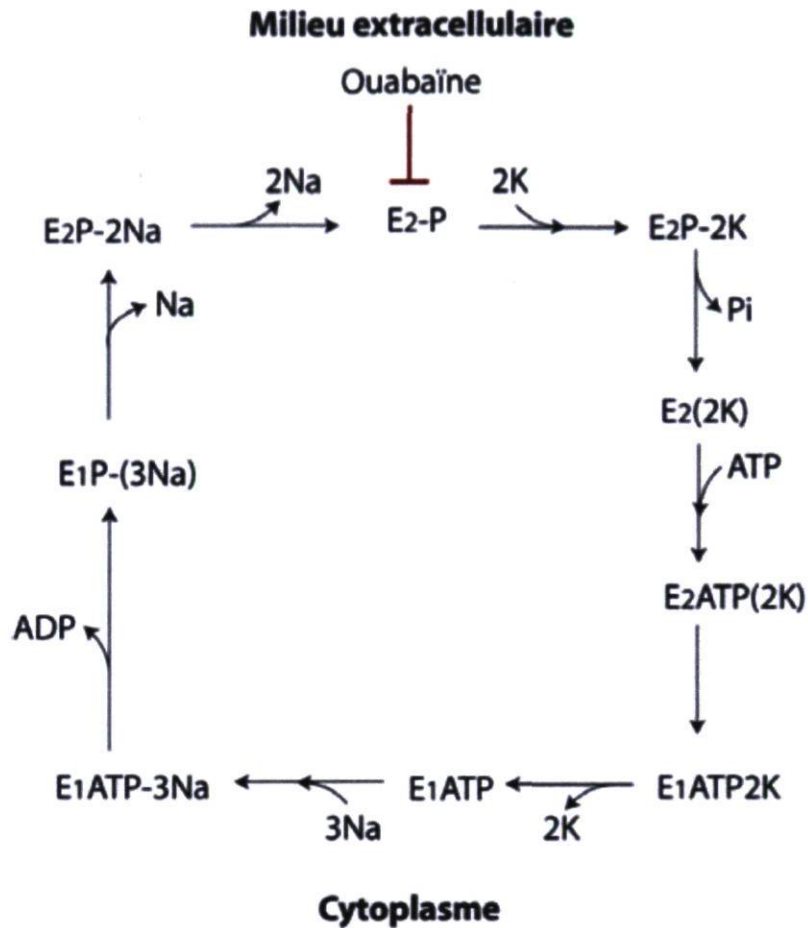
### **1.3.5. Transport actif**

Le pompage d'une substance à travers la membrane cellulaire contre un gradient de concentration chimique ou contre son potentiel électrique nécessite de l'énergie. L'hydrolyse d'une molécule d'ATP libère suffisamment d'énergie pour que la réaction se réalise. Ce processus se réfère au transport actif et la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase utilise ce mode de transport.

### **1.3.6. Pompes sodium-potassium**

La pompe sodium-potassium échange 3 ions  $\text{Na}^+$  du cytoplasme en retour de 2 ions  $\text{K}^+$  du milieu extracellulaire. Ainsi, elle établit et maintient des gradients de





**Figure 1.7.** Mécanisme d'action de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase.

L'action de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase est initiée lorsque la protéine est en conformation E1 et qu'elle lie trois ions  $\text{Na}^+$  du côté cytoplasmique de la cellule. Cette liaison catalyse le transfert d'un groupement phosphate d'une molécule d'ATP à un résidu aspartate de la pompe engendrant un changement de conformation vers l'état E2. Les ions sodiques sont libérés dans le milieu extracellulaire et deux ions  $\text{K}^+$  se lient à la pompe. Cette nouvelle liaison entraîne la déphosphorylation de la protéine et une molécule d'ATP peut à nouveau s'y lier. L'ajout d'une molécule d'ATP provoque un retour à l'état E1 et libère les ions potassiums dans le cytoplasme. La ouabaïne bloque la pompe dans l'état E2 après la libérations des ions  $\text{Na}^+$ . Schéma adapté de Kaplan (Kaplan, 2002).

concentrations des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  à travers la membrane plasmique des cellules animales. Une manipulation du potentiel transmembranaire est utilisée par des



cellules excitables comme les neurones ou les cellules musculaires pour déclencher l'ouverture sélective de canaux ioniques et propager un signal. Cette pompe localisée au niveau basolatéral des cellules épithéliales est aussi impliquée dans la formation des jonctions serrées et des desmosomes chez ces cellules, bref elle est essentielle à la vie cellulaire (Katz, 1988; Lingrel et al., 1994; Rajasekaran et al., 2001).

Étant une pompe protéique de type P, la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase est dépendante de l'énergie dégagée lors de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP en ADP pour réaliser une réaction qui va contre le gradient électrochimique. Le mécanisme d'action de cet échange ionique s'effectue en suivant une séquence coordonnée d'événements (Holmgren et al., 2000). Plus précisément, trois sites de haute affinité pour les ions  $\text{Na}^+$  et deux sites de faible affinité pour les ions  $\text{K}^+$  de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase sont accessibles à la surface intracellulaire lorsque la protéine est dans la conformation E1. Les constantes de dissociations de ces sites assurent que, dans cet état, les ions  $\text{Na}^+$  occupent les trois sites dédiés au sodium et tout ion  $\text{K}^+$  se dissocie malgré la concentration intracellulaire élevée. De plus, une molécule d'ATP se lie à une autre sous-unité située à la face cytoplasmique où elle est hydrolysée en ADP dans une réaction nécessitant du  $\text{Mg}^{2+}$ . Le phosphate libéré lors de la réaction est transféré sur un résidu aspartate spécifique et déclenche un changement de conformation vers l'état E2. Ce réarrangement de la structure tridimensionnelle de la protéine expose les sites de liaisons des ions au milieu extracellulaire et modifie l'affinité des ions pour leurs sites respectifs. Dans l'état E2, l'affinité des ions  $\text{Na}^+$  pour leur site est réduite libérant les trois ions  $\text{Na}^+$  dans l'environnement tandis que celle des ions  $\text{K}^+$  est augmentée. La pompe retourne à l'état E1 suite à l'hydrolyse du lien aspartyl-phosphate libérant les ions  $\text{K}^+$  et le cycle recommence, tel qu'illustré à la figure 1.7. La ouabaine bloque la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase à l'état E2 en se liant au domaine extracellulaire (Palasis et al., 1996).

La pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase est une protéine hétérodimérique composée d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . La sous-unité  $\alpha$  possède 10 domaines transmembranaires, cinq boucles extracellulaires (quatre petites et une plus grande) et quatre boucles intracellulaires (Hu and Kaplan, 2000). La grande boucle intracellulaire entre les domaines M4 et M5 contient les domaines N (site de liaison nucléotidique), P (site de phosphorylation) et A (activateur). Il existe quatre isoformes de la sous-unité  $\alpha$  mais les subtilités fonctionnelles des différentes formes demeurent inconnues (Jewell and Lingrel, 1991). La sous-unité  $\alpha_1$  est l'isoforme la plus commune chez les mammifères (Kaplan, 2002). Les cellules épithéliales l'expriment ainsi que les cellules cardiaques qui la co-expriment avec la sous-unité  $\alpha_2$  (James et al., 1999). L'isoforme  $\alpha_3$  chez l'adulte est spécifique au cœur et au cerveau (Benfante et al., 2005), tandis que l'isoforme  $\alpha_4$  se retrouve à la membrane des spermatozoïdes (Woo et al., 2000).

La sous-unité  $\beta$  est plus petite que la sous-unité  $\alpha$ . Elle ne traverse la membrane qu'une seule fois et la plus grande partie de la sous-unité est extracellulaire (300/370 acides aminés) (Kaplan, 2002). Cette portion de la pompe contient trois séquences consensus glycosylées du côté amine et trois ponts disulfures essentiels à l'activité enzymatique (Kawamura and Nagano, 1984; Kirley, 1990). Les deux sous-unités sont reliées entre elles par les boucles M7 et M8 de la sous-unité  $\alpha$  et la première section de la partie extracellulaire de la sous-unité  $\beta$  (Lutsenko and Kaplan, 1993).

#### **1.4. La guérison d'une plaie**

La guérison est un processus biologique complexe qui survient après une blessure. Normalement chez l'adulte, la réparation de la lésion se termine par l'apparition d'une cicatrice, une masse de tissu fibrotique non fonctionnelle. Certains formulent l'hypothèse que le système immunitaire pourrait aiguiller la guérison vers la voie fibrotique plutôt que vers la régénération puisque les fœtus



ont un système immunitaire immature (Mescher and Neff, 2005) et qu'ils ne forment pas de cicatrices contrairement aux adultes. Cette régénération limitée étant une habilité qui se perd au cours des deux premières années de la vie humaine, seuls les mécanismes cicatriciels de la guérison seront décrits. Le processus de cicatrisation est divisé en trois phases, illustré à la figure 1.8, qui se superposent dans le temps.

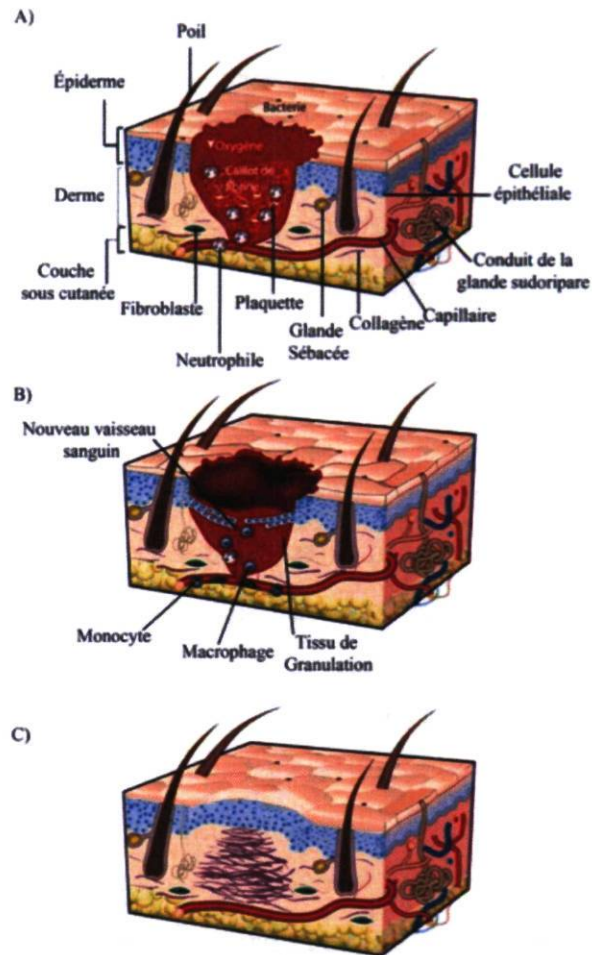
#### **1.4.1. L'inflammation**

La première phase de réparation est l'inflammation et elle survient immédiatement après les dommages tissulaires. Elle implique des composantes de la cascade de coagulation sanguine, des voies inflammatoires et du système immunitaire afin de mettre fin aux pertes de sang et de liquide corporel, d'enlever le tissu mort ou dévitalisé et de prévenir les infections. Tout d'abord, l'inflammation débute par la formation d'un clou plaquettaire, première étape vers la formation d'une matrice de fibrine, le caillot, structure d'échafaudage pour les cellules infiltrantes. La dégranulation des plaquettes, l'activation du complément et les produits de dégradation des bactéries recrutent des neutrophiles dans la plaie (Grose and Werner, 2004). Des monocytes se différencient en macrophages au site lésé après 2-3 jours, mais l'importance des neutrophiles et des macrophages dans le processus de réparation est encore mal comprise. Ce système privilégie la survie en prévenant l'infection de la plaie par des microorganismes. Par contre, cette interposition rapide du tissu cicatriciel inhibe toute régénération tissulaire comme cela a été démontré sur des moelles épinières sectionnées de souris qui se reconnectent lorsque la formation de tissu cicatriciel est entravée (Klapka and Muller, 2006; Stichel and Muller, 1998).

#### **1.4.2. Formation de nouveaux tissus**

La deuxième phase de réparation se caractérise par une prolifération cellulaire et la migration de différents types cellulaires afin de reformer les tissus





**Figure 1.8.** Représentation schématique des trois principales étapes de réparation lors d'une blessure cutanée.

**A)** L'inflammation s'initie immédiatement après la blessure et s'étend sur une période de 48 heures. Un caillot de fibrine se forme dans cet environnement hypoxique qui contient également des bactéries, de neutrophiles et de plaquettes sanguines. **B)** La formation du nouveau tissu débute 48 heures après la blessure et se poursuit au cours des 10 jours suivants. À la surface de la blessure se forme une croûte et de nouveaux vaisseaux sanguins peuplent la région. Les cellules épithéliales migrent sous la croûte alors que la majorité des cellules présentes au stade précédent sont éliminées ou ont quitté la blessure. **C)** Le remodelage peut durer plusieurs mois. Les fibroblastes qui occupent maintenant le site déposent le collagène. À la surface, la plaie a contracté et la portion réépthérialisée est légèrement plus élevée que la surface intacte. La région réparée ne contient pas d'annexes cutanées (poils, glandes sudoripares). Figure adaptée de Gurtner et al., (Gurtner et al., 2008).

(Gurtner et al., 2008). Cette phase débute deux jours après la blessure et se poursuit jusqu'au dixième jour. Pendant cette période, les kératinocytes sont les premières cellules à migrer sur le derme lésé et le processus d'angiogenèse est en cours afin de former de nouveaux capillaires qui, associés aux fibroblastes et aux macrophages, remplacent la matrice de fibrine par un tissu de granulation. Les kératinocytes prolifèrent et se différencient pour rétablir la fonction de barrière propre aux tissus épithéliaux. Vers la fin de cette phase, certains fibroblastes se différencient en myofibroblastes. Ces cellules contractiles aident à fermer la blessure en rapprochant les marges de la plaie et produisent une matrice de collagène, via l'interaction avec les fibroblastes, qui formera ultimement la cicatrice.

### **1.4.3. Remodelage**

La troisième et dernière phase du processus de réparation, le remodelage, peut durer plus d'un an. Deux à trois semaines après la blessure, les processus de guérison faiblissent et s'atténuent. La majorité des cellules endothéliales, des macrophages et des myofibroblastes entrent en apoptose ou quittent la plaie laissant un milieu riche en collagène et autres protéines de la matrice extracellulaire, mais peu de cellules. Toutefois, les fibroblastes, les macrophages et les cellules endothéliales environnantes remodelent la matrice composée de collagène de type III en collagène de type I à l'aide entre autres de métalloprotéinases qu'elles secrètent. Ce remodelage renforce le tissu nouvellement réparé sans pour autant lui redonner ses propriétés d'origine.

## **1.5. La réépithélialisation de la plaie**

Le processus de régénération permet de reconstituer l'architecture du tissu d'origine, mais les humains perdent cette capacité suite au développement prénatal. La réépithélialisation de la peau, la reconstitution du foie et de la rate sont les seuls processus du corps humain décrits comme étant une régénérescence compensatoire, c'est-à-dire que le tissu se reconstitue à partir de cellules déjà



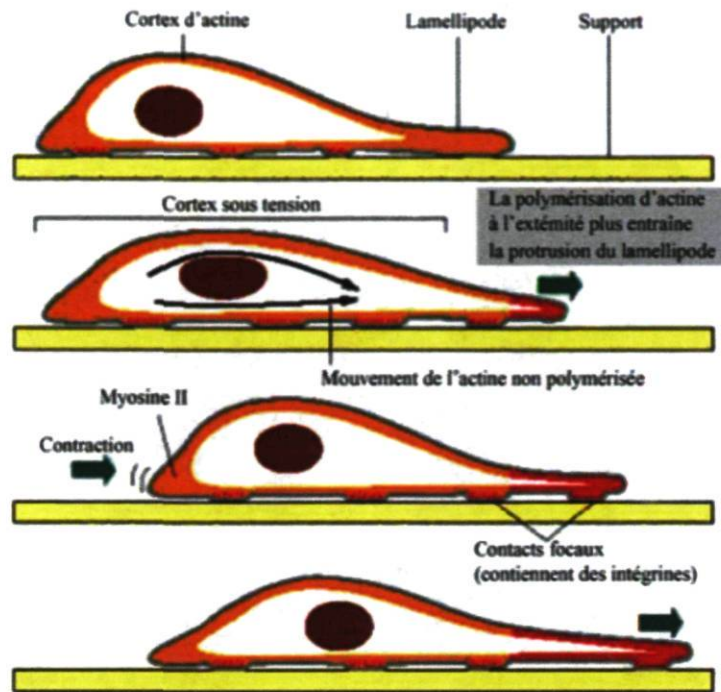
différenciées qui se divisent. Elle survient après la phase inflammatoire et se divise en trois étapes : la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire des kératinocytes (Raja et al., 2007) . Comme les facteurs influençant la migration régulent directement le processus de réépithélialisation, une attention particulière sera portée à cette étape.

