



Influence des facteurs neurotrophiques et des fibres nerveuses dans la peau reconstruite par génie tissulaire

Thèse

Mathieu Blais

Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire
Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Québec, Canada
© Mathieu Blais, 2013

Résumé

La peau est un organe densément innervé et vascularisé. L'établissement du réseau nerveux dépend de la sécrétion de signaux diffusibles dans la peau qui instruisent à distance certains neurones de s'y arboriser. Ces signaux sont les facteurs neurotrophiques. L'établissement du réseau vasculaire dépend aussi de la présence de signaux instructifs. Notre objectif général était de mieux comprendre l'influence des signaux neurotrophiques et aussi nerveux dans le contexte cutané. Les travaux présentés dans cette thèse décrivent de nouvelles interactions paracrines. Alors que certaines de ces interactions depuis la peau vers les neurones sensoriels et certaines depuis les neurones sensoriels vers le réseau vasculaire pour la vasodilatation sont déjà établies, nous décrivons l'influence des facteurs neurotrophiques sur le réseau vasculaire et l'influence des neurones sensoriels sur la réépithélialisation. Nous avons premièrement émis l'hypothèse qu'en plus d'influencer les neurones, les facteurs neurotrophiques influencent le réseau vasculaire. Nous montrons que le NGF, le BDNF, le NT-3 et le GDNF sont tous exprimés dans l'épiderme, que le NGF et le NT-3 sont exprimés par les fibroblastes et que le BDNF est produit par les cellules endothéliales. Les cellules de Schwann, également retrouvées dans la peau, produisent du NGF, BDNF et GDNF. Nous montrons que ces peptides sont de très puissants facteurs angiogéniques en utilisant un modèle de derme endothélialisé humain reconstruit par génie tissulaire. Une augmentation de 40 à 80 % du nombre de pseudocapillaires fut observée après l'addition de 10 ng/ml de NGF, 0,1 ng/ml de BDNF, 15 ng/ml de NT-3, et 50 ng/ml de GDNF. Cet effet angiogénique dépend de la liaison aux récepteurs de facteurs neurotrophiques TrkA, TrkB, GFRA-1 et c-ret, qui sont tous exprimés par les cellules endothéliales humaines. Cet effet a été bloqué pour les récepteurs Trk par l'addition de l'inhibiteur compétitif K252a. Ensuite, nous avons dans un deuxième temps émis l'hypothèse que les neurones sensoriels influencent directement la réépithélialisation. Pour vérifier cela, nous avons développé un nouveau modèle de réépithélialisation par génie tissulaire. Il est constitué d'un équivalent épidermique troué exprimant une protéine fluorescente verte qui a été empilé sur un équivalent dermique servant de substrat pour l'épiderme qui referme alors naturellement la plaie. L'équivalent est endothélialisé et innervé ou non par les neurones sensoriels de souris. Nous avons observé que la réépithélialisation est plus rapide en présence de neurones sensoriels. Nous avons démontré que les neurones sensoriels sécrètent une petite protéine dans notre modèle, soit de la substance P, et que les kératinocytes expriment le récepteur cellulaire NK1 de la substance P. Enfin, nous montrons que la substance P contribue à augmenter la vitesse de fermeture des plaies induites par les neurones à l'aide d'un agoniste et d'un antagoniste du récepteur NK1. L'ensemble des résultats procure une meilleure compréhension de l'importance des contextes neurotrophiques et nerveux dans la peau. Nos résultats pourraient laisser présager que d'améliorer la régénération nerveuse cutanée lorsqu'elle est déficiente améliorerait aussi l'homéostasie du tissu cutané.

Abstract

The skin is an organ densely innervated and vascularized. The establishment of the cutaneous nervous system depends on the secretion of neurotrophic factors by the skin. Meanwhile, the establishment of the vascular network also depends on soluble instructive cues. The work presented in this thesis describes new paracrine interactions. While interactions from skin to sensory neurons for the development of innervation and interactions from sensory neurons to blood vessel for vasodilation of the vasculature are described elsewhere, we demonstrate here the influence of neurotrophic factors on the vascular network and the influence of sensory neurons on the reepithelialization of wounds. Our overall goal was to clarify the influence of the neurotrophic and nervous contexts on the homeostasis of the skin. First, we hypothesized that in addition to their neuronal contribution, neurotrophic factors also influence the vascular network. We show that NGF, BDNF, NT-3 and GDNF are expressed in the epidermis, while NGF and NT-3 are expressed by fibroblasts and BDNF by endothelial cells. Finally, Schwann cells produce NGF, BDNF and GDNF. We show that these peptides are very potent angiogenic factors using a model of human endothelialized reconstructed dermis by tissue engineering. An increase of 40 to 80% of the number of capillary-like tubes was observed after the addition of 10 ng/ml NGF, 0.1 ng/ml of BDNF, 15 ng/ml of NT-3, and 50 ng/ml of GDNF. This angiogenic effect depends on the neurotrophic factor receptor TrkA, TrkB, GFRA-1 and c-ret that are all expressed by human endothelial cells. This effect was blocked by adding the Trk inhibitor K252a for NGF, BDNF and NT-3. Second, we hypothesized that sensory neurons directly influence reepithelialization by secreting the neuropeptide substance P. To verify this, we developed a new model of reepithelialization. It consists of a perforated epidermal equivalent expressing a green fluorescent protein stacked on a dermal equivalent that is used as a bed for reepithelialization. The reconstructed skin is endothelialized and innervated or not with sensory neurons of mouse. Sensory neurons produce substance P in the model and keratinocytes express the NK1 cell receptor for substance P. Keratinocyte migration was quantified by fluorescence. Reepithelialization was faster in presence of sensory neurons and we show that substance P contributes to this effect with agonist and antagonist of the NK1 cell receptor. The overall results provide a better understanding of the importance of the neurotrophic and sensory contexts in the skin. Thus, cutaneous innervation does not only contribute to the sensory detection. Our findings may suggest that improving nerve regeneration would improve skin long term tissue homeostasis.

Avant-Propos

Cette thèse contient 2 manuscrits qui seront soumis prochainement pour être publiés dans des journaux scientifiques. En plus de cela, des manuscrits déjà publiés et une revue de la littérature soumise dans le cadre de mon doctorat ont été annexés pour consultation.