### **1.5.1. La migration**

Quelques heures après la lésion, les liens cellule-cellule et cellule-MEC se dissocient afin d'initier la migration des kératinocytes qui vont recouvrir la plaie. L'extension et la protrusion de la membrane s'effectuent sur la face migratoire de la cellule (figure 1.9). Ensuite, des points d'attachement sur le front de la protrusion permettent la translocation du corps cellulaire, et le relâchement des points d'adhésion à l'arrière suivi de la rétraction de la membrane permettent à la cellule de poursuivre son mouvement (Alberts et al., 2002). La dynamique de l'actine et le mécanisme cellulaire de la protrusion sont à la base de cette migration (Pantaloni et al., 2001).

L'actine est une protéine du cytosquelette dont sa polymérisation est à l'image d'un tapis roulant (figure 1,10). Tout d'abord, l'ATP active des monomères d'actine (actine-G) qui s'assemblent pour former un noyau de trois ou quatre sous-unités. L'ajout de monomères d'actine-G-ATP à chacune des extrémités du noyau forme alors un filament d'actine (actine-F) avec une extrémité barbue (+) et une autre pointue (-) dont la longueur augmente rapidement. Une fois incorporées au filament, les sous-unités hydrolysent lentement l'ATP en ADP par le complexe ADF/Cofiline. Ce même complexe dépolymérise aussi l'actine-F, libérant des monomères d'actine-G-ADP et la profiline catalyse alors la phosphorylation de ces monomères en actine-G-ATP pour permettre au cycle de recommencer. Un mouvement est créé étant donné que l'extrémité barbue s'allonge cinq à dix fois plus rapidement que l'extrémité pointue provoquant une poussée dirigée vers l'avant de la membrane cellulaire.



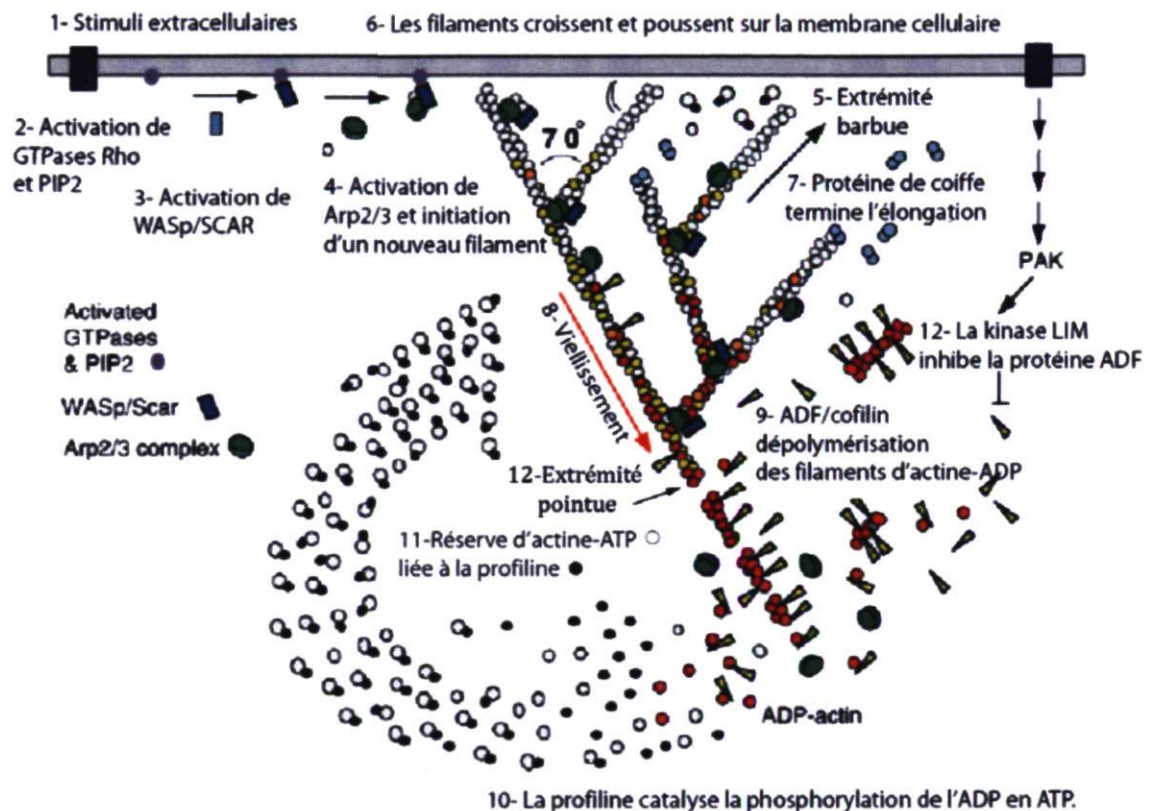


**Figure 1.9.** Représentation schématique de la migration cellulaire.

La formation d'un lamellipode est dépendante de la polymérisation de l'actine qui repousse la membrane cellulaire (flèche verte en avant), la protrusion. Le lamellipode s'attache au support externe via des contacts focaux créant une tension dans le cortex d'actine. La contraction (flèche verte à l'arrière) et le détachement de la membrane cellulaire avec la surface externe, à l'arrière, relâchent une partie de la tension et déplacent le corps cellulaire vers l'avant. Le lamellipode poursuit son avancée et le cycle recommence. Figure adaptée de Alberts et al., (Alberts et al., 2002).

Au niveau des mécanismes cellulaires, l'activation de voies signalétiques et de leurs protéines adaptatrices est nécessaire pour entraîner la formation des filopodes et des lamellipodes. Les filopodes sont des structures qui contiennent des faisceaux parallèles d'actine F tandis que les lamellipodes consistent en un réseau d'actine-F dont les branches sont reliées entre elles avec un angle de 70 degrés par les protéines ARP2/3. Les protéines de la famille des Rho GTPase comme CDC42 et Rac jouent un rôle important dans l'élaboration de ces

structures. Suite à des stimuli, CDC42 activé se lie aux protéines de la famille du syndrome Wiskott-Aldrich (WASP) ou via la tyrosine kinase du substrat p53 du récepteur de l'insuline (IRSp53) et active la protéine 2-3 liée à l'actine (ARP2/3) qui permet le branchement de filaments d'actine avec un angle de 70 degrés.



**Figure 1.10.** Représentation schématique de la polymérisation d'actine lors de la protrusion.

Un stimuli extracellulaire active les GTPases Rho et PIP2 qui activent, à leur tour, le complexe WASp/SCAR. Ce complexe activé lie simultanément le complexe Arp2/3 et un monomère d'actine sur un filament d'actine préexistant. La nouvelle branche forme un angle de 70° et possède une extrémité barbue dont l'addition de monomères d'actine-ATP poussent la membrane cellulaire. Une protéine de coiffe termine l'élongation puis le complexe ADF/Cofilin hydrolyse l'ATP des monomères d'actine entraînant la dépolymérisation des filaments. Les monomères d'actine-GDP ainsi libérés sont ensuite phosphorylés par la profiline et le cycle recommence. Figure adaptée de Pollard & Borisy (Pollard and Borisy, 2003).



### **1.5.2. La prolifération et la différenciation**

Les cellules adjacentes à la plaie secrètent des facteurs de croissance, dont l'*epidermal growth factor* (EGF), le *transforming growth factor- $\alpha$*  (TGF $\alpha$ ) et le *keratinocyte growth factor* (KGF) qui stimulent la prolifération et la migration des kératinocytes (Ando and Jensen, 1993; Barrandon and Green, 1987; Werner and Grose, 2003). Ces facteurs fonctionnent en synergie avec les intégrines et la MEC afin que les kératinocytes en périphérie de la plaie entrent en hyperprolifération et fournissent de nouvelles cellules à la langue de migration. Une fois la zone recouverte, les cellules génèrent de nouvelles cellules qui s'empilent et dont la composition du réseau de filaments intermédiaires de kératines diffère d'une couche à l'autre. Les kératines 5 et 14 sont les principales protéines structurales exprimées à la couche basale alors que les kératines 1 et 10 sont produites par les kératinocytes de la couche épineuse (Fuchs and Green, 1980; Woodcock-Mitchell et al., 1982). Ensuite la couche granuleuse se caractérise par l'accumulation d'involucrine ainsi que par la présence de granules de kératohyaline contenant de la loricrine et de la profilagrine. Enfin, la différenciation terminale des kératinocytes se caractérise par la formation d'un amalgame protéique insoluble enveloppé de lipides assurant la fonction de barrière de la peau.

### **1.6. Génie tissulaire**

Le génie tissulaire est fréquemment associé à la médecine régénératrice, un domaine qui combine l'utilisation de cellules, de matériaux et d'ingéniosité pour améliorer, remplacer ou produire des tissus similaires à ceux du corps humain. Principalement, il existe trois approches pour réaliser des tissus possédant des propriétés mécaniques et biologiques se rapprochant de ceux d'origine. La première méthode utilisée consiste à décellulariser un tissu provenant d'un donneur animal ou humain afin d'y ensemercer les cellules d'un patient chez qui le tissu sera greffé (Badylak et al., 2010; Jhaveri et al., 2010) . La deuxième technique emploie des matrices artificielles, conçues en laboratoire, servant d'échafaud aux cellulesensemencées. Ces supports peuvent être fabriqués à



partir de collagène, de chitosan, de glycosaminoglycans (GAG) ou de polyesters (Berthod et al., 1993; Berthod et al., 1994; Holy et al., 2000) . Le troisième mode de fabrication de tissus utilise l'auto-assemblage. Le Laboratoire d'Organogenèse Expérimentale (LOEX) a élaboré ce savoir-faire il y a quelques années (L'Heureux et al., 1998). Cette technique exploite la capacité des cellules à produire leur propre matrice afin de former des feuillets manipulables qui peuvent ensuite être empilés ou enroulés autour d'un mandrin (L'Heureux et al., 2006; Michel et al., 1999). Cette technique a l'avantage de produire des tissus sans matériel exogène.

Ultimement, le génie tissulaire pourrait réussir à assembler différents tissus pour reconstituer un organe complexe entièrement comme le foie, le pancréas ou un sein, mais plusieurs obstacles devront être surmontés pour y arriver. Les conditions de culture comme les niveaux de concentration d'oxygène et de CO<sub>2</sub>, le pH, l'humidité, la température, la pression osmotique et les nutriments doivent être maintenus afin d'assurer la survie et la croissance tissulaire. Lorsque des matériaux exogènes sont utilisés, ils doivent être biocompatibles, résistants à long terme et fonctionnels avec les molécules biologiques. Les recherches se poursuivent afin de palier ces divers problèmes, mais la peau, la cornée et les ligaments représentent de beaux exemples de succès en génie tissulaire.

### **1.7. La peau produite par génie tissulaire**

Les substituts cutanés sont fréquemment utilisés pour le traitement des grands brûlés ou des plaies chroniques. Plusieurs produits homologués sont disponibles sur le marché pour remplacer le derme ou l'épiderme et ils utilisent différentes stratégies de fabrication. La majorité des substituts dermiques sont composés de fibroblastes allogéniques ensemencés dans une matrice (Apligraf, TranCyte) alors que les substituts épidermiques sont cultivés sur des membranes (LaserSkin, Suprathel).

Au LOEX, les équivalents cutanés sont produits par auto-assemblage. Les techniques employées pour produire ces tissus ont été décrites en détail dans un ouvrage et cela permet de fabriquer des substituts cutanés sans matériel exogène. Brièvement, à partir d'un prélèvement de peau, les fibroblastes sont extraits,ensemencés puis cultivés en présence d'acide ascorbique (50 µg/ml). Dans ces conditions, la synthèse du collagène par les fibroblastes est augmentée et s'assemble pour former une matrice extracellulaire de tissu conjonctif. Après 28 jours de culture, deux feuillets de fibroblastes sont superposés afin de former un équivalent dermique. Par la suite, des kératinocytes, préalablement extraits et cultivés en présence de fibroblastes murins irradiés (iS3T3), sont ensuite ensemencés sur le feuillet dermique. La formation de colonies par les kératinocytes requière la présence de fibroblastes en culture, mais ceux-ci ne doivent pas envahir l'espace. L'irradiation des fibroblastes leur permet donc de remplir leur rôle sans proliférer dans le milieu de culture. Finalement, l'équivalent est placé à l'interface air-liquide sur un support afin d'induire la différenciation des cellules épidermiques (Michel et al., 1999).

De plus, afin d'étudier les mécanismes de réépithélialisation, un modèle de plaie cutanée a été développé à partir des peaux reconstruites (Laplante et al., 2001). L'astuce consiste à pratiquer une plaie traversant les diverses couches du substitut à l'aide d'un échantillonneur cutané et de la déposer sur un nouvel équivalent dermique.

## **1.8. Problématique et objectifs de la recherche**

Les différentes étapes du processus de guérison de la peau chez les mammifères sont bien décrites dans la littérature. Par contre, les signaux déclenchant la réponse cellulaire tout comme les voies signalétiques empruntées font l'objet d'intenses recherches à travers le monde. Parmi ces signaux, il en existe un, moins bien connu, qui joue un rôle crucial dans la réparation cutanée. Il s'agit du CEE induit par le tissu épithélial. Il y a plus de 150 ans, un courant électrique



d'environ 1  $\mu\text{A}$  sortant d'une plaie a été mesuré chez l'humain pour la première fois par le physiologiste allemand, Emil Du-Bois-Reymond (DuBois Reymond, 1843). Beaucoup plus tard, une équipe a mesuré un puissant courant électrique de 10 à 100  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , sortant du moignon d'un membre coupé chez la salamandre (Borgens et al., 1977). Ces chercheurs se doutaient bien que le courant ainsi que le CEE étaient essentiels à l'épimorphisme, c'est-à-dire à la capacité de régénérer un membre, et à la guérison d'une plaie (Jaffe and Venable, 1984; Venable et al., 1983), mais ce n'est que plus tard que d'autres études sont venues appuyer cette hypothèse (Altizer et al., 2002; Jenkins et al., 1996). Entretemps, un PTE a été mesuré à travers l'épiderme chez les mammifères et chez l'humain (Barker et al., 1982; Foulds and Barker, 1983). Cette découverte était importante puisque c'est la chute du PTE à la périphérie de la zone lésée qui induit le CEE.

C'est alors que débutent plusieurs études afin de déterminer les effets des champs électriques sur les cellules. Bien que peu d'études *in vitro* aient été réalisées sur des cellules épithéliales cutanées, certaines observations ont tout de même permis de faire des découvertes intéressantes. Entre autres, l'exposition de kératinocytes isolés à des champs électriques d'intensité physiologique dirige la migration des cellules vers la cathode et la vitesse de migration dépend du substrat sur lequel les cellules migrent (Sheridan et al., 1996). L'intensité du champ électrique affecte aussi la vitesse de migration, mais cette vitesse plafonne à partir de 100 mV/mm (Nishimura et al., 1996). Après la mise en évidence des effets du champ électrique, les recherches se sont concentrées sur les mécanismes intracellulaires impliqués pour expliquer les phénomènes observés.