Les travaux présentés dans cette thèse n'existeraient pas sans mon directeur de recherche, Dr François Berthod. Sous sa direction, j'ai véritablement aimé faire de la recherche. J'aimerais exprimer ici ma plus sincère reconnaissance pour sa direction avisée, pour les opportunités offertes, pour son optimisme indéfectible qui m'a amené à devenir indépendant et à trouver des solutions, pour sa confiance, pour son support en toute circonstance et pour m'avoir permis de connaître les meilleurs aspects de la recherche.

J'aimerais aussi remercier immensément les examinateurs de ma thèse, Dre Roxane Pouliot, Dr Jacques Huot et Dr Jean-François Bouchard pour l'intérêt porté à mes travaux et pour leur travail.

Merci à tous les chercheurs du LOEX avec qui j'ai eu la chance de discuter et à ceux qui m'ont aidé par leurs commentaires.

Merci aux organismes subventionnaires qui ont permis la réalisation de mes études, en particulier le Fonds de Recherche en Santé du Québec.

Merci au Dr François Auger et Lucie Germain d'avoir créé le LOEX, un centre de recherche unique et essentiel pour la recherche en génie tissulaire.

J'aimerais remercier Vicky Gagnon, Anne-Marie Moisan, Myriam Grenier et Marie-Anne Germain pour leur aide ou leur assistance technique et leur amitié.

Merci à Sébastien Cadeau et Sabrina Bellenfant, pour les discussions, leur amitié et pour le nombre incalculable d'heures que nous avons passé ensemble sous le microscope à extraire des neurones.

Merci à Rémi Parenteau-Bareil pour les discussions techniques, pour l'aide spontanée qu'il m'a souvent offerte, pour son amitié et pour l'ambiance toujours décontractée qu'il instaurait dans le bureau.

Merci à Jean-Michel Bourget et Olivier Rochette pour les discussions et l'assistance au Time-Lapse.

J'aimerais aussi remercier Lorène Mottier pour sa contribution lorsqu'elle est arrivée sur la fin de mes travaux.

Merci aux assistants de recherche, qui m'ont conseillé et aidé dans mes expériences : Rina Guignard, Nathalie Tremblay, Valérie Trottier, Claudia Fugère, Véronique Racine, Sébastien Larochelle, Israël Martel, Geneviève Bernard, Cindy Perron Amélie Lavoie, Todd Galbrait, Marie-France Champigny et les autres.

Merci au centre d'imagerie cellulaire de l'hôtel-Dieu de Québec, au Dr Norman Marceau et à la Dre Anne Loranger pour l'utilisation de microscopes confocales.

Merci à Richard Janvier de la plate-forme d'imagerie moléculaire et microscopie pour son savoir-faire au microscope électronique.

Enfin une mention spéciale à Patricia, mon amour. Elle est avec moi depuis le début et elle m'a soutenu à travers les échecs et les succès. Merci pour les 2 bébés qui me font vivre les vrais bonheurs de la vie.

J'aimerais aussi remercier ma famille pour leur support et leur compréhension, en particulier mes parents Johanne et David, merci pour tout votre soutien et votre amour.

Durant mes études au LOEX, j'ai évolué au niveau de mes idées et au plan personnel. Ma recherche fut autant scientifique que personnelle.

L'enfer, c'est les autres. Jean-Paul Sartre.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Avant-Propos.....	vii
Table des matières	xi
Liste des tableaux.....	xv
Liste des figures.....	xvii
Liste d'abréviations	xix
1 Introduction.....	1
1.1 La peau.....	1
1.1.1 L'épiderme.....	2
1.1.1.1 La cohésion de l'épiderme.....	2
1.1.1.1.1 L'adhésion de l'épiderme au derme.....	3
1.1.1.1.2 L'adhésion des kératinocytes entre eux	3
1.1.1.2 La couche basale.....	5
1.1.1.3 La couche épineuse.....	6
1.1.1.4 La couche granuleuse.....	6
1.1.1.5 La couche cornée	9
1.1.2 Le derme	9
1.1.3 La matrice extracellulaire du derme	10
1.1.4 La jonction dermo-épidermique.....	11
1.1.5 L'hypoderme.....	12
1.1.6 La guérison des plaies : vue d'ensemble	12
1.1.7 La réépithélialisation.....	14
1.2 Le réseau microvasculaire de la peau	16
1.2.1 Les types de vaisseaux sanguins.....	16
1.2.2 Le réseau microvasculaire cutané	18
1.2.3 L'endothélium.....	19
1.2.3.1 L'adhésion et les jonctions intercellulaires de l'endothélium	20
1.2.4 Les cellules murales.....	21
1.2.5 La membrane basilaire vasculaire.....	21
1.2.6 Formation de vaisseaux sanguins	22
1.2.6.1 La vasculogénèse	22
1.2.6.2 L'angiogénèse.....	24
1.3 Le réseau nerveux sensoriel cutané	27
1.3.1 Le système nerveux périphérique	27
1.3.2 Organisation du système nerveux périphérique somatique sensoriel	28
1.3.3 L'innervation sensorielle somatique cutanée.....	30

1.3.4	Les neurones sensoriels.....	31
1.3.5	Les types de fibres nerveuses cutanées	33
1.3.6	Les neuropeptides.....	34
1.3.7	La détection sensorielle somatique	35
1.3.8	Les récepteurs sensoriels cutanés.....	36
1.3.8.1	Les mécanorécepteurs	36
1.3.8.2	Les thermorécepteurs	38
1.3.8.3	Les nocicepteurs.....	39
1.3.9	Bases moléculaires de la détection sensorielle.....	40
1.3.9.1	Le potentiel de membrane et la dépolarisation neuronale.....	40
1.3.9.2	Les protéines servant à la détection sensorielle	42
1.3.10	Les cellules de Schwann	43
1.3.10.1	La membrane basilaire des cellules de Schwann	44
1.3.10.2	La gaine de myéline	45
1.3.10.3	La formation de la gaine de myéline.....	46
1.3.11	Développement embryonnaire du système nerveux.....	47
1.3.11.1	La spécification neurale	48
1.3.11.2	Les cellules de la crête neurale.....	49
1.3.11.3	Formation des ganglions de la racine dorsale	49
1.3.11.3.1	Différenciation en neurones sensoriels.....	50
1.3.11.3.2	Différenciation en cellules de Schwann	51
1.3.11.4	Mécanismes de croissance des fibres nerveuses	51
1.3.12	La régénération nerveuse cutanée	52
1.4	Similarités des réseaux nerveux et microvasculaires	54
1.4.1	Signaux instructifs influençant les réseaux nerveux et vasculaires.....	54
1.4.1.1	Les récepteurs du VEGF et leurs ligands	55
1.4.1.2	Neuropilines, plexines et sémaphorines.....	56
1.4.1.3	Les récepteurs éphrines et Eph.....	57
1.4.1.4	Les nétrines et leurs récepteurs UNC5 et DCC.....	58
1.4.2	Les facteurs neurotrophiques et leurs récepteurs	59
1.4.2.1	Les neurotrophines	59
1.4.2.1.1	Les récepteurs des neurotrophines.....	59
1.4.2.1.2	Le NGF	62
1.4.2.1.3	Le BDNF	63
1.4.2.1.4	Le NT-3	64
1.4.2.2	Le GDNF.....	65
1.5	Influence de l'innervation sensorielle sur l'homéostasie cutanée.....	67
1.5.1	Mécanisme de l'influence de l'innervation sensorielle sur la peau	68
1.5.2	Effet des neuropeptides dans la peau	69
1.5.2.1	La substance P et les tachykinines	69
1.5.2.2	Le calcitonin gene related peptide.....	70
1.5.2.3	Le VIP et PACAP	70
1.6	La médecine régénérative et le génie tissulaire.....	72
1.6.1	Les équivalents cutanés.....	72
1.6.1.1	Les équivalents épidermiques	72
1.6.1.2	Les équivalents avec derme et épiderme.....	73
1.6.1.3	La reconstruction du compartiment dermique	73

1.6.1.3.1	Les gels.....	74
1.6.1.3.2	Les biomatériaux.....	74
1.6.1.3.3	L'autoassemblage.....	75
1.6.2	Modèles d'études issus du génie tissulaire.....	75
1.6.2.1	Les modèles de réépithélialisation.....	76
1.6.2.2	Les modèles pour étudier l'angiogenèse.....	77
1.6.2.3	Les modèles pour étudier les réseaux nerveux.....	78
1.6.3	Les cellules souches pour le génie tissulaire.....	79
1.6.3.1	Les cellules souches de la peau.....	80
1.6.3.1.1	Les cellules souches des tissus adipeux.....	81
1.6.3.2	L'intérêt d'avoir des cellules de Schwann humaines pour le génie tissulaire grâce aux cellules souches stromales des tissus adipeux.....	81
1.7	Problématiques du projet de recherche.....	83
2	Les facteurs neurotrophiques NGF, BDNF, NT-3 et GDNF augmentent l'angiogenèse in vitro.....	87
2.1	Résumé.....	89
2.2	NGF, BDNF, NT-3 and GDNF enhance angiogenesis in vitro.....	91
Abstract.....		92
Introduction.....		93
Materials and methods.....		95
Results.....		100
Discussion.....		113
Acknowledgments.....		117
References.....		118
Supplemental material.....		121
3	L'innervation cutanée sensorielle accélère la réépithélialisation par libération de substance P dans un modèle de peau reconstruit par génie tissulaire.....	125
3.1	Résumé.....	127
3.2	Sensory neurons accelerate reepithelialization via Substance P in a new innervated and endothelialized tissue-engineered model of reconstructed wounded skin. ...	129
Abstract.....		130
Introduction.....		131
Material and methods.....		133
Results.....		138
Discussion.....		148
References.....		151
Supplemental material.....		154
4	Discussion générale.....	157
4.1	Contextualisation aux communications paracrines cutanées.....	157
4.1.1	Les facteurs neurotrophiques NGF, BDNF, NT-3 et GDNF sont produits dans la peau et ils induisent l'angiogenèse in vitro.....	158

4.1.2	Les fibres sensorielles influencent la réépithélialisation par leur production de Substance P	163
4.2	Implications et perspectives	165
4.2.1	Modèles issus du génie tissulaire comme modèle d'étude.....	165
4.2.2	Lien entre les neuropeptides et les facteurs neurotrophiques.....	166
4.3	Conclusion générale	169
5	Bibliographie.....	171
1	Annexe 1 : L'ajout de cellules de Schwann dans les peaux reconstruites favorise la régénération nerveuse.....	235
1.1	Résumé.....	237
1.2	Improvement of nerve regeneration in a tissue-engineered skin enriched with Schwann cells.....	239
Abstract	240
Introduction	241
Material and methods	243
Results	248
Discussion	256
Acknowledgements	259
References	260
2	Annexe 2 : Peau reconstruite par génie tissulaire et régénération nerveuse après un traitement pour brûlure	263
2.1	Résumé.....	265
2.2	Tissue-engineered skin and nerve regeneration in burn treatment.....	267
Characteristics and treatment of burn injuries.....	269	
Challenge of tactile and sensory recovery.....	270	
Basic principles in the development of a tissue-engineered skin.....	271	
Our approach to enhance cutaneous nerve regeneration.....	272	
Potential in the use of patient's stem cells to produce Schwann cells and/or hair follicles.....	276	
Conclusion.....	279	
Acknowledgments.....	280	
References.....	281	
3	Annexe 3 : Le réseau vasculaire guide la migration des précurseurs neuronaux dans le cerveau adulte antérieur des mammifères par l'intermédiaire du BDNF.	287
3.1	Résumé.....	289
3.2	Vasculature Guides Migrating Neuronal Precursors in the Adult Mammalian Forebrain via Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling	291
Abstract	292
Introduction	293
Materials and Methods	295
Results	303
Discussion	335
Acknowledgement	340
References	341

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Caractéristiques de deux populations de fibres C.....	34
Tableau 1-2 : Les récepteurs sensoriels cutanés.	39
Tableau 1-3. Le NGF influence l'angiogenèse.....	64
Tableau 2-1 : Release of NGF, BDNF, NT3 and GDNF by epidermis and fibroblasts, endothelial cells, Schwann cells and neurons.	102
Tableau 2-2. Relative phosphorylation level of intracellular protein in HDMEC stimulated with neurotrophic factors.	112