Le calcium extracellulaire et l'EGF sont essentiels pour que le champ électrique induise un effet (Fang et al., 1998). Principalement, en présence d'un champ électrique, les récepteurs de l'EGF sont relocalisés à la membrane cellulaire qui fait face à la cathode afin d'orienter la migration des kératinocytes (Fang et al., 1999). Ces observations concordent avec des études antérieures qui avaient



démontré que l'EGF est impliqué dans la migration des kératinocytes (Ando and Jensen, 1993; Barrandon and Green, 1987; Chen et al., 1993). De plus, la protéine kinase A (PKA), activée lorsque le niveau d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) augmente, régule négativement l'orientation des kératinocytes exposés aux champs électriques (Pullar et al., 2001). L'utilisation d'un antagoniste des récepteurs adrénergiques  $\beta 2$  (timolol) ou d'un agoniste (isoproterenol) vient jouer sur l'activité de l'adénylate cyclase, l'enzyme qui catalyse la conversion de l'ATP en AMPc, et augmente ou diminue respectivement l'orientation des cellules sans influencer leur capacité migratoire (Pullar and Isseroff, 2005). Plus récemment, une étude a démontré pour la première fois, un mécanisme intracellulaire précis. L'induction de la voie signalétique de la PI3K $\gamma$  dans les kératinocytes active Src et Akt (Zhao et al., 2006). En plus, l'activation de ces protéines suit la polarité cellulaire induite par le champ électrique, c'est-à-dire que lorsque le sens du courant est inversé, la distribution des protéines activées l'est aussi. Bien que ce soit une découverte majeure, le signal extracellulaire activant la voie de la PI3K $\gamma$  demeure inconnu.

Bien que ces études aient été réalisées sur des cellules isolées, l'exposition de colonies de kératinocytes à des champs électriques provoque aussi des effets. Entre autres, la forme de la colonie s'allonge et s'oriente perpendiculairement au champ électrique à des intensités supraphysiologiques de 400mV/mm, (Methot S. et al., 2001). Il est à noter que le stade de différenciation au sein d'une colonie n'est pas uniforme et une étude a tenu compte de ce facteur (Obedencio et al., 1999). Ainsi, les kératinocytes exprimant l'involucrine ont une vitesse de migration plus lente que ceux qui ne l'expriment pas sans pour autant perdre leur faculté à s'orienter perpendiculairement au champ.

Par conséquent, il pourrait être intéressant d'utiliser cette capacité migratoire des cellules en présence d'un champ électrique pour guérir des plaies chroniques comme les ulcères. Certaines études tendent à démontrer l'efficacité des

stimulations électriques pour la guérison de plaies chroniques (Carley and Wainapel, 1985; Gardner et al., 1999), mais le mécanisme derrière ce phénomène demeure inconnu et plusieurs variables (le sens du courant, l'intensité du courant ou le temps de stimulation), devront être déterminées avant que ce type de traitements soit utilisés couramment.

Malgré toutes ces recherches, il existe peu de connaissances sur les mécanismes par lesquels les champs électriques influencent la réparation des plaies *in vivo* et bien que le CEE soit dépendant du PTE, il n'existe aucune étude démontrant un mécanisme qui rétablit la distribution des ions  $\text{Na}^+$  à travers l'épiderme durant la réépithélialisation. Une étude complète qui tenterait d'expliquer ce phénomène chez l'humain soulève immédiatement un problème éthique puisque des biopsies devraient être prélevées, idéalement à chaque jour, afin d'analyser la correspondance entre les mesures prises et l'état des tissus. La peau humaine reconstruite par auto-assemblage, mise au point au laboratoire, permet d'effectuer ce genre d'étude de façon éthique et en condition contrôlée. De plus, la maturation de l'épiderme à l'interface air-liquide rend possible la mesure du PTE lors de la genèse de l'épiderme, ce qui serait impensable *in vivo*.

L'objectif général est d'étudier la formation du PTE en fonction du temps durant la genèse de l'épiderme ainsi que durant la réépithélialisation d'une plaie sur un modèle de peau humaine reconstruite par génie tissulaire. Notre hypothèse est que la peau humaine reconstruite par génie tissulaire possède un PTE et qu'il évolue en fonction du stade de différenciation des cellules épidermiques. Nous pensons aussi que les niveaux d'expression des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase corréleront avec les valeurs de PTE puisqu'elles sont un élément majeur du transport des ions  $\text{Na}^+$ . Avec le modèle de peau reconstruite développé au LOEX ainsi qu'avec le modèle de plaie, le PTE pourra être mesuré à divers endroits. En plus, les mesures pourront s'étirer sur une longue période de temps (9 jours). Pour y parvenir, il faut mesurer les valeurs de PTE des échantillons dans un



environnement stérile. Un système simple, précis et efficace a donc été conçu à partir d'un multimètre à haute impédance, d'électrodes d'Ag/AgCl<sub>2</sub> immergées dans une solution d'électrolytes et de sondes mobiles remplies d'agarose. Par la suite, un des objectifs spécifiques est d'évaluer l'expression en fonction du temps de protéines impliquées dans le transport ionique. La présence d'un gradient ionique à travers l'épiderme laisse penser que l'expression des protéines responsables du transport ionique dans le tissu varie aussi à travers les différentes couches. Par conséquent, si le PTE varie en fonction du temps, notre hypothèse est que l'expression des protéines devrait varier aussi. L'autre objectif spécifique est d'évaluer la corrélation entre les variations du PTE en fonction du temps avec la réépithélialisation de la surface de la plaie et la différenciation du néoépiderme *in vitro*, mais également *in vivo* sur un modèle de plaie chez le porc.



## **Chapitre 2 : Restauration du potentiel trans-épithélial *in vitro* sur un modèle de peau reconstruite par génie tissulaire et durant le processus de la guérison d'une plaie *in vivo*.**

**Article publié dans Tissue Engineering en octobre 2010**

### **Avant-propos**

Ce chapitre fait l'objet d'un article intitulé : Restoration of the Transepithelial Potential Within Tissue-Engineered Human Skin *In Vitro* and During the Wound Healing Process *In Vivo*, qui a été publié dans la revue Tissue Engineering. Les expériences ont été conçues par Jean Dubé. Pour ma part, j'ai réalisé entièrement les expériences et les montages pour les figures 2.2 et 2.3 en plus de participer aux expériences et aux montages pour les figures 2.4, 2.5 et 2.6 en compagnie de Jean Dubé. Les Drs Lucie Germain et Véronique Moulin ont étroitement collaboré à la rédaction du manuscrit effectué par Jean Dubé tandis que les Drs Charles Roberge et Robert Gauvin ont participé à sa correction. Les éditions Mary Ann Liebert ont donné leur permission afin que cet article soit publié dans ce mémoire.

## 2.1. Résumé

La peau normale humaine possède un potentiel trans-épithélial (PTE) qui varie selon la localisation anatomique (10 à 60 mV). Le rôle du PTE dans l'épiderme intact n'est toujours pas connu. Par contre, lorsqu'une blessure survient, la brèche dans le PTE induit un champ électrique endogène (100 à 200 mV/mm) dirigé vers le centre de la plaie engendré par un déplacement ionique qui génère un courant continu. Ce champ électrique endogène pourrait être impliqué dans le processus de guérison de la plaie en attirant les cellules pour faciliter la réépithélialisation. Toutefois, il existe très peu de connaissance sur le processus de restauration du PTE durant la formation de l'épiderme et la guérison des plaies. Au cours de ce travail, nous avons étudié les variations du PTE et l'expression des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase en fonction du temps durant la formation de l'épiderme *in vitro* en utilisant des peaux humaines reconstruites par génie tissulaire et *in vivo* sur un modèle de plaie cutanée chez le porc. Les résultats montrent que le PTE subit une phase ascendante et une autre descendante lors de la formation de l'épiderme et durant la réépithélialisation d'une plaie *in vitro*. Cette cinétique a aussi été observée *in vivo*. Ces périodes ascendantes et descendantes ont été corrélées avec des changements de l'expression des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. La distribution des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase varie aussi en fonction de la différenciation de l'épiderme. L'ensemble de ces résultats suggère que la variation de l'expression des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase en fonction du temps et à travers l'épiderme est un paramètre déterminant du PTE. Ce paramètre dicterait le transport cationique durant la formation et la restauration de l'épiderme. Par conséquent, cette étude apporte une nouvelle perspective pour comprendre la formation et la restauration du PTE durant le processus de la guérison d'une plaie. Ceci pourrait avoir un impact important sur des applications médicales futures associées au traitement de blessures chroniques.



## **2.2. Restoration of the Transepithelial Potential Within Tissue-Engineered Human Skin *In Vitro* and During the Wound Healing Process *In Vivo*.**

### **Auteurs**

Jean Dubé, Ph.D.,<sup>1,2</sup> Olivier Rochette-Drouin, B.Sc.,<sup>1,2</sup> Philippe Lévesque, Eng., M.Sc.,<sup>1,2</sup> Robert Gauvin, Eng., Ph.D.,<sup>1,2</sup> Charles J. Roberge, Ph.D.,<sup>1,2</sup> François A. Auger, M.D., FRCP (C.)<sup>1,2</sup> Daniel Goulet, Ph.D.,<sup>3</sup> Michel Bourdages, Eng., M.Sc.A.,<sup>4</sup> Michel Plante, M.D.,<sup>5</sup> Lucie Germain, Ph.D.,<sup>1,2\*</sup> and Véronique J. Moulin, Ph.D.<sup>1,2\*</sup>

1. Laboratoire d'Organogenèse Expérimentale (LOEX), Centre de Recherche FRSQ du CHA Universitaire de Québec, Québec, QC, Canada.

2. Département de Chirurgie, Université Laval, Québec, QC, Canada.

3. Hydro-Québec/Transénergie, Division d'Hydro-Québec, Montréal, QC, Canada.

4. Institut de Recherche Hydro-Québec (IREQ), Varennes, QC, Canada.

5. Direction Santé et Sécurité, Hydro-Québec, Montréal, QC, Canada.

\* Co-auteurs seniors

## ABSTRACT

Normal human epidermis possesses a transepithelial potential (TEP) that varies in different parts of the body (10–60 mV). The role of TEP in normal epidermis is not yet identified; but after skin injury, TEP disruption induces an endogenous direct current electric field (100–200 mV/mm) directed toward the middle of the wound. This endogenous electric field could be implicated in the wound healing process by attracting cells, thus facilitating reepithelialization. However, little is known on the restoration of the TEP during human skin formation and wound healing. In this study, the variations in TEP and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pump expression during the formation of the epithelium were investigated *in vitro* using human tissue-engineered skin (TES) reconstituted by tissue engineering and *in vivo* with a porcine wound healing model. Results showed that TEP undergoes ascending and decreasing phases during epithelium formation in TES as well as during wound repair within TES. Similar results were observed during *in vivo* reepithelialization of wounds. The ascending and decreasing TEP values were correlated with changes in the expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pump. The distribution of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pumps also varied according to epidermal differentiation. Taken together, these results suggest that the variations in the expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pump over time and across epidermis would be a determinant parameter of the TEP, dictating a cationic transport during the formation and restoration of the epidermis. Therefore, this study brings a new perspective to understand the formation and restoration of TEP during the cutaneous wound healing process. This might have important future medical applications regarding the treatment of chronic wounds.



## INTRODUCTION

In human skin, the transepithelial potential (TEP) is measurable and is principally established after the asymmetrical  $\text{Na}^+$  ion distribution in the inferior and superior sections of the epidermis (1). In normal human epidermis, the measured values of the TEP are between 10 and 60 mV and vary according to the anatomical localization (2).

The transport of sodium through the epidermis is accomplished both by the action of the sodium channels located on the apical side of the cells and by the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pumps localized at the basolateral cell membrane (3). From the cellular point of view, the  $\text{Na}^+$  ions enter into the cells by the sodium channels and are then extruded by the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pump to contribute to the maintenance of a low level of  $\text{Na}^+$  within the cell. The differential transport favors an ionic gradient with an ion concentration that is larger in the stratum germinativum than in the upper layers of the epidermis. This is at the origin of the TEP.

The TEP is important for the generation of the endogenous electric field (EEF) when a skin wound occurs (1, 3-5). The EEF was evaluated around 100-200 mV/mm in the human skin wound and its intensity decrease gradually over time during the healing process (1, 6, 7). Studies carried out on a monolayer of cells showed that the exposition of these cells to electric fields of physiologic intensity affects cell migration, protein synthesis, cell orientation, protein distribution, and activation (3-5, 8).

In vivo studies carried out on guinea pigs showed that stimulations with external electric fields improve wound healing (9). Moreover, the proliferation of epithelial cells is increased, and revascularization of the wound is faster than in untreated controls (9). In addition, after autologous skin grafting, the adherence of the graft is improved and the process of wound healing is more effective after the treatment with external electric fields than in untreated controls (10). Electric stimulation

carried out on humans as treatment for chronic skin wounds resulted in 1.5-2.5 fold faster healing than controls (11). Although electric stimulation may improve the healing of chronic wounds, the proposed protocols of stimulations are empirical. Consequently, several parameters such as intensities of electric current, frequency, and duration of the treatments are variable.

After wounding, the TEP decreased in the epidermis surrounding the wound (1, 12). When the regeneration of the skin is complete, TEP is restituted. However, the mechanism responsible for its restoration is unknown. Similarly, the mechanism of formation of TEP during epidermis genesis is unknown. To determine the variations in TEP during the formation of the epidermis or its restoration during wound healing, we carried out studies using human tissue-engineered skin (TES) model developed in our laboratory (13, 14). This *in vitro* TEP measurements over time in TES were corroborated with histological changes and with *in vivo* TEP variations during porcine skin wound healing. The expression of a crucial protein implicated in Na<sup>+</sup> transport, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pump, was also evaluated at the same time points during the development of the epidermis and the reepithelialization process.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell Culture**

Human fibroblasts, obtained from adult human breast skin and cultured as previously described (13), were used between the second and the sixth passages. Briefly, cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum (HyClone), 100 IU/ml penicillin G, and 25 µg/ml gentamicin (Schering) and kept in an 8% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C with 95% of relative humidity. Culture medium was changed three times per week. Human keratinocytes were isolated from human newborn foreskin, cultured as previously



described (15), and used at the third passage. Briefly, cells were cultured on a feeder layer of irradiated mouse 3T3 fibroblast in Dubelcco's modified Eagle's medium with Ham's F-12 medium in a 3:1 proportion (Invitrogen) supplemented with 24.3  $\mu\text{g/ml}$  adenine (Sigma-Aldrich), 5% Fetalclone II (Hyclone) 5  $\mu\text{g/ml}$  insulin (Sigma-Aldrich), 0.4  $\mu\text{g/ml}$  hydrocortisone (Calbiochem), 1 nM cholera toxin (Sigma-Aldrich), 10 ng/ml epidermal growth factor (Austral Biologicals), and antibiotics (100 IU/ml penicillin G and 25  $\mu\text{g/ml}$  gentamicin [BD Bioscience]). After a week of expansion, keratinocytes were plated on tissue-engineered dermis or into six-well culture dishes on cover slips (22x10.5 mm) (Belco) at 10,000 cells/cm<sup>2</sup> with irradiated 3T3 at 7000 cells/cm<sup>2</sup> and cultured until 80% of confluence was reached.

### **Human skin produced by tissue engineering**

A complete description of the procedure to obtain the self-assembly method was described in a previous work (13). Briefly, fibroblasts were allowed to grow for 28 days in T25 culture dishes containing the medium described above and supplemented with 50 mg/ml of ascorbic acid to form a tissue sheet. Fibroblast sheets were peeled from the dishes and two layers were superimposed. After a week of dermal tissue maturation, human keratinocytes were seeded on top of the dermal tissue. After 7 days of submerged culture, tissue was placed at the air-liquid interface. This air-liquid step was unique compared with previous work in the fact that new supports, specially designed to promote development of homogeneous epidermis, were used (FIG 1C). Moreover, these new supports maintain the TES in a complete horizontal position without deformation during the application of the electrodes. Tissue was then maintained in this interface for 2 or 3 weeks, and culture medium was refreshed thrice a week.