Liste des figures

Figure 1-1. Représentation de la peau humaine avec ses trois couches et ses principales annexes.....	1
Figure 1-2. Protéines impliquées dans le maintien de cohésion de l'épiderme.....	4
Figure 1-3. Représentation des différentes couches de différenciation de l'épiderme (A) et de la chronologie du processus de formation de l'enveloppe cornée (B).....	8
Figure 1-4. Vue d'ensemble du processus de guérison des plaies.....	13
Figure 1-5. Illustration de la microvascularisation cutanée, de la structure des gros vaisseaux sanguins et des microvaisseaux.....	17
Figure 1-6. L'angiogenèse peut se faire par différents mécanismes.....	24
Figure 1-7. Angiogenèse par intussusception. Légendes : Pr : péricytes; EC: cellules endothéliales; Fb: fibroblastes; Co : collagène.....	26
Figure 1-8. Représentation schématique de la moelle épinière, d'un nerf et des circuits neuronaux relatifs aux DRG à l'interface des SNP et SNC.....	29
Figure 1-9. Neurone sensoriel du SNP.....	32
Figure 1-10. Représentation de divers types de récepteurs sensoriels dans la peau.....	37
Figure 1-11. Schéma du cycle des ions sodium et potassium durant la dépolarisation neuronale (A) et illustration des mouvements ioniques à la membrane neuronale lors d'une dépolarisation pour les fibres myélinisées et non myélinisées (B).....	40
Figure 1-12. Illustration de certains récepteurs TRP impliqués dans la thermoception ainsi que la nociception et identification de composés naturels pouvant les activer.....	42
Figure 1-13. Les différentes spécialisations des cellules de Schwann.....	44
Figure 1-14. Représentation de la gaine de myéline d'un axone sur une coupe longitudinale et représentation des protéines structurantes.....	46
Figure 1-15. Formation du tube neural et migration des cellules de la crête neurale.....	48
Figure 1-16. Influence du BMP, de Wnt et du Shh sur la formation du tube neural dans l'axe dorso-ventral.....	49
Figure 1-17. Influences croisées des facteurs de transcriptions Ngn1 et Ngn2 sur l'expression des récepteurs aux facteurs neurotrophiques TrkA, B et C, Ret et Met par les neurones sensoriels.....	50
Figure 1-18. Les ligands VEGF et sémaphorines ainsi que leurs récepteurs.....	56
Figure 1-19. Représentation schématique des récepteurs des neurotrophines et de leur signalisation.....	61
Figure 1-20. La famille de ligands du GDNF et leurs récepteurs.....	66
Figure 2-1. NGF, BDNF, NT-3 and GDNF expression in human skin.....	101

Figure 2-2. Neurotrophic factors induced a significative dose-dependant increase in CLT formation by HUVEC and HDMEC	105
Figure 2-3. The maximum depth of migration of the CLT was increased by the addition of neurotrophic factors in the culture medium.	107
Figure 2-4. Human endothelial cells express TrkA, TrkB, p75, GFR α -1 and c-ret.....	109
Figure 2-5. Neurotrophic factors did not promote endothelial cell proliferation.....	123
Figure 3-1. Histological aspect of the model.	139
Figure 3-2. Neurite and capillary-like-tube outgrowth in the iWHM and WHM.	142
Figure 3-3. Influence of sensory neurons, SP and the NK1 antagonist Spantide II on the reepithelialisation process in vitro.....	145
Figure 3-4. Influence of sensory neurons, SP and NK1 antagonist Spantide II on the reepithelialisation process in vivo.	147
Figure 3-5. Schematic representation of the preparation of the WHM and iWHM.....	154
Figure 3-6. Influence of sensory neurons, SP and NK1 antagonist Spantide II on the rate of the reepithelialization process and radiant efficiency in the wound area in vitro.	155
Figure 3-7. Influence of sensory neurons and antagonist of NK1 on the rate and radiant efficiency of the reepithelialization process in vivo.....	156
Figure 4-1. Communications paracrines entre les fibres sensorielles, les cellules cutanées et les capillaires.	157

Liste d'abréviations

ACE : *angiotensin-converting enzyme*
ADN : *acide désoxyribonucléique*
ALK : *activin receptor-like kinase*
AMPc : *adénosine monophosphate cyclique*
ASC : *adipose-derived stem/stromal cells*
BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*
BMP : *bone morphogenetic proteins*
BMPER : *bone morphogenetic protein BMP-binding endothelial cell precursor-derived regulator*
BRDU : *bromodéoxyuridine*
BRN2 : *brain 2 class III POU domain protein*
CAM : *chorioallantoïc membrane* / membrane chorioallantoïque
CB : *couche basale*
CC : *couche cornée*
CE : *cellule endothéliale*
CÉ : *couche épineuse*
CG : *couche granuleuse*
CGRP : *calcitonin-gene-related-peptide*
CLT : *capillary-like tubes* / pseudo-capillaires
CMLV : *cellule musculaire lisse vasculaire*
CRLR : *calcitonin receptor-like receptor*
CS : *cellules de schwann*
Cx32 : *connexine 32*
DCC : *deleted in colorectal cancer*
Dil : *delta-like*
DRG : *spinal cord dorsal root ganglia* / ganglions des racines dorsales de la moelle épinière
DHH : *desert hedgehog*
EDTA : *ethylenediaminetetraacetic acid* / acide éthylène diamine tétraacétique
EGF : *epidermal growth factor*
ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*
Eph : *ephrin (receptor)*
Dsc : *desmocolline*
Dsg : *desmogléine*
FAK : *focal adhesion kinase*
FN : *facteur neurotrophique*
FGF : *fibroblast growth factor*
FGFR1 : *fibroblast growth factor receptor-1*
GDNF : *glial-derived neurotrophic factor*
Il-1 : *interleukin-1*
iWHM : *innervated wound healing model*
JDE : *jonction dermo-épidermique*
HDMEC : *human dermal microvascular endothelial cells*
HGF : *hepatocyte growth factor*
HUVEC : *human umbilical vein endothelial cells* / cellules endothéliales de cordons ombilicaux
IHH : *indian hedgehog*
iPS : *induced pluripotent stem cells*
MEC : *matrice extracellulaire*
MET : *microscopie électronique à transmission*

MBP : myelin basic protein
MMP : matrix metalloprotease / métalloprotéinases
MW : molecular weight
N-CAM : neural cellular adhesion molecule
Necl : nectin-like
NEP : neutral endopeptidase
NFM : neurofilament
NGF : nerve growth factor
Ngn : neurogenin
NK : neurokinin
NRG1-III : neurégulin 1 de type III
NRP : neuropilline
NT : neurotrophin
NT-3 : neurotrophin-3
Oct6 : octamer-binding transcription factor 6
PACAP : pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
PAL-E : pathologische anatomie leiden-endothelium
PBS : phosphate-buffered saline
PDGF : platelet derived growth factor
PECAM-1 : platelet-endothelial cellular adhesion molecule-1
PGP9.5 : ubiquitin hydrolase protein gene product 9.5
PLGF : placental growth factor
p75^{NTR} : neurotrophin receptor p75
PVP : plexus vasculaire profond
PVS : plexus vasculaire superficiel
SP : substance p
RAMP : receptor activity modifying protein
Robo : roundabout
RPL : relative phosphorylation level
RS : récepteurs sensoriels
SEMA3A : sémaphorine 3A
SKP : skin-derived precursor cells
SHH : sonic hedgehog
SMA : smooth muscle actin
SNC : système nerveux central
SNP : système nerveux périphérique
SST : somatostatine
SPR : small proline-rich protein
TG : transglutaminase
TGF-β : transforming growth factor-beta
Trk : tropomyosin-related kinase
TRP : transient receptor potential
UNC : uncoordinated
UV : ultraviolet
VE-cadherin : vascular endothelial-cadherin
VEGF : vascular endothelial growth factor
VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor
VIP : vasoactive intestinal peptide
vWF : von willebrand factor
WHM : wound healing model
YY1 : Yin Yang 1

1 Introduction

1.1 La peau

La peau est l'organe le plus étendu du corps humain. Avec une surface de 1,5 à 2 m² et une épaisseur variant de 1,5 à 4 mm, elle représente environ 7 % de la masse corporelle [1]. C'est aussi l'organe le plus visible, le plus accessible. Du fait de l'évidence de la peau, on oublie parfois son importance. En effet, la peau forme une barrière résistante et imperméable qui protège, prévient la déshydratation et élimine certains déchets. Nourrie par son réseau microvasculaire, la peau est également l'organe du toucher et elle est la cible principale de l'innervation somatique sensorielle. Avant de préciser ces aspects, il convient d'abord de présenter la peau dans son ensemble. Elle est composée d'un épithélium superficiel, l'épiderme; d'un tissu conjonctif, le derme; ainsi que de réseaux vasculaires et nerveux. Elle comprend par ailleurs l'hypoderme adipeux, le réseau lymphatique et les glandes sudoripares et sébacées.

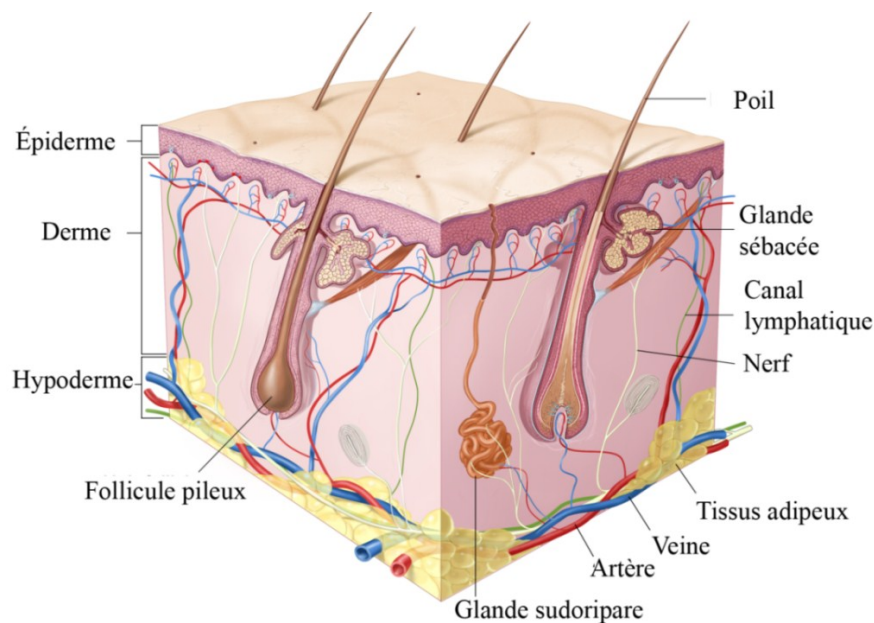


Figure 1-1. Représentation de la peau humaine avec ses trois couches et ses principales annexes.

Modifiée de [2].

1.1.1 L'épiderme

L'épiderme est la barrière protectrice superficielle de la peau. Son épaisseur varie de 40 à 700 μm , selon l'emplacement, pour une moyenne de 100 μm [3, 4]. Il forme des crêtes dans le derme qui augmentent sa surface d'attachement. L'épiderme est constitué de kératinocytes à presque 90 %. Ces derniers forment un épithélium pavimenteux de cellules superposées. L'épiderme est divisé en plusieurs couches. La couche basale (CB), qui repose sur le derme, les couches épineuse (CÉ) et granuleuse (CG) et enfin la couche cornée (CC) plus superficielle. On distingue ces couches d'après le niveau de différenciation des kératinocytes. La différenciation des kératinocytes se termine dans la CC et elle aboutit à la formation d'une enveloppe protectrice externe appelée enveloppe cornée.

Les kératinocytes synthétisent des protéines fibreuses appelées kératines. Elles représentent la majeure partie des protéines de l'épiderme. Les kératines sont des composantes essentielles du cytosquelette de filaments intermédiaires des kératinocytes. Elles sont essentielles, car elles contribuent au maintien de la forme cellulaire et à l'ancrage des organites. De plus, les kératines contribuent largement à la résistance mécanique de la peau (section 1.1.1.1). Le type de kératines produites dans l'épiderme évolue avec la différenciation des kératinocytes. Les prochaines sections décrivent les aspects structuraux assurant la cohésion de l'épiderme de même que ses différentes couches de différenciation.