### **Wound healing model on TES**

A complete wound healing model on TES was produced as previously described (14). Briefly, the mature TES was wounded with a 6 mm-diameter punch biopsy

(Acuderm, Inc.) and placed over another fibroblast sheet (obtained as stated above) to allow physical support for keratinocytes migration during the reepithelialization process. The wounded TES was cultured at the air-liquid interface for 0-14 days. The reepithelialized surface was photographed every day until the final biopsy. Sample of wounded TES were removed with a small adjacent part of uninjured skin and processed for histology, staining, and immunofluorescence.

### **Measurement of TEP on TES and on wounded TES**

TEP measurement was adapted from a method developed by Barker *and al.* (1). Briefly, two Ag or AgCl<sub>2</sub> electrodes were deposited into different small containers with Steinberg solution (60mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.3 mM CaNO<sub>3</sub>.4H<sub>2</sub>O, and 1.4 mM Tris base, pH 7.4). Electrodes were connected to high impedance multimeter (HP 34970A) and set up to mV scale. Two mobile electrodes were prepared using silicon tubing (Masterflex®; Cole-Palmer) and 2% w/v of agar (Sigma) in Steinberg solution (Fig. 1A). One end of each mobile electrode was deposited in small containers (Fig. 1A). Each measurement was performed with the positive electrode placed inside the culture medium, and the negative electrode was installed at specific points on the top of the TES. A drilled acrylic template was designed to perform measurements at exactly the same place on the sample, therefore allowing for reproductibility of the recorded data. Each measurement was started and ended by a zero point calibration obtained with the two electrodes placed in culture medium. The TEP measurement was performed on six TES in each experiment (TEP studied during the formation or during reepithelialization of the epidermis). The experiment was performed twice.

### **Measurement of TEP *in vivo***

Three Landrace-Yorkshire female pigs (ALDO farm, Saint-Lambert-de-Lauzon Québec) were used. Animals were acclimated 1 week before experimental procedures. The TEP *in vivo* was adapted from a similar setup and apparatus



already described. Animals were anesthetized by an intramuscular injection of 2.2 mg/kg of Telazol (Wyeth) before each biopsy. A 10 mm (diameter) x2.5 mm (thickness) biopsy was removed from the back of each pig using punch biopsy (Acuderm, Inc.), and this wound was defined as the off set point (Fig. 1B). This off set point (large wound) was maintained wet, scraped before each measurement, and used as a control without reepithelialization. Six wounds of 6x2.5 mm were created on the back of each pig (Fig. 1B). For each wound, three measurements were recorded as every other day over a week. For every TEP measurement, the anode was placed inside the offset wound of 10 mm, and the cathode was placed in contact with the middle of the 6 mm wounds. All the manipulations of the animals were done with regard to the rules established by the Canadian Council on Animal Care.

### **Reepithelialization rate measurement**

Macroscopic pictures of the wounds were taken following TEP measurements to evaluate the size of the wound and the migrating epidermal tongue to calculate the rate of the closure of the wound. The rate of reepithelialization was calculated from the difference between the area of the reepithelialized surface compared with the total surface of the wound for each treatment, and measurements were performed using the NIH ImageJ software.

### **Histology**

The TES and human skin samples were fixed in 1% HistoCHOICE<sup>®</sup> (Amresco, Inc.) and paraffin embedded. Microtome sections (4  $\mu$ m) were stained with Masson's trichrome.

### **Immunofluorescence**

After each TEP measurement, biopsies of TES were fixed in acetone (10 min) and maintained in sterile phosphate-buffered saline solution at 4°C. Tissues were

analyzed by indirect immunofluorescence as previously described (16). The primary antibody used was mouse monoclonal antibody against  $\alpha 1$  subunit of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pump (Sigma-Aldrich). Goat anti-mouse IgG (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 conjugated) was used as secondary antibody (Invitrogen). Negative controls consisted of omission of the primary antibody during the labeling reaction.

### **Effect of pharmacological agent on TEP in TES**

Amiloride (100 mM), a cationic transport inhibitor (Sigma), was added to the culture medium every 2 days with culture medium refreshment. The TPE measurements were carried out at the center of the wound for a 14-day period as previously described.

### **Proliferation and pharmacological drugs exposition**

Keratinocytes were plated in six-well culture dishes (BD Biosciences) at 5500 cells/cm<sup>2</sup> over a feeder layer of irradiated 3T3 plated at an 8500 cells/cm<sup>2</sup> seeding density and maintained in the culture medium described above. Amiloride was added 24h after cell seeding and maintained in culture medium for 3 days. Cells were then trypsinized and counted, and cell number was compared with control.

### **Migration scratch test**

Scratch wounds were created in confluent monolayers of human keratinocytes using a sterile 100-200  $\mu\text{L}$  pipette tip. After washing away suspended cells, fresh culture medium was added with or without the presence of amiloride. Pictures of the scratch were taken every 20 min for 24h periods at 37°C using time-lapse microscopy (Nikon Eclipse TE-200U) connected to a computer equipped with the Simple PCI Software (Hamamatsu Corporation). The closure of the scratch was measured every hour using NIH ImageJ software to determine the speed of cell migration and the moment of scratch closure.



## **Statistical analyses**

Statistical analyses were carried out using the Wilcoxon test. Results were considered significant at  $p$ -values  $< 0.05$  and were represented by the symbol asterisk (\*).

## **RESULTS**

### **Measurement of TEP during formation of the epidermis on TES**

The production of TES *in vitro* offers a model to study the development of the epidermis after epithelial cell seeding on tissue-engineered dermis. The formation of TEP was correlated with histological changes. The TEP was measured daily on TES during the air-liquid maturation. No significant value of TEP was observed before day 4 (Fig. 2A). At day 5, the TEP suddenly increased to reach a maximum at day 6 (25 mV). After a fast decrease, the TEP stabilized at an intermediated value that was maintained until day 9.

To evaluate whether the changes in TEP corresponded to epidermal modifications, histology was performed on TES biopsies harvested after each TEP measurement (Fig 2B). The maturation at the air-liquid interface was characterized by thickening of epidermis and the formation of the four layers of the skin epithelium. The two or three layers of keratinocytes present at day 2 reached five to six layers at day 4. The spinous layer and the stratum granulosum of the epidermis were clearly distinguishable at day 6, and some cells started to form a thin stratum corneum. This layer was thicker and clearly detectable from day 7 (Fig. 2B).

The expression of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pump, an important protein implicated in sodium transport across cell membrane, was also investigated during the development of TES. The immunofluorescence was carried out on biopsies taken from TES to follow the presence of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase during the formation of the

epidermis. Our results showed a progressive increase in the expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase protein according to time. This variation was synchronized with the differentiation rate of the epidermis (Fig. 2B). The expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase increased until day 7 and diminished at day 9 (Fig. 2B). Moreover, a bottom-up gradient of expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pumps was observed from stratum germinativum decreasing toward the higher layers on the TES. A similar pattern was observed with regard to the native human skin sample (Fig. 2C).

### **Measurement of TEP during reepithelialization of the epidermis on TES**

The second aim of this study was to evaluate the restoration of TEP during the reepithelialization process on a wound healing model carried out on TES. Measurements of TEP were initiated right after the creation of wounds and carried out in the center of the wound over 9 days. Our results showed a gradual increase of TEP values according to time (ascending period during the whole progression of the wound closure (Fig. 3A). Values of TEP after wound creation were around 0 mV to reach  $4 \pm 2.8$  mV on day 4. At day 5, the TEP increased to reach  $7.9 \pm 3.7$  mV. The maximum value ( $22.6 \pm 3.4$  mV) was reached at day 8 and rapidly decreased to  $8.7 \pm 2.4$  mV at day 9 (decreasing period).

Biopsies from the center of the wounded TES were carried out each day after TEP measurement to follow the reepithelialization of the wound over time by histology. The biopsies at days 2, 4, 6, 8, and 9 were stained with Masson's trichrome (Fig. 3B). At day 2, migrating epithelial cells had not reached the center of the wound and only the fibroblast sheet, added as a substrate for migration, was observable in the middle. During the next 2 days, keratinocytes progressed toward the center of the wound, where a thin layer of epithelial cells was observable at day 4. Six days after creation of the wound, all the layers of a pluristratified epidermis were observable except the stratum corneum (Fig. 3B).



Detection of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pump was carried out on biopsies taken from the center of wounded TES by immunofluorescence for each day of TEP measurement during wound healing (Fig. 3B). Our results showed that the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pump were reexpressed after wound closure with a staining strongly intensifying between days 4 and 6 followed by a weak reduction at day 9. The presence of a bottom-up gradients of expression of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pumps decreasing from the stratum germinativum toward the stratum corneum was also detected in the restored epidermis.

### **Measurement of TEP during wound reepithelialization *in vivo***

To determine whether the TEP variations observed *in vitro* during TES wound healing were present *in vivo*, we have adapted our measurement system to study the variations of the TEP over time on an *in vivo* porcine wound healing model. Means of TEP for all pigs according to time are shown in Figure 4. The TEP increased after wound closure followed by a fast decrease as observed with TES. The maximum TEP *in vivo* was reached at day 6 after the creation of the wound and reached values between 25 and 40 mV for different wounds. Measures of TEP carried out on each wound presented a reproducible kinetic (with an increase in TEP followed by a decrease) according to time. This pattern was similar for all pigs.

### **Measurement of TEP during reepithelialization of the epidermis on TES in the presence of amiloride**

The effect of blockers of cationic transport on the TEP cycle observed during the reepithelialization of a wound was evaluated. Wounded TES were cultured with amiloride (100  $\mu$ M) added in the culture medium. Measurements of TEP were carried out daily from day 4 after wounding. The presence of amiloride (100  $\mu$ M) induced a delay in the TEP increase and caused a 2-day shift in the curve when

compared with control (Fig. 5A). Moreover, the increase was slower in the presence of amiloride (days 7-14) when compared with control (days 5-9).

The rate of reepithelialization of the wound on TES was also measured. The percentage of wound reepithelialization was calculated for each condition (Fig. 5B). When amiloride was added to the culture medium, a delay of 4 days was noted for the closure of the wound compared with control (Fig. 5B). Macroscopic pictures of the wounds in Figure 5C showed the progressive closure of the wound in different conditions. A gap at the center of the wound in the migrating epidermal tongue was visible until day 7 when amiloride was used, meaning that the closure of the wound was delayed compared with control which closed at day 4.

To compare the effect of amiloride on TES and on human keratinocytes monolayer, a scratch wound test was carried out in the presence of 100  $\mu\text{M}$  amiloride. Results showed that amiloride had no significant effect on the migration of keratinocytes when compared with control ( $43.0 \pm 5.7$  vs.  $46.5 \pm 4.8$   $\mu\text{m}/\text{h}$ ) (Fig. 6A). Since the migration of cells was not affected by amiloride, we evaluated whether this blocker affected the growth of keratinocytes. This evaluation was carried out during 3 days corresponding to the period needed to close the wound on TES. Human keratinocytes were cultivated in the presence of amiloride. The number of cells was evaluated daily for each condition. There was no significant difference in cell growth between the different conditions (Fig. 6B).

## **DISCUSSION**

We showed that there is a variation in TEP during skin formation and during the reepithelialization of a wound. The TEP underwent a gradual increase from 2 to 3 days until the maximum (around 25 mV) of TEP was reached, followed by a quick drop in TEP within 24h. This cycle was correlated with specific changes in histological features of the epidermis. The ascending period corresponded to the progressive differentiation of the epidermis of the TES. The maximum TEP was



observed at the time of the appearance of the stratum corneum, when this layer was very thin and discontinued. During the decreasing period of TEP, the epidermis of the TED was characterized by the presence of a thicker and continuous stratum corneum. These results showed for the first time that TEP was restored after skin wound healing in parallel with epidermal differentiation.

The stratum corneum presents an electrical resistivity that can decrease the conductivity of the current (1) and can, thus, reduce the TEP measured with our method. This resistance could, at least in part, explain the fast reduction of the TEP value observed after reaching the maximal TEP value. Even if the increase in resistance is a determinant parameter in the measurement of the electric potential, it is, however, necessary that an electric current (or ionic) or an electric polarity remains accessible for measurement of the basal level TEP. The TEP value was low at the end of the decreasing period but a basal level of TEP was still measurable. This result suggests that an ionic polarity remains in the mature epidermis.

The reduction in TEP during wound healing could also result from other phenomena such as the variation in the expression of protein implicated in cationic transport. The analysis of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pump expression in the epidermis during the ascending period showed a gradual increase until the day after the maximal value of TEP. As observed during TEP measurement, the expression of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pump also decreases during the decreasing period of TEP. The variable distribution of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pump in the epidermis over the period observed can, thus, be correlated with variations in TEP measurements. Indeed, in the early stage of the epidermis formation, the presence of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pump was uniformly observed in the superimposed cell layers and became progressively polarized during the ascending period. These results suggest that the variability in the expression of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pump affect the cationic transport before reaching the maximum TEP value to create TEP. After the complete restoration of the epidermis, the polarized expression of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase

pumps could maintain TEP during the renewal of the epidermis. The high level of expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pumps, at the bottom of the epidermis, is essential to manage the transport of Na<sup>+</sup> coming from underlying tissue.

The first detectable TEP value during wound healing was only observed when the keratinocytes had completely covered the wound. The maximal TEP values measured on TES during the reepithelialization process reached 30 mV *in vitro* and nearly 40 mV for the ones measured *in vivo* on the pig skins. Our results are in agreement with measure obtained *in vivo* on human skin (2).

We investigated the effect of the addition of a cationic transport blocker during formation of TEP. Previous studies carried out on rat corneas showed that modification of ionic transport across cornea influences the transcorneal potential value (17) and the speed of wound closure (18). In these studies, the transcorneal potential difference is, however, measured near the wound margin. In the present study, the skin TEP was measured in the center of the wound; result showed that the presence of amiloride, during the reepithelialization of a wound on TES, induced a 2-day delay before the beginning of the ascending period of the TEP. Further, the time to reach the maximum value of TEP is increased (4 days instead of 1 day). In parallel, the addition of the blocker of carionic transport decreased the rate of wound reepithelialization. The lack of effects of amiloride in a scratch test and a cell growth measurement carried out on monolayer cultured human keratinocytes excluded that amiloride may affect the speed of migration. Taken together, these results suggest that the delay induced by amiloride on reepithelialization was mediated by disruption of the cationic transport that was present in epidermis but not on monolayer cultured cells. It is well known that EEF and exogenous electric field are able to influence the directional migration of keratinocytes (19, 20). *In vivo*, the generation of EEF is induced after the disruption of TEP in intact skin. In monolayers, there are no superimposed layers of cells that contribute to establish TEP. Taken together, these facts suggest than there is no transepithelial ionic polarization of sodium, as this is not an epidermis but only a



monolayer of keratinocytes. Keratinocytes in a monolayer are able to do cationic transport and may induce a small polarization of sodium ions between the apical and the basal side of the plasmatic cell membrane. However, in this study, our results show that TEP was not measurable at the beginning of the formation of epidermis. Thus, these results suggest that the multiple cell layers are essential to obtain measurable TEP. This provides evidence that the cationic transport influences the reepithelialization process during skin wound healing. Moreover, these results suggest that the decrease in the reepithelialization rate observed in the presence of amiloride resulted from the loss of directional migration of keratinocytes toward the center of the wound. Indeed, it is likely that the decrease of TEP intensity, resulting from the inhibition of cationic transport, reduced the intensity of the EEF, thus affecting its ability to induce directional migration of keratinocytes.