1.1.1.1 La cohésion de l'épiderme

Dans l'épiderme et les autres tissus, des protéines d'adhésion comme les intégrines permettent l'attachement des cellules. Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires. Elles peuvent lier certaines protéines extracellulaires organisées en réseau servant de charpente aux tissus, soit la matrice extracellulaire (MEC). Les intégrines sont formées d'une paire spécifique de sous-unités α et β . Selon leurs combinaisons, elles lient des éléments distincts de la MEC. Les intégrines influencent différents processus intracellulaires par leur domaine cytoplasmique lorsqu'elles sont liées à leurs ligands [5]. Des points d'interactions particuliers avec le cytosquelette d'actine, appelés points focaux d'adhésion, sont parfois établis lorsque plusieurs intégrines sont regroupées. Parmi les

intégrines retrouvées sur les kératinocytes, citons les intégrines $\alpha V\beta 3$, $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ qui lient la laminine-5, une composante de la MEC [6, 7].

En plus des intégrines, des complexes protéiques d'adhésion plus spécifiques contribuent à la cohésion de l'épiderme. Certains de ces complexes, les hémidesmosomes, ancrent la portion basale de l'épiderme dans une membrane basilaire localisée à la jonction dermo-épidermique (JDE). D'autres complexes, les desmosomes, attachent les kératinocytes entre eux (Figure 1-2).

1.1.1.1.1 L'adhésion de l'épiderme au derme

L'ancrage des kératinocytes de la CB à la JDE dépend des hémidesmosomes. Ces complexes comprennent les kératines 5 et 14 du cytosquelette. Elles sont jointes à la protéine BPAG1 sur une structure en plaque. Cette structure est située à la membrane cellulaire du côté basal (Figure 1-2) [8]. L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ transmembranaire est associée à cette structure. La fonction de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est d'attacher les hémidesmosomes à une protéine de la JDE, soit la laminine-5 [9, 10]. Liée par l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ de l'hémidesmosome, la laminine-5 est un des constituants de la MEC de la JDE. Elle est elle-même jointe à un autre constituant de la MEC de la JDE, le collagène VII. Enfin, un collagène transmembranaire de type XVII joint aussi l'hémidesmosome à la JDE (Figure 1-2). Le collagène sera abordé à la section 1.1.2.1.

1.1.1.1.2 L'adhésion des kératinocytes entre eux

Des complexes multiprotéiques appelés desmosomes ancrent les kératines aux contacts kératinocyte-kératinocyte. Les desmosomes contiennent différents variants de protéines d'attachement de la famille des cadhérines. L'attachement des cadhérines dépend de liaisons aux ions Ca^{2+} . Cette liaison modifie sa conformation et lui permet de fixer une autre cadhérine [11]. Étant donné l'importance des ions calcium pour l'attachement cellulaire, un agent chélateur appelé acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) peut être utilisé pour obtenir expérimentalement un détachement cellulaire [11, 12].

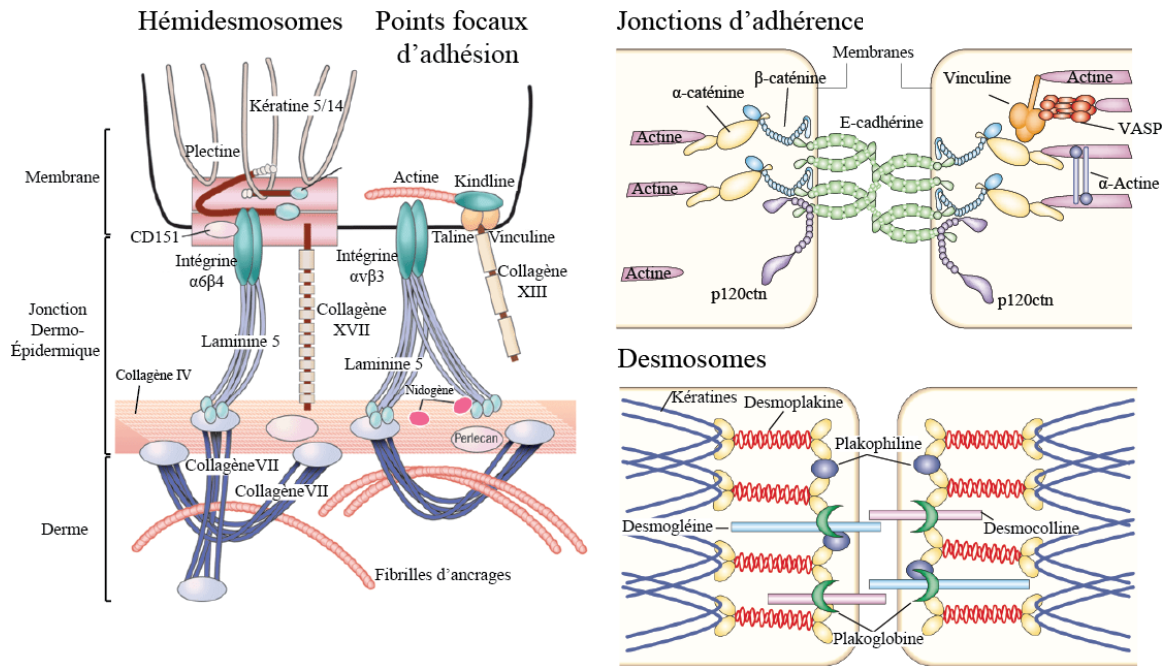


Figure 1-2. Protéines impliquées dans le maintien de cohésion de l'épiderme. Modifiée de [19-21].

Les cadhérines des desmosomes comprennent différents variants des protéines desmogléines (Dsg) et desmocollines (Dsc). Les variants retrouvés dépendent du niveau de différenciation des kératinocytes (Figure 1-2) [13-16]. En outre, la Dsg2 et la Dsc2 ne sont généralement présentes que dans la CB. La Dsg3 et la Dsc3, qui sont présentes dans les kératinocytes basaux et immédiatement suprabasaux, disparaissent progressivement alors qu'apparaissent les Dsg1 et Dsc1 dont l'expression culmine dans la CG [17]. Les cadhérines sont liées à d'autres protéines formant une structure en plaque, dont la plakophiline et la plakoglobine [15, 18]. Enfin, les desmosomes sont attachés aux kératines par l'intermédiaire de la desmoplakine [19].

En plus des desmosomes, un autre type de structure appelée jonction d'adhérence attache le cytosquelette d'actine des kératinocytes adjacents. Cet attachement est fait par l'intermédiaire de l' α -caténine, qui est complexée à la β -caténine. La composante transmembranaire du complexe multiprotéique des jonctions d'adhérence est l'E-cadhérine (Figure 1-2) [20].

En plus de leur rôle structurant, les hémidesmosomes, les intégrines, les desmosomes et les jonctions d'adhérence participent au contrôle de la prolifération, de la migration et de la différenciation des kératinocytes de l'épiderme en influençant les processus intracellulaires contrôlant l'expression et l'activité de différentes protéines [20-22].

1.1.1.2 La couche basale

Les kératinocytes de la CB sont cuboïdes, allongés vers la surface et polarisés; le noyau est du côté basal et plusieurs composantes cellulaires sont distribuées de façon non symétrique (Figure 1-3). Les kératinocytes de la CB expriment les kératines 5 et 14. Cependant, ces kératines seront progressivement remplacées par les kératines 1 et 10 dans les autres couches [23, 24].

La CB contient surtout des cellules prolifératives, dont 10 % de cellules souches [25]. Celles-ci ont un cycle cellulaire lent, une très grande capacité proliférative et permettent de renouveler l'épiderme [26]. Dans la peau sans poil, les cellules souches épidermiques sont localisées au fond des crêtes au plus profond de l'épiderme [26, 27] et aussi au sommet des crêtes épidermiques [6, 28, 29]. Dans la peau velue, elles sont aussi présentes dans la région du renflement des follicules pileux [30-37]. Lorsque les cellules de la CB cessent de proliférer et qu'il y a perte du contact avec la membrane basale, elles s'engagent irréversiblement vers la différenciation terminale et se retrouvent dans la CÉ [6].

L'épiderme est directement exposé au rayonnement ultraviolet (UV) nocif en provenance du soleil. Un type cellulaire particulier, le mélanocyte, aide à en protéger la peau. Les mélanocytes sont des cellules dendritiques de la CB qui produisent la mélanine, un pigment qu'elles transfèrent aux autres cellules. La mélanine absorbe les UV pouvant notamment endommager le matériel génétique et elle absorbe les radicaux libres engendrés par les UV sur la membrane lipidique [38-41]. La CB contient également des cellules de Langerhans qui participent à la défense immunitaire. Enfin, la CB contient des cellules de Merkel qui contribuent à la détection des stimuli sensoriels (section 1.3.8.1).

1.1.1.3 La couche épineuse

La CÉ tire son nom des nombreuses formes d'épines observées en microscopie optique. Ces épines sont des desmosomes. Les kératinocytes de la CÉ sont polyédriques. Ils ont généralement 3 à 4 assises cellulaires et ils peuvent en avoir 5 à 6 dans la peau plus épaisse comme la plante des pieds. Ils s'aplatissent près de la partie supraépineuse (Figure 1-3). Ces kératinocytes débutent leur différenciation. Elle est influencée par des signaux extracellulaires et par une augmentation progressive de la concentration de calcium dans le cytosol. Tous ces facteurs influencent l'organisation des desmosomes et du cytosquelette, induisent le transfert vers la membrane de plusieurs protéines, activent une cascade d'événements intracellulaires. C'est le début de la formation de l'enveloppe protectrice cornée [42-46].

Parmi les changements observés dans la CÉ, le nombre de desmosomes augmente et certains lipides, les kératines 1 et 10 et les transglutaminases (TG) 1, 3 et 5 sont exprimés [13, 47]. Les TG sont des enzymes qui catalysent la création de liaisons covalentes formant des agrégats de protéines insolubles. L'activité enzymatique des TG débutera ensuite dans la CG [48]. Une de leurs cibles sera notamment l'involucrine, une composante de l'enveloppe cornée dont l'expression débute également dans la CÉ [49, 50]. Enfin, on trouve également l'expression d'envoplakine et de périplakine, des protéines qui seront subséquentement liées entre elles, aux desmosomes et aux kératines [51, 52].

1.1.1.4 La couche granuleuse

Les kératinocytes de la couche granuleuse contiennent des granulations. Ces granules correspondent à des grains de kératohyalines. Ils contiennent notamment la profilaggrine, le précurseur de la filaggrine, qui regroupera les filaments de kératines et induira l'aplatissement cellulaire dans la CC. Ils contiennent aussi de la loricrine, une protéine insoluble qui constituera 70% à 85% de la masse en protéines de la CC (Figure 1-3) [53]. De plus, les kératinocytes de cette couche ont des vésicules appelées corps lamellaires, ou kératinosomes, en provenance de l'appareil de Golgi. Ils contiennent des protéases qui participent entre autres au processus de différenciation. Ils contiennent aussi des molécules imperméabilisantes telles que des précurseurs des ω -hydroxycéramides, d'autres céramides, des acides gras, du cholestérol et des esters [54]. Enfin, les kératinocytes de la CG

présentent des jonctions serrées latérales (Figure 1-3) [55]. Ces complexes multiprotéiques comprennent les protéines claudines et occludines et ils participent à la fonction barrière de la peau [56].

C'est dans la CG que la majeure partie de l'enveloppe cornée est assemblée (Figure 1-3). Pour que cela soit possible, les kératinocytes de cette couche ont une intense activité enzymatique. Ils dégradent aussi leurs organelles et leurs noyaux [57]. Ainsi, la différenciation des kératinocytes est similaire au processus classique de mort cellulaire programmée, soit l'apoptose. Mais c'est un processus distinct [58-62]. En outre, on peut distinguer une couche supplémentaire, entre la CG et la CC, nommée couche claire et correspondante à la zone de la CG où les kératinocytes perdent leurs noyaux. Elle est généralement visible dans la peau épaisse de la paume des mains et de la plante des pieds.

La formation de l'enveloppe cornée implique non seulement l'imperméabilisation, mais également l'agrégation de protéines en amas insolubles. L'activation de TG1 et TG5 réticulent l'envoplakine et la périplakine aux desmosomes ainsi que sous la membrane plasmique ce qui contribue à cette agrégation (Figure 1-3) [54]. À ce stade de la formation de l'enveloppe cornée, il y a également fixation covalente de certains lipides. De plus, la TG3 et la TG1 réticulent la loricine aux desmosomes et à de petites protéines riches en proline (*small proline-rich protein*; SPR). Parallèlement à cela, les lipides des kératosomes sont attachés et réticulés par la TG5 et la TG1 sur les protéines déjà réticulées (envoplakines, périplakines, involucrines, desmosomes). Elles sont exposées à l'extérieur de la membrane, formant l'enveloppe lipidique [63]. La dernière phase de la formation de l'enveloppe cornée aura ensuite lieu dans la couche cornée.