## **CONCLUSION**

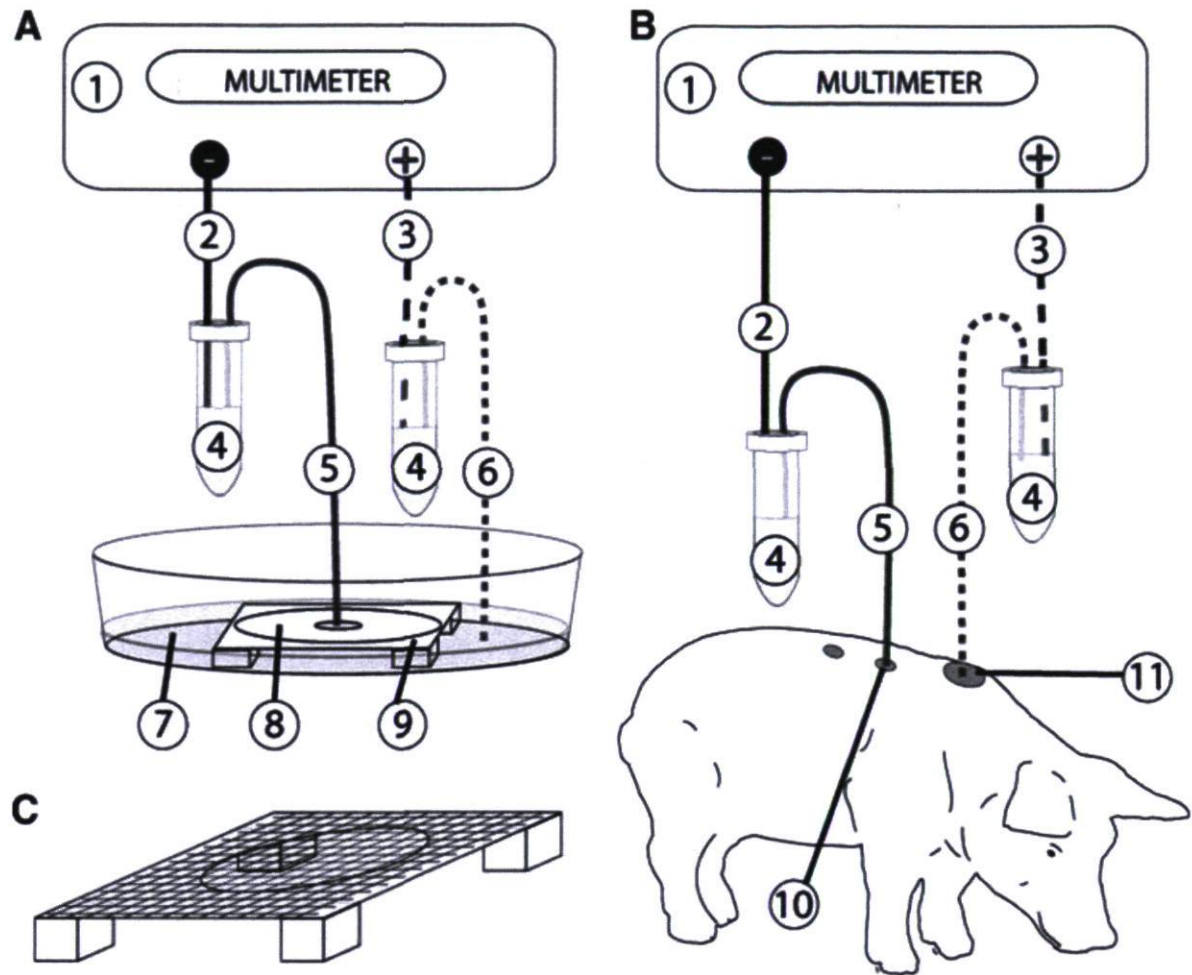
This study showed for the first time that TEP can be restored *in vitro* using reconstructed human skin. Further, we have demonstrated that TEP was restored during formation of epidermis or reepithelialization. The TEP seems to be linked to ionic active transport that is correlated with the differentiation status of epithelial cells and their Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pump expression. A better understanding of the effect of endogenous electrical phenomenon on homeostasis of skin and wound healing will be crucial to develop clinical protocols using electric stimulation.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Anne-Marie Moisan, Caroline Audet, Guylaine Jalbert, and Jean-Michel Paradis for technical assistance. This work was supported by grants from Hydro-Québec and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Lucie Germain holds a Canadian Research Chair on Stem Cells and Tissue Engineering from CIHR. Véronique J. Moulin is supported by scholarship from the Fonds de

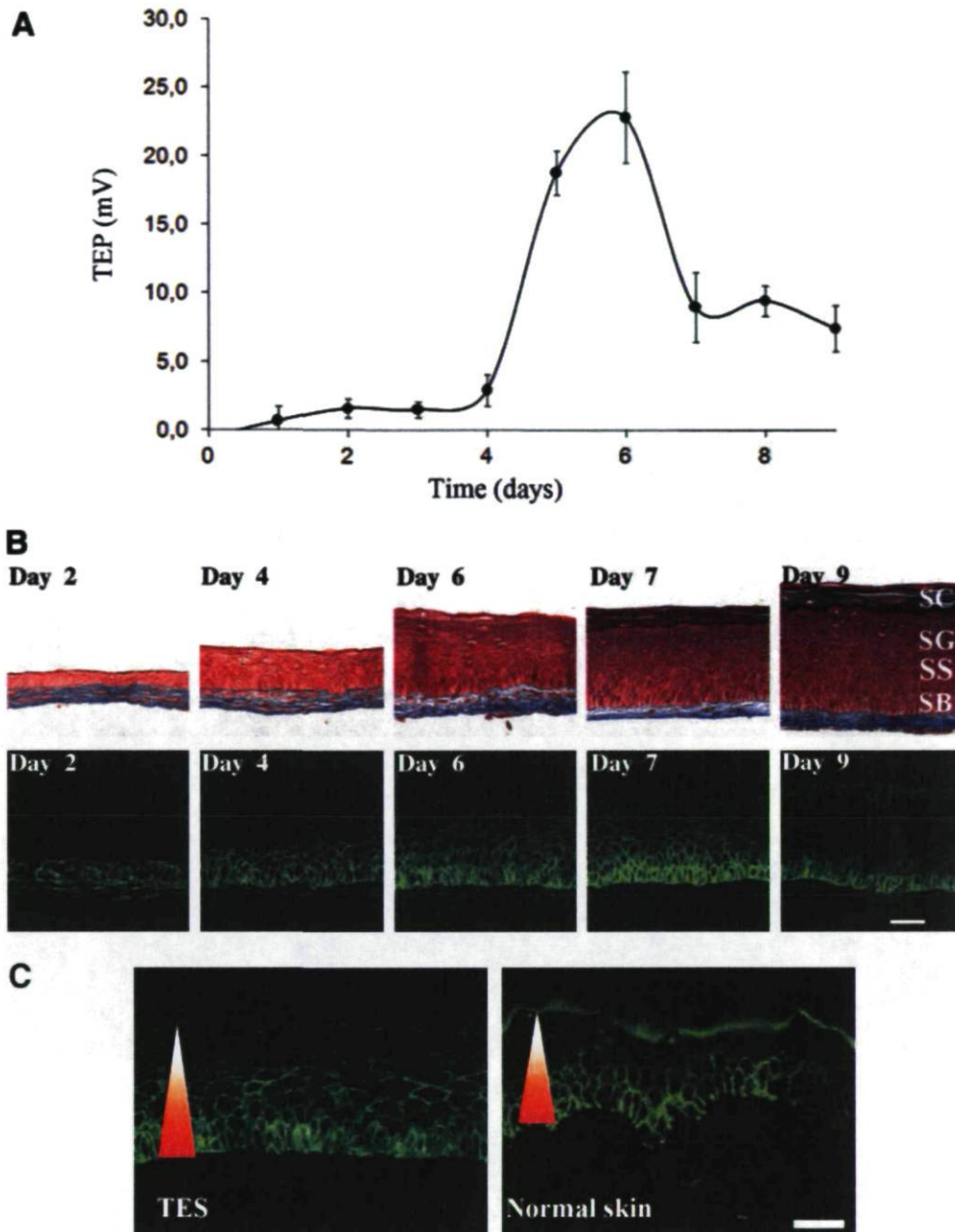
Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Jean Dubé was supported by studentships from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT).





**Figure 2.1.** Method of transepithelial potential (TEP) measurement *in vitro* and *in vivo*.

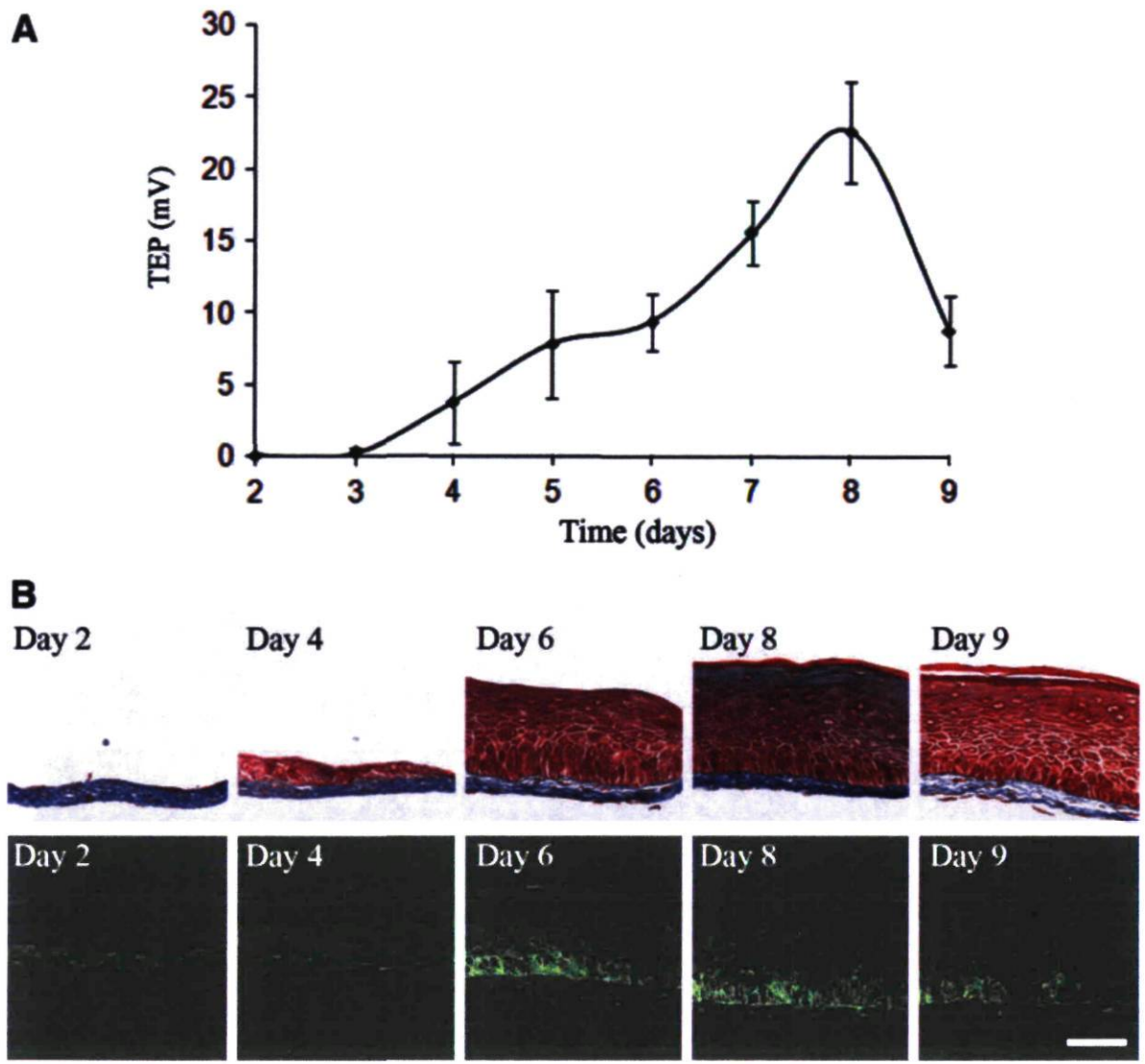
**A)** Method of measurement used with tissue-engineered human skin (TES): Multimeter (1), wire which connects the multimeter (negative pole) and electrode (2), wire which connects the multimeter (positive pole) and electrode (3), containers with Steinberg solution and the electrodes Ag / AgCl<sub>2</sub> (4), negative mobile electrode deposited on the skin or in the center of the wound (5) (silicone tube filled with agar) and the positive mobile electrode deposited in the culture medium (6), culture medium (7), TES (8), specialized support for the air-liquid interface (9). **B)** Method of measurement used on the animal model *in vivo*. Wound of 6 mm in diameter on the back of pig (10), wound of reference of 10 mm in diameter (11). **C)** Specialized support made in acrylic and polyester to maintain the TES at the air-liquid interface.



**Figure 2.2.** Formation of the epidermis on TES.

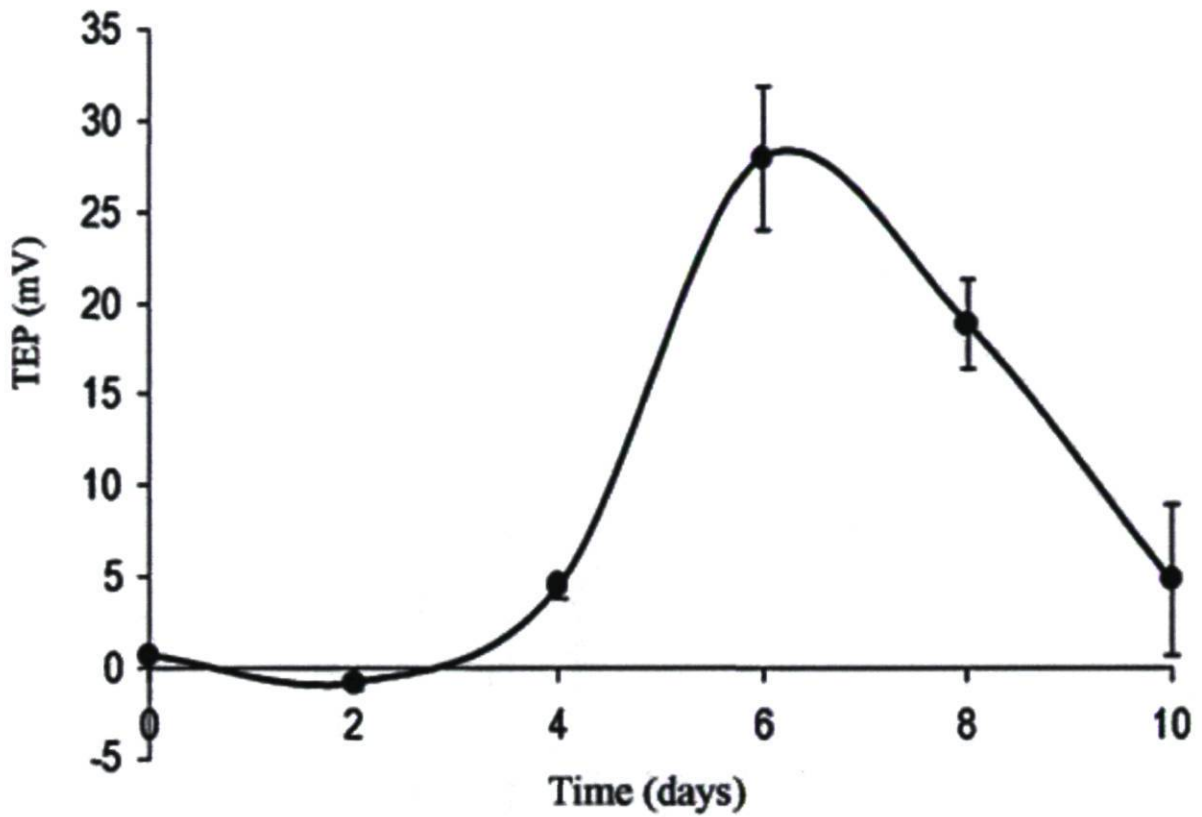
**A)** Measurement of TEP according to time during the epidermis formation on TES. **B)** Masson's trichrome staining (upper) and indirect immunofluorescence (lower) for the detection of pump  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase carried out on TES at days 2, 4, 6, 7, and 9; scale bar 100  $\mu\text{m}$ . Stratum corneum (SC), stratum granulosum (SG), stratum spinosum (SS), and stratum basale (SB). **C)** Indirect immunofluorescence realized on TES at day 6 and normal skin for detection of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pump. A decreasing gradient in the expression of the pump  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase starting from the stratum basale until below the stratum corneum; scale bar 50  $\mu\text{m}$ .





**Figure 2.3.** Restoration of the epidermis on TES.

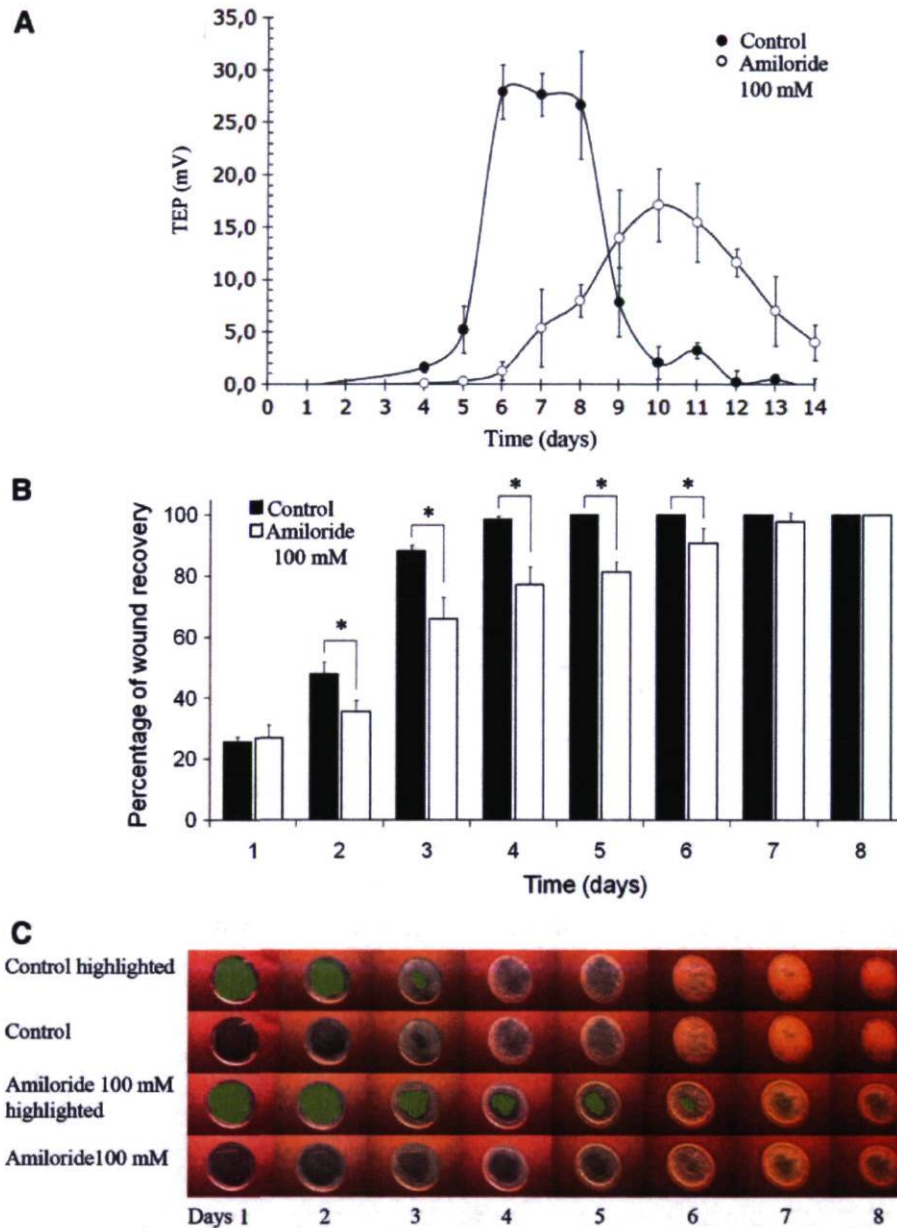
**A)** Measurement of TEP according to time during reepithelialization of wound on TES. **B)** Masson's trichrome staining (upper) and indirect immunofluorescence (lower) for the detection of the pump  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase carried out on the center of the wounded TES at day 2, 4, 6, 8, and 9 after wounded; scale bar 100  $\mu\text{m}$ .



**Figure 2.4.** Measurements of TEP according to time during reepithelialization of the skin wounds in pigs.

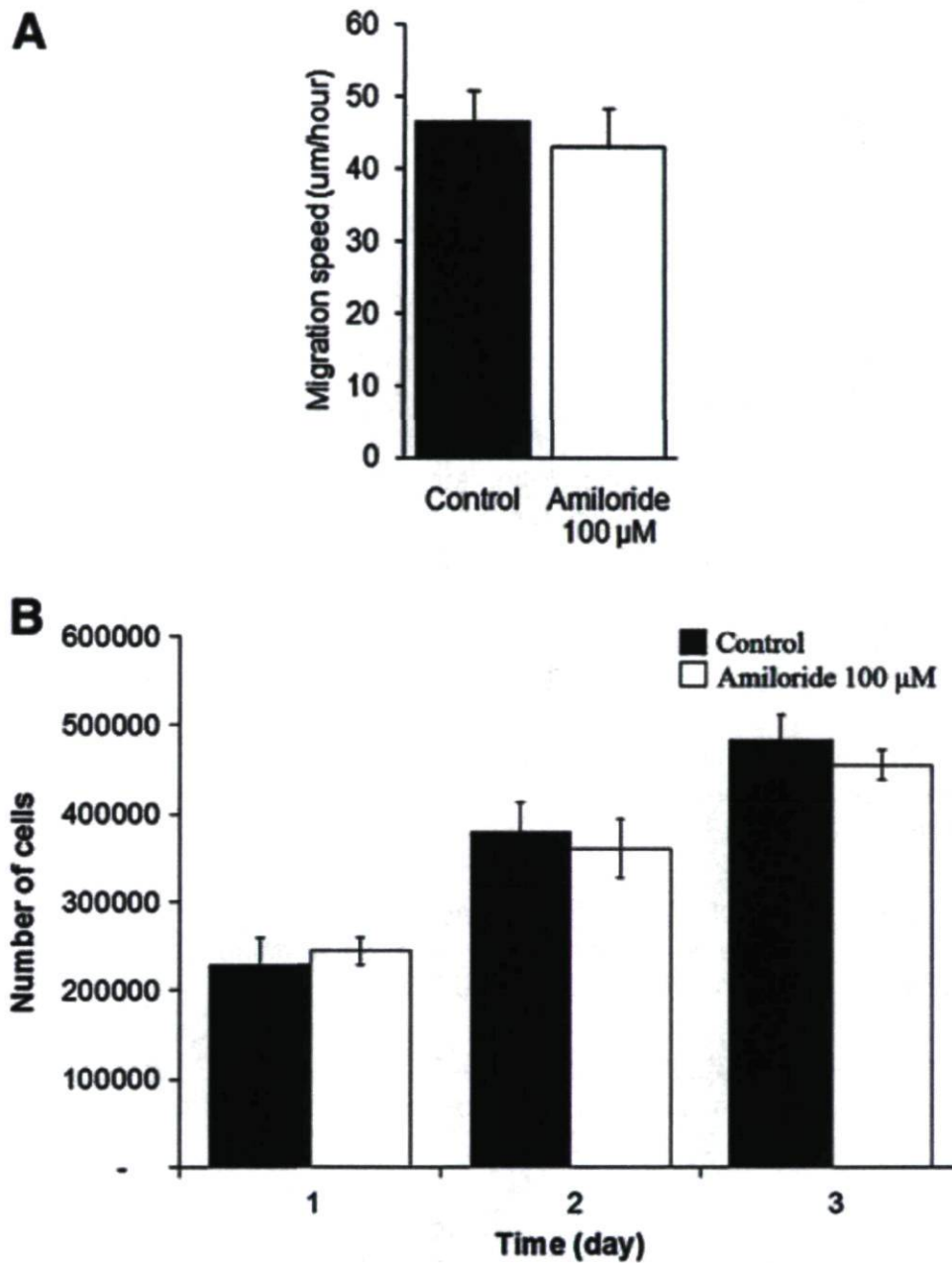
Curve represents the average of TEP for three different wounds per pig and is carried out on three different pigs. This result is representative of two independent experiments including three pigs in each.





**Figure 2.5.** Measurement of TEP and the rate of reepithelialization of the wound over time in the presence of a cationic transport blocker.

**A)** Measurement of TEP according to time during the reepithelialization of a wound; control (filled circle), amiloride 100  $\mu$ M (open circle). **B)** Percentage of the surface of the wound that is reepithelialized. Control (black), amiloride 100  $\mu$ M (white). **C)** Macroscopic pictures of the migrating epidermal tongue according to time with amiloride 100  $\mu$ M or not (control). The color was added on pictures to highlight the non reepithelialized part of the wounds in different conditions (control and amiloride 100  $\mu$ M highlighted). \*Statistical test was performed using Wilcoxon test (\* $p < 0.05$ ).



**Figure 2.6.** Amiloride effects on migrating speed and the growth of human keratinocyte monolayer.

**A)** Calculation of the cell speed by scratch test carried out on monolayer of human keratinocytes. **B)** Number of cells after 3 days of culture with control (black), and amiloride (100 µM) (white).



## REFERENCES

1. Barker AT, Jaffe LF, Venable JW, Jr. The glabrous epidermis of cavies contains a powerful battery. *Am J Physiol.*242:R358-66. 1982.
2. Foulds IS, Barker AT. Human skin battery potentials and their possible role in wound healing. *Br J Dermatol.*109:515-22. 1983.
3. Nuccitelli R. A role for endogenous electric fields in wound healing. *Curr Top Dev Biol.*58:1-26. 2003.
4. Kloth LC. Electrical stimulation for wound healing: a review of evidence from in vitro studies, animal experiments, and clinical trials. *Int J Low Extrem Wounds.*4:23-44. 2005.
5. McCaig CD, Rajnicek AM, Song B, Zhao M. Controlling cell behavior electrically: current views and future potential. *Physiol Rev.*85:943-78. 2005.
6. Nuccitelli R, Nuccitelli P, Ramlatchan S, Sanger R, Smith PJ. Imaging the electric field associated with mouse and human skin wounds. *Wound Repair Regen.*16:432-41. 2008.
7. Sta Iglesia DD, Venable JW, Jr. Endogenous lateral electric fields around bovine corneal lesions are necessary for and can enhance normal rates of wound healing. *Wound Repair Regen.*6:531-42. 1998.
8. Zhao M, Song B, Pu J, Wada T, Reid B, Tai G, et al. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature.*442:457-60. 2006.
9. Chu CS, McManus AT, Okerberg CV, Mason AD, Jr., Pruitt BA, Jr. Weak direct current accelerates split-thickness graft healing on tangentially excised second-degree burns. *J Burn Care Rehabil.*12:285-93. 1991.
10. Chu CS, McManus AT, Mason AD, Jr., Okerberg CV, Pruitt BA, Jr. Multiple graft harvestings from deep partial-thickness scald wounds healed under the influence of weak direct current. *J Trauma.*30:1044-9; discussion 9-50. 1990.
11. Carley PJ, Wainapel SF. Electrotherapy for acceleration of wound healing: low intensity direct current. *Arch Phys Med Rehabil.*66:443-6. 1985.

12. Venable J, J. W. Integumentary potentials and wound healing. New York,: Alan R. Liss, inc; 1989.
13. Michel M, L'Heureux N, Pouliot R, Xu W, Auger FA, Germain L. Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. In *Vitro Cell Dev Biol Anim.*35:318-26. 1999.
14. Laplante AF, Germain L, Auger FA, Moulin V. Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *Faseb J.*15:2377-89. 2001.
15. Germain L, Rouabhia M, Guignard R, Carrier L, Bouvard V, Auger FA. Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns.*19:99-104. 1993.
16. Michel M, Torok N, Godbout MJ, Lussier M, Gaudreau P, Royal A, et al. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci.*109 ( Pt 5):1017-28. 1996.
17. Song B, Zhao M, Forrester JV, McCaig CD. Electrical cues regulate the orientation and frequency of cell division and the rate of wound healing in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.*99:13577-82. 2002.
18. Reid B, Song B, McCaig CD, Zhao M. Wound healing in rat cornea: the role of electric currents. *Faseb J.*19:379-86. 2005.
19. Sheridan DM, Isseroff RR, Nuccitelli R. Imposition of a physiologic DC electric field alters the migratory response of human keratinocytes on extracellular matrix molecules. *J Invest Dermatol.*106:642-6. 1996.
20. Nishimura KY, Isseroff RR, Nuccitelli R. Human keratinocytes migrate to the negative pole in direct current electric fields comparable to those measured in mammalian wounds. *J Cell Sci.*109 ( Pt 1):199-207. 1996.



## Chapitre 3: Discussion et perspectives

### 3.1. Discussion

Pour la première fois, une variation de l'intensité du potentiel trans-épithélial en fonction du temps lors de la genèse de l'épiderme ainsi que durant la réépithélialisation d'une plaie a été observée. De plus, les résultats obtenus *in vitro* ont été confirmés *in vivo* sur un modèle de plaie animale. Le modèle de peaux humaines reconstruites par génie tissulaire est donc valide et approprié pour l'étude du PTE. En plus, cette étude suggère fortement que le PTE est modulé par l'expression des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase ainsi que par le niveau de différenciation de l'épiderme et que lorsque le transport ionique est bloqué par un agent pharmacologique, l'intensité du PTE et la vitesse de réépithélialisation sont réduites.

#### 3.1.1. La dynamique du PTE

Étant donné que le PTE a été mesuré au centre de la plaie, il est tout à fait normal que les mesures du PTE soient près de zéro les premiers jours puisque les kératinocytes doivent d'abord migrer. La durée de la phase migratoire durant la réépithélialisation de la plaie dépend de la superficie de la surface à recouvrir. Aussitôt qu'une mince couche de cellules épithéliales recouvre la plaie, nos instruments ont permis de détecter des valeurs de PTE. Le processus de différenciation de l'épiderme est ensuite enclenché et les valeurs de PTE augmentent graduellement pendant 2 à 3 jours jusqu'à l'obtention d'un maximum qui se situe autour de 25 mV/mm. Par la suite, à l'intérieur de 24 heures, l'intensité du PTE chute brutalement. Cette cinétique est observée autant lors de la genèse de l'épiderme que durant la réépithélialisation. Les tissus utilisés pour mesurer le PTE pendant la genèse de l'épiderme ainsi que durant la réépithélialisation d'une plaie étaient complètement homogènes l'un par rapport à l'autre, mais une fois la plaie créée, la forme de la zone réépithélialisée par la migration des kératinocytes variait d'un échantillon à l'autre. Ceci explique les légères différences d'intensités

mesurées entre la courbe du PTE lors de la genèse de l'épiderme par rapport à la courbe du PTE durant la réépithélialisation d'une plaie au cours des premiers jours. Tout de même, il y a clairement une phase ascendante suivie d'une baisse drastique du PTE dans les deux cas. Cette dynamique a aussi été observée sur un modèle de plaie *in vivo* validant les observations faites *in vitro*. Les intensités maximales mesurées autant *in vitro* qu'*in vivo* concordent avec les valeurs obtenues sur la peau humaine native (Foulds and Barker, 1983). Toutefois, pour expliquer les variations d'intensité du PTE au cours du temps, des biopsies ont été prélevées à différents temps sur des tissus reconstruits sacrifiés.

### **3.1.2. La différenciation et le PTE**

La présence du PTE dépend d'au moins deux facteurs. Le tissu doit être constitué d'un tissu pluristratifié et la présence de jonctions intercellulaires étanches entre les cellules est nécessaire pour empêcher la libre circulation des ions. Grâce aux échantillons colorés au trichrome de Masson, les changements histologiques de l'épiderme sont clairement visibles au fur et à mesure que le PTE s'intensifie. Lorsque le PTE est presque nul, seule une mince couche de kératinocytes recouvre le derme. L'épaississement de l'épiderme correspond à la période ascendante du PTE. À ce moment, les desmosomes et les jonctions adhérentes restreignent la libre circulation ionique. L'atteinte du maximum d'intensité concorde avec l'apparition de la couche cornée. La formation des jonctions serrées responsables de l'étanchéité tissulaire complète débute aussi à ce moment. (Pummi et al., 2001). Donc, la différenciation des kératinocytes influence directement le PTE. Étant donné qu'il n'y a pas de desquamation dans le modèle de peau reconstruite par génie tissulaire, les cellules de la couche cornée s'accumulent et la peau s'épaissit. Cette situation non-physiologique augmente la résistance du tissu puisqu'il a été observé que la résistance de la peau augmente avec l'épaisseur de la couche cornée (Barker et al., 1982). Ainsi, la conductivité du courant diminue et cela peut contribuer à diminuer les valeurs de PTE mesurées. Ceci peut expliquer, en partie, la chute d'intensité du PTE qui survient



immédiatement après l'apparition de la couche cornée, mais la rapidité et l'ampleur de cette baisse ne peuvent être attribuées uniquement à cette cause. Il ne faut pas oublier le deuxième facteur essentiel à l'établissement d'un PTE, soit les protéines responsables du transport des ions.

### **3.1.3. Les protéines Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase et le potentiel trans-épithélial (PTE)**

L'expression des pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase varie en fonction du temps en suivant la cinétique du PTE. Au fur et à mesure que la peau se différencie, l'expression de ces pompes forme un gradient décroissant de la couche basale à la couche cornée. Puisqu'il y a une plus forte concentration d'ions Na<sup>+</sup> près du derme et que le sodium pénètre à l'intérieur de la cellule, entre autres par diffusion passive via des transporteurs spécifiques, il est normal que les cellules de la couche basale aient besoin de plus de pompes pour expulser une plus grande quantité d'ions Na<sup>+</sup>. Cela maintient l'équilibre sodique dans le cytoplasme. Alors l'accroissement de l'expression jusqu'à l'obtention du maximum d'intensité du PTE permettrait aux cellules de pomper activement les ions Na<sup>+</sup> à travers l'épiderme, établissant du même coup le PTE. Bien que la baisse d'intensité du PTE corrèle avec une baisse de l'expression des pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, le mécanisme qui lie ces deux événements demeure inconnu. Il a été démontré que les pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase jouaient un rôle important dans l'établissement de la polarité des cellules épithéliales (Laprise et al., 2009). Cette polarisation influence la formation des jonctions serrées et une fois la polarité et les jonctions serrées établies dans le tissu, le nombre de pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase par cellule peut diminuer puisque l'intégrité du tissu est maintenant complète. Cette hypothèse pourrait expliquer la diminution de l'expression des pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase après l'atteinte du maximum de PTE et la formation de la couche cornée puisque pour maintenir l'équilibre ionique les cellules n'ont plus à compenser pour la libre circulation des ions.

#### **3.1.4. L'amiloride et le PTE**

L'inhibition des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase par la ouabaïne cause un retard dans la croissance cellulaire (résultats non montrés). Le retard dans la réépithélialisation lors de la création de la plaie ne pouvait donc pas être attribué uniquement à la baisse du transport des ions  $\text{Na}^+$ . Par contre, l'utilisation d'amiloride, un inhibiteur des canaux ENaC, n'affecte pas la croissance cellulaire et ne ralentit pas la vitesse de migration d'une monocouche de kératinocytes. Une diminution du maximum d'intensité du PTE est alors mesurée en plus d'observer un retard dans la réépithélialisation. L'inhibition d'une partie du transport cationique atténue la polarisation de l'épiderme et cette baisse de polarité ionique à travers les différentes couches de l'épiderme influence la force du CEE à la baisse. Par conséquent, le retard de réépithélialisation de quatre jours, par rapport au groupe témoin, observé sur les équivalents traités avec l'amiloride s'expliquerait par le CEE de plus faible envergure. La migration dirigée, un des effets du CEE, en est alors affectée et cause ce retard.

#### **3.1.5. La peau reconstruite et le PTE**

Les mesures de PTE *in vivo* sont très complexes particulièrement sur un animal. Cela nécessite des installations adéquates puisqu'il faut absolument anesthésier l'animal lors de la plaie ainsi que lors des mesures. La peau humaine reconstruite par génie tissulaire offre donc une alternative de choix pour l'étude du PTE particulièrement lorsque plusieurs biopsies doivent être prélevées pour faire des analyses histologiques ou immunohistologiques. De plus, l'homogénéité du tissu et la possibilité d'étudier les effets d'agents pharmacologiques sont aussi de précieux avantages en faveur de ce modèle. Cependant, la mesure du PTE devait se faire manuellement à l'aide d'un gabarit, pour garantir que les mesures seraient toujours prises au même endroit, sous une hotte à flux laminaire pour assurer un environnement stérile. Toutes ces manipulations pouvaient prendre plusieurs minutes par échantillon et pendant ce temps, la température de l'échantillon ainsi que le taux d'humidité variait par rapport aux conditions de l'incubateur. Pour



remédier à ces variations, les mesures devraient idéalement être prises directement dans l'incubateur, mais cela implique la mise en place d'un nouveau système de mesure en condition stérile. Il y a donc place à amélioration et les résultats obtenus ouvrent la voie à l'exploration de nouveaux sentiers afin de mieux comprendre le lien entre le PTE et le CEE.

## **3.2. Perspectives**

Plusieurs questions entourant le lien entre le PTE et le CEE demeurent sans réponses, mais de futures expériences s'inspirant de cette dynamique du PTE dans le temps permettront d'augmenter notre niveau de connaissance et notre compréhension de ce phénomène biologique. Ultiment, un traitement clinique pourrait être mis au point afin d'améliorer la qualité et la rapidité de la guérison des plaies chez les personnes gravement brûlées. Ce procédé amplifierait le champ électrique naturel à l'aide de stimulations électriques et il découlerait des découvertes et des observations réalisées dans ce domaine. En attendant l'établissement de ces bases scientifiques solides, vérifiables et reproductibles, voici quelques pistes à explorer autant au niveau d'améliorations techniques qu'au niveau de la mécanistique du CEE qui nous permettra peut-être de se rapprocher du but.

### **3.2.1. La mesure du PTE**

La mise en place d'un système automatisé de mesure en conditions stériles améliorerait certainement la précision des mesures de PTE. En plus de mesurer le PTE à des intervalles de temps régulier, les mesures pourraient être prises exactement au même endroit sans changement de température et de pourcentage de CO<sub>2</sub> puisque ce montage pourrait être inséré dans un incubateur. En y ajoutant un appareillage motorisé sur rail capable de mouvement en deux dimensions, il serait aussi possible de mesurer divers endroits sur un même tissu ou sur plusieurs tissus en même temps. Toutefois, la conception d'un tel appareil est complexe et nécessite entre autres des compétences en programmation

informatique. De plus, l'épaisseur du tissu peut être variable d'un tissu reconstruit à un autre et particulièrement dans le cadre d'une plaie où la mesure ne s'effectue pas à la même hauteur au centre de la plaie que dans la portion non lésée. Par conséquent, des capteurs sensibles à la résistance rencontrée par l'électrode lorsqu'elle crée un contact avec le tissu devraient être présents à l'extrémité de la sonde qui mesure le PTE. Un tel système permettrait de suivre les variations rapides du PTE surtout dans la phase qui suit l'atteinte du maximum du PTE ou encore les fluctuations en temps réel suite à l'ajout d'agents pharmacologiques. La conception et la réalisation d'un tel système peut constituer un projet du niveau de la maîtrise pour un ingénieur.

### **3.2.2. Les pompes $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase**

Tel que démontré dans l'article, l'expression des pompes varie dans le temps au cours du processus de différenciation des kératinocytes pendant la genèse et lors de la réépithélialisation d'une plaie (Dube et al., 2010). Sachant que la dynamique intracellulaire des ions  $\text{Na}^+$ , via les pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, joue un rôle déterminant dans la formation des jonctions serrées et des desmosomes (Rajasekaran et al., 2001), il serait intéressant d'étudier la formation et la signalisation de ces protéines en lien avec la cinétique du PTE lors de la genèse de l'épithélium ou encore durant la réépithélialisation d'une plaie. En plus, récemment il a été démontré que ces pompes participent à la polarisation des cellules épithéliales (Laprise et al., 2009). Il y a certainement un lien entre la dynamique ionique tissulaire mesurée par le PTE et la formation de ces structures. Par exemple, si le PTE est diminué, est-ce que l'induction de la polarité cellulaire et la formation des jonctions serrées est retardée dans le tissu ? Le retard dans l'atteinte de l'étanchéité tissulaire expliquerait peut-être le délai observé lorsque les plaies sont en présence d'amiloride. Les modèles de peaux reconstruites par génie tissulaire et de plaies développés au laboratoire fournissent un environnement propice à l'étude de la formation des structures dans différentes conditions. Les interactions des desmosomes et/ou des jonctions serrées avec des transporteurs



ioniques comme les pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase ou avec de petites protéines de la famille des rho GTPase impliquées dans la signalisation menant à la migration cellulaire tel que rac1, rhoA et cdc42 peuvent ensuite être analysées adéquatement.

### **3.2.3. Le calcium**

Dans le cadre du présent mémoire, le calcium n'a pas été abordé et c'était volontaire. Son implication dans le PTE y est négligeable malgré la distribution des ions calciques qui forment un gradient à l'inverse du gradient sodique (croissant de la couche basale jusqu'à la couche granuleuse de l'épiderme) puisque la concentration de calcium extracellulaire est faible en comparaison avec celle du sodium (Elias et al., 2002). Par contre, lorsque des cellules sont exposées à un champ électrique, une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium est observée (Cho et al., 1999; Onuma and Hui, 1988). Ceci déclenche forcément un ou plusieurs mécanismes puisque le calcium est impliqué dans plusieurs voies signalétiques. Entre autres, il joue un rôle important dans le cadre du processus de différenciation des kératinocytes. L'activité enzymatique des transglutaminases 1, 3 et 5 est dépendante du calcium et leur activation crée des liens avec d'autres protéines telles que l'involucrine et la loricrine menant à la formation de la couche cornée (Candi et al., 2005; Djan et al., 2000; Koch et al., 2000). Ainsi, cette augmentation de calcium intracellulaire dans les kératinocytes exposés aux champs électriques pourrait enclencher un processus de différenciation précoce, mais cela n'a pas encore été couvert comme effet potentiel sur des cellules épithéliales.

De plus, jusqu'à présent, au niveau mécanistique, très peu de données sont connues sur les voies signalétiques activées par le champ électrique. Les différentes protéines identifiées, PI3K, AKT et MAPK ont en commun d'être impliquées dans la migration cellulaire bien qu'elles jouent plusieurs autres rôles (McBain et al., 2003; Zhao et al., 2006). Le calcium aussi est impliqué dans la

migration dirigée des cellules (Fang et al., 1998). L'utilisation d'inhibiteurs de canaux calciques bloquent la migration des kératinocytes en présence de champs électriques (Trollinger et al., 2002), mais est-ce par manque de calcium ou parce que les voies signalétiques de la migration cellulaire, normalement activées par les transporteurs, sont inhibées ? La détermination de transporteurs présents sur les kératinocytes, comme le voltage-gated calcium channel (VGCC) (Denda et al., 2006) ou le récepteur du N-méthyl D-aspartate (NMDA) (Morhenn et al., 2004), qui seraient spécifiquement activés par le champ électrique permettrait par la suite d'observer si leur activation enclenche diverses cascades signalétiques menant à la migration. À l'aide d'inhibiteurs spécifiques de différents canaux calciques, il serait possible de déterminer la ou les portes d'entrées activées par le champ électrique.

L'étude de l'influence de l'augmentation intracellulaire du calcium constitue un projet d'étude très vaste, mais en le plaçant dans le contexte de la réépithélialisation, donc de la migration cellulaire et de la différenciation, cela restreint les cibles potentielles. L'expression du CEE est étroitement liée à la dynamique ionique. Par exemple, l'intensité de courant pourrait être modulée en fonction du temps afin d'amplifier le CEE.

## **Conclusion**

À l'aide d'un modèle de peaux humaines reconstruites par génie tissulaire, les variations du potentiel trans-épithélial en fonction du temps lors de la genèse de la peau ainsi que durant la réépithélialisation d'une plaie ont été observées pour la première fois. Ces observations *in vitro* ont ensuite été confirmées *in vivo*. Cette découverte apporte de nouvelles notions à considérer dans une optique de traitements des plaies cutanées utilisant des stimulations électriques pour accélérer la vitesse de réépithélialisation. La courbe du PTE en fonction du temps lors de la réépithélialisation d'une plaie pourrait permettre de déterminer le meilleur



moment pour appliquer le traitement et l'intensité de celui-ci. Le suivi de tous ces paramètres aidera aussi à établir la fréquence des traitements selon l'évolution de la guérison. Il reste encore beaucoup de voies à explorer pour bien comprendre tous les effets des champs électriques sur les kératinocytes ainsi que tous les mécanismes qu'ils régulent. La compréhension de toute cette mécanique permettra d'anticiper les effets secondaires potentiels et peut-être même d'élaborer des traitements pharmacologiques exploitant ce phénomène naturel. En attendant, l'exploration de cette facette peu connue de la guérison cutanée doit se poursuivre afin, qu'un jour, nous puissions guérir plus rapidement les patients gravement brûlés. Cela aurait un impact majeur au niveau économique, psychologique et sociologique.

## Chapitre 4 : Bibliographie

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, Fourth edn (New York and London, Garland Science), 1616.

Altizer, A. M., Stewart, S. G., Albertson, B. K., and Borgens, R. B. (2002). Skin flaps inhibit both the current of injury at the amputation surface and regeneration of that limb in newts. *J Exp Zool* 293, 467-477.

Alvarez de la Rosa, D., Canessa, C. M., Fyfe, G. K., and Zhang, P. (2000). Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annu Rev Physiol* 62, 573-594.

Ando, Y., and Jensen, P. J. (1993). Epidermal growth factor and insulin-like growth factor I enhance keratinocyte migration. *J Invest Dermatol* 100, 633-639.

Badylak, S. F., Taylor, D., and Uygun, K. (2010). Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng*.

Barker, A. T., Jaffe, L. F., and Venable, J. W., Jr. (1982). The glabrous epidermis of cavies contains a powerful battery. *Am J Physiol* 242, R358-366.

Barrandon, Y., and Green, H. (1987). Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell* 50, 1131-1137.

Benfante, R., Antonini, R. A., Vaccari, M., Flora, A., Chen, F., Clementi, F., and Fornasari, D. (2005). The expression of the human neuronal alpha3 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase subunit gene is regulated by the activity of the Sp1 and NF-Y transcription factors. *Biochem J* 386, 63-72.

Berthod, F., Hayek, D., Damour, O., and Collombel, C. (1993). Collagen synthesis by fibroblasts cultured within a collagen sponge. *Biomaterials* 14, 749-754.

Berthod, F., Saintigny, G., Chretien, F., Hayek, D., Collombel, C., and Damour, O. (1994). Optimization of thickness, pore size and mechanical properties of a biomaterial designed for deep burn coverage. *Clin Mater* 15, 259-265.



Bhalla, V., and Hallows, K. R. (2008). Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications. *J Am Soc Nephrol* 19, 1845-1854.

Borgens, R. B., Vanable, J. W., Jr., and Jaffe, L. F. (1977). Bioelectricity and regeneration: large currents leave the stumps of regenerating newt limbs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 4528-4532.

Briggaman, R. A., and Wheeler, C. E., Jr. (1975). The epidermal-dermal junction. *J Invest Dermatol* 65, 71-84.

Brouard, M., Casado, M., Djelidi, S., Barrandon, Y., and Farman, N. (1999). Epithelial sodium channel in human epidermal keratinocytes: expression of its subunits and relation to sodium transport and differentiation. *J Cell Sci* 112 ( Pt 19), 3343-3352.

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

Carley, P. J., and Wainapel, S. F. (1985). Electrotherapy for acceleration of wound healing: low intensity direct current. *Arch Phys Med Rehabil* 66, 443-446.

Chen, J. D., Kim, J. P., Zhang, K., Sarret, Y., Wynn, K. C., Kramer, R. H., and Woodley, D. T. (1993). Epidermal growth factor (EGF) promotes human keratinocyte locomotion on collagen by increasing the alpha 2 integrin subunit. *Exp Cell Res* 209, 216-223.

Cho, M. R., Thatte, H. S., Silvia, M. T., and Golan, D. E. (1999). Transmembrane calcium influx induced by ac electric fields. *Faseb J* 13, 677-683.

Denda, M., Fujiwara, S., and Hibino, T. (2006). Expression of voltage-gated calcium channel subunit alpha1C in epidermal keratinocytes and effects of agonist and antagonists of the channel on skin barrier homeostasis. *Exp Dermatol* 15, 455-460.

Djian, P., Easley, K., and Green, H. (2000). Targeted ablation of the murine involucrin gene. *J Cell Biol* 151, 381-388.

Dube, J., Rochette, O., Levesque, P., Gauvin, R., Roberge, C., Auger, F. A., Goulet, D., Bourdages, M., Plante, M., Germain, L., and Moulin, V. J. (2010). Restoration of the transepithelial potential within tissue-engineered human skin in vitro and during the wound healing process in vivo. *Tissue Eng Part A*.

DuBois Reymond, E. (1843). Vorläufiger Abriss einer Untersuchung über den sogenannten Froschstrom und die electromotorischen Fische. *Ann Phy U Chem* 58, 1-30.

Elias, P. M., Ahn, S. K., Denda, M., Brown, B. E., Crumrine, D., Kimutai, L. K., Komuves, L., Lee, S. H., and Feingold, K. R. (2002). Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. *J Invest Dermatol* 119, 1128-1136.

Faber, D. S., and Korn, H. (1989). Electrical field effects: their relevance in central neural networks. *Physiol Rev* 69, 821-863.

Fang, K. S., Farboud, B., Nuccitelli, R., and Isseroff, R. R. (1998). Migration of human keratinocytes in electric fields requires growth factors and extracellular calcium. *J Invest Dermatol* 111, 751-756.

Fang, K. S., Ionides, E., Oster, G., Nuccitelli, R., and Isseroff, R. R. (1999). Epidermal growth factor receptor relocalization and kinase activity are necessary for directional migration of keratinocytes in DC electric fields. *J Cell Sci* 112 ( Pt 12), 1967-1978.

Firsov, D., Gautschi, I., Merillat, A. M., Rossier, B. C., and Schild, L. (1998). The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *Embo J* 17, 344-352.

Foulds, I. S., and Barker, A. T. (1983). Human skin battery potentials and their possible role in wound healing. *Br J Dermatol* 109, 515-522.

Fuchs, E., and Green, H. (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19, 1033-1042.

Gardner, S. E., Frantz, R. A., and Schmidt, F. L. (1999). Effect of electrical stimulation on chronic wound healing: a meta-analysis. *Wound Repair Regen* 7, 495-503.

Geras, A. J. (1990). *Dermatology: a medical artist's interpretation* (Sandoz Medical Publications, Sandoz Pharma Ltd), 139.

Grose, R., and Werner, S. (2004). Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Mol Biotechnol* 28, 147-166.



Guitard, M., Leyvraz, C., and Hummler, E. (2004). A nonconventional look at ionic fluxes in the skin: lessons from genetically modified mice. *News Physiol Sci* 19, 75-79.

Guo, A., Song, B., Reid, B., Gu, Y., Forrester, J. V., Jahoda, C. A., and Zhao, M. (2010). Effects of physiological electric fields on migration of human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 130, 2320-2327.

Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., and Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314-321.

Holmgren, M., Wagg, J., Bezanilla, F., Rakowski, R. F., De Weer, P., and Gadsby, D. C. (2000). Three distinct and sequential steps in the release of sodium ions by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Nature* 403, 898-901.

Holy, C. E., Shoichet, M. S., and Davies, J. E. (2000). Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period. *J Biomed Mater Res* 51, 376-382.

Hu, Y. K., and Kaplan, J. H. (2000). Site-directed chemical labeling of extracellular loops in a membrane protein. The topology of the Na,K-ATPase alpha-subunit. *J Biol Chem* 275, 19185-19191.

Hummler, E., Barker, P., Gatzky, J., Beermann, F., Verdumo, C., Schmidt, A., Boucher, R., and Rossier, B. C. (1996). Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet* 12, 325-328.

Jaffe, L. F., and Venable, J. W., Jr. (1984). Electric fields and wound healing. *Clin Dermatol* 2, 34-44.

James, P. F., Grupp, I. L., Grupp, G., Woo, A. L., Askew, G. R., Croyle, M. L., Walsh, R. A., and Lingrel, J. B. (1999). Identification of a specific role for the Na,K-ATPase alpha 2 isoform as a regulator of calcium in the heart. *Mol Cell* 3, 555-563.

Jasti, J., Furukawa, H., Gonzales, E. B., and Gouaux, E. (2007). Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* 449, 316-323.

Jenkins, L. S., Duerstock, B. S., and Borgens, R. B. (1996). Reduction of the current of injury leaving the amputation inhibits limb regeneration in the red spotted newt. *Dev Biol* 178, 251-262.

Jewell, E. A., and Lingrel, J. B. (1991). Comparison of the substrate dependence properties of the rat Na,K-ATPase alpha 1, alpha 2, and alpha 3 isoforms expressed in HeLa cells. *J Biol Chem* 266, 16925-16930.

Jhaveri, H. M., Chavan, M. S., Tomar, G. B., Deshmukh, V. L., Wani, M. R., and Miller, P. D., Jr. (2010). Acellular dermal matrix seeded with autologous gingival fibroblasts for the treatment of gingival recession: a proof-of-concept study. *J Periodontol* 81, 616-625.

Kaplan, J. H. (2002). Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem* 71, 511-535.

Katz, A. I. (1988). Role of Na-K-ATPase in kidney function. *Prog Clin Biol Res* 268B, 207-232.

Kawamura, M., and Nagano, K. (1984). Evidence for essential disulfide bonds in the beta-subunit of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 774, 188-192.

Kirley, T. L. (1990). Inactivation of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase by beta-mercaptoethanol. Differential sensitivity to reduction of the three beta subunit disulfide bonds. *J Biol Chem* 265, 4227-4232.

Klapka, N., and Muller, H. W. (2006). Collagen matrix in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 23, 422-435.

Koch, P. J., de Viragh, P. A., Scharer, E., Bundman, D., Longley, M. A., Bickenbach, J., Kawachi, Y., Suga, Y., Zhou, Z., Huber, M., Hohl, D., Kartasova, T., Jarnik, M., Steven, A. C., and Roop, D. R. (2000). Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein. *J Cell Biol* 151, 389-400.

L'Heureux, N., Dusserre, N., Konig, G., Victor, B., Keire, P., Wight, T. N., Chronos, N. A., Kyles, A. E., Gregory, C. R., Hoyt, G., Robbins, R. C., and McAllister, T. N. (2006). Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med* 12, 361-365.

L'Heureux, N., Paquet, S., Labbe, R., Germain, L., and Auger, F. A. (1998). A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 12, 47-56.

Laplante, A. F., Germain, L., Auger, F. A., and Moulin, V. (2001). Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *Faseb J* 15, 2377-2389.



Laprise, P., Lau, K. M., Harris, K. P., Silva-Gagliardi, N. F., Paul, S. M., Beronja, S., Beitel, G. J., McGlade, C. J., and Tepass, U. (2009). Yurt, Coracle, Neurexin IV and the Na(+),K(+)-ATPase form a novel group of epithelial polarity proteins. *Nature* 459, 1141-1145.

Lingrel, J. B., Van Huysse, J., O'Brien, W., Jewell-Motz, E., Askew, R., and Schultheis, P. (1994). Structure-function studies of the Na,K-ATPase. *Kidney Int Suppl* 44, S32-39.

Lutsenko, S., and Kaplan, J. H. (1993). An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase beta-subunit in cation occlusion. *Biochemistry* 32, 6737-6743.

Mauro, T., Guitard, M., Behne, M., Oda, Y., Crumrine, D., Komuves, L., Rassner, U., Elias, P. M., and Hummler, E. (2002). The ENaC channel is required for normal epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* 118, 589-594.

McBain, V. A., Forrester, J. V., and McCaig, C. D. (2003). HGF, MAPK, and a small physiological electric field interact during corneal epithelial cell migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 540-547.

Mescher, A. L., and Neff, A. W. (2005). Regenerative capacity and the developing immune system. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 93, 39-66.

Methot S., Moulin V., Rancourt D., Bourdages M., D., Goulet, M., Plante, F.A, Auger, and L., Germain (2001). Morphological Changes of Human Skin Cells Exposed to a DC Electric Field In Vitro Using a New Exposure System. *Can J Chem Eng* 79, 668-677.

Michel, M., L'Heureux, N., Pouliot, R., Xu, W., Auger, F. A., and Germain, L. (1999). Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35, 318-326.

Michel, M., Torok, N., Godbout, M. J., Lussier, M., Gaudreau, P., Royal, A., and Germain, L. (1996). Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci* 109 ( Pt 5), 1017-1028.

Morhenn, V. B., Murakami, M., O'Grady, T., Nordberg, J., and Gallo, R. L. (2004). Characterization of the expression and function of N-methyl-D-aspartate receptor in keratinocytes. *Exp Dermatol* 13, 505-511.

Nishimura, K. Y., Isseroff, R. R., and Nuccitelli, R. (1996). Human keratinocytes migrate to the negative pole in direct current electric fields comparable to those measured in mammalian wounds. *J Cell Sci* 109 ( Pt 1), 199-207.

Nuccitelli, R. (1992). Endogenous ionic currents and DC electric fields in multicellular animal tissues. *Bioelectromagnetics Suppl* 1, 147-157.

Obedencio, G. P., Nuccitelli, R., and Isseroff, R. R. (1999). Involucrin-positive keratinocytes demonstrate decreased migration speed but sustained directional migration in a DC electric field. *J Invest Dermatol* 113, 851-855.

Onuma, E. K., and Hui, S. W. (1988). Electric field-directed cell shape changes, displacement, and cytoskeletal reorganization are calcium dependent. *J Cell Biol* 106, 2067-2075.

Palasis, M., Kuntzweiler, T. A., Arguello, J. M., and Lingrel, J. B. (1996). Ouabain interactions with the H5-H6 hairpin of the Na,K-ATPase reveal a possible inhibition mechanism via the cation binding domain. *J Biol Chem* 271, 14176-14182.

Pantaloni, D., Le Clairche, C., and Carlier, M. F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science* 292, 1502-1506.

Pollard, T. D., and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.

Pullar, C. E., and Isseroff, R. R. (2005). Cyclic AMP mediates keratinocyte directional migration in an electric field. *J Cell Sci* 118, 2023-2034.

Pullar, C. E., Isseroff, R. R., and Nuccitelli, R. (2001). Cyclic AMP-dependent protein kinase A plays a role in the directed migration of human keratinocytes in a DC electric field. *Cell Motil Cytoskeleton* 50, 207-217.

Pummi, K., Malminen, M., Aho, H., Karvonen, S. L., Peltonen, J., and Peltonen, S. (2001). Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes. *J Invest Dermatol* 117, 1050-1058.

Raja, Sivamani, K., Garcia, M. S., and Isseroff, R. R. (2007). Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci* 12, 2849-2868.



Rajasekaran, S. A., Palmer, L. G., Moon, S. Y., Peralta Soler, A., Apodaca, G. L., Harper, J. F., Zheng, Y., and Rajasekaran, A. K. (2001). Na,K-ATPase activity is required for formation of tight junctions, desmosomes, and induction of polarity in epithelial cells. *Mol Biol Cell* 12, 3717-3732.

Reid, B., Song, B., McCaig, C. D., and Zhao, M. (2005). Wound healing in rat cornea: the role of electric currents. *Faseb J* 19, 379-386.

Serway, and Raymond, A. (1986). *Électricité et magnétisme*, Les Éditions HRW Ltée edn (Montréal),

Sheridan, D. M., Isseroff, R. R., and Nuccitelli, R. (1996). Imposition of a physiologic DC electric field alters the migratory response of human keratinocytes on extracellular matrix molecules. *J Invest Dermatol* 106, 642-646.

Shimkets, R. A., Warnock, D. G., Bositis, C. M., Nelson-Williams, C., Hansson, J. H., Schambelan, M., Gill, J. R., Jr., Ulick, S., Milora, R. V., Findling, J. W., and et al. (1994). Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 79, 407-414.

Snyder, P. M. (2002). The epithelial Na<sup>+</sup> channel: cell surface insertion and retrieval in Na<sup>+</sup> homeostasis and hypertension. *Endocr Rev* 23, 258-275.

Snyder, P. M., Cheng, C., Prince, L. S., Rogers, J. C., and Welsh, M. J. (1998). Electrophysiological and biochemical evidence that DEG/ENaC cation channels are composed of nine subunits. *J Biol Chem* 273, 681-684.

Song, B., Zhao, M., Forrester, J. V., and McCaig, C. D. (2002). Electrical cues regulate the orientation and frequency of cell division and the rate of wound healing in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13577-13582.

Sta Iglesia, D. D., and Vanable, J. W., Jr. (1998). Endogenous lateral electric fields around bovine corneal lesions are necessary for and can enhance normal rates of wound healing. *Wound Repair Regen* 6, 531-542.

Steven, James, and Stevens, Lowe Alan (1999). *Histologie (Saint-Hyacinthe (Québec) Edisem)*, 378.

Stichel, C. C., and Muller, H. W. (1998). The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier. *Cell Tissue Res* 294, 1-9.

- Tortora, Gerard J., and Grabowski, Sandra R. (1994). *Principes d'anatomie et de physiologie*, CEC edn (Anjou (Québec)), 1204.
- Trollinger, D. R., Isseroff, R. R., and Nuccitelli, R. (2002). Calcium channel blockers inhibit galvanotaxis in human keratinocytes. *J Cell Physiol* 193, 1-9.
- Vanable, J. W., Jr., Hearson, L. L., and McGinnis, M. E. (1983). The role of endogenous electrical fields in limb regeneration. *Prog Clin Biol Res* 110 Pt A, 587-596.
- Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Voilley, N., and Lazdunski, M. (1995). Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* 270, 27411-27414.
- Werner, S., and Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83, 835-870.
- Woo, A. L., James, P. F., and Lingrel, J. B. (2000). Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 275, 20693-20699.
- Woodcock-Mitchell, J., Eichner, R., Nelson, W. G., and Sun, T. T. (1982). Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 95, 580-588.
- Yamamura, H., Ugawa, S., Ueda, T., Nagao, M., and Shimada, S. (2008). Epithelial Na<sup>+</sup> channel delta subunit mediates acid-induced ATP release in the human skin. *Biochem Biophys Res Commun* 373, 155-158.
- Zhao, M., Pu, J., Forrester, J. V., and McCaig, C. D. (2002). Membrane lipids, EGF receptors, and intracellular signals colocalize and are polarized in epithelial cells moving directionally in a physiological electric field. *Faseb J* 16, 857-859.
- Zhao, M., Song, B., Pu, J., Wada, T., Reid, B., Tai, G., Wang, F., Guo, A., Walczysko, P., Gu, Y., Sasaki, T., Suzuki, A., Forrester, J. V., Bourne, H. R., Devreotes, P. N., McCaig, C. D., and Penninger, J. M. (2006). Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature* 442, 457-460.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., and Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13, 4279-4295.