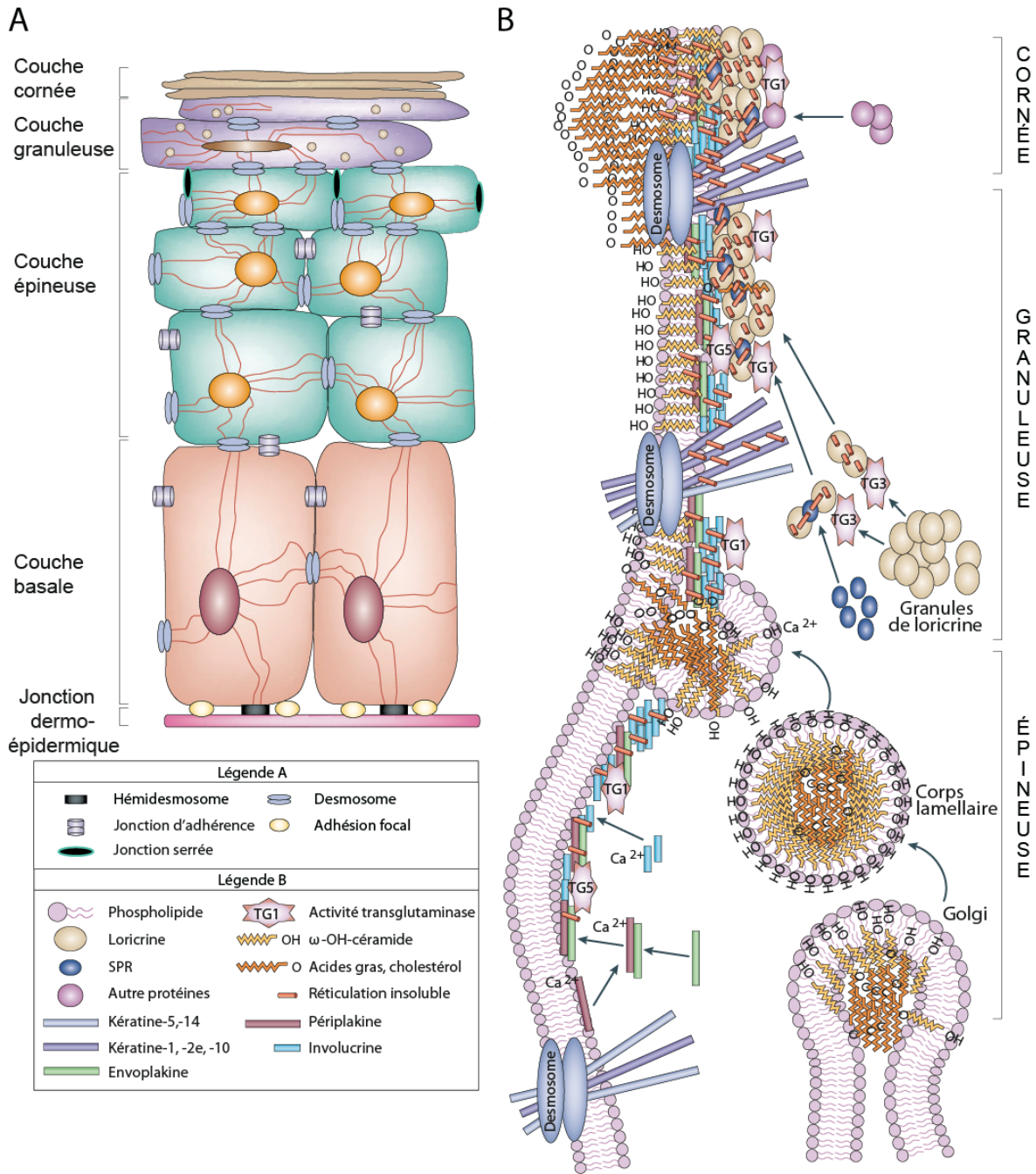


Figure 1-3. Représentation des différentes couches de différenciation de l'épiderme (A) et de la chronologie du processus de formation de l'enveloppe cornée (B).
 Modifiée de [54, 64].

1.1.1.5 La couche cornée

La CC contient 20 à 30 assises de cellules très aplaties, sans noyaux, mortes et destinées à être éliminées. Ce sont les cornéocytes. En raison de sa composition et de son organisation lipidique, la CC contribue largement à l'imperméabilité de la peau. Les dernières étapes menant à la formation de la CC incluent l'exocytose apicale des kératinosomes ainsi que l'extrusion des ω -OH-céramides, des acides gras et des cholestérols dans l'espace intercellulaire. La TG1 réticule également la loricine et d'autres protéines sur les protéines d'échafaudages.

Malgré les mécanismes d'imperméabilisation réalisés durant la différenciation des kératinocytes, certaines molécules peuvent pénétrer la peau. Les molécules peuvent diffuser en traversant les cellules, mais la majorité d'entre elles diffusent à travers les espaces intercellulaires [65, 66]. En plus de l'enveloppe lipidique de la CC, la cohésion intercellulaire assurée par les jonctions serrées de la CG et par les autres jonctions intercellulaires est cruciale à la formation de la barrière cutanée. De façon générale, la vitesse de pénétration des molécules supérieures à 600 Daltons tend à rester sous les 10^{-5} cm/heure. Celle des molécules inférieures à 600 Daltons tend à augmenter de façon inversement proportionnelle au poids moléculaire et elle peut dépasser 10^{-3} cm/heure vers 10 Daltons [67, 68]. Par ailleurs, il faut distinguer la pénétration de l'absorption, qui implique le passage à travers la barrière épidermique vers la circulation sanguine. L'absorption percutanée a été démontré pour plusieurs composées [69].

1.1.2 Le derme

Le derme est un tissu conjonctif apportant soutien, cohésion, souplesse, extensibilité et résistance mécanique à la peau. Son épaisseur varie selon la localisation pour une moyenne de 2 mm [70]. Il nourrit l'épiderme et il contribue à la thermorégulation grâce au réseau microvasculaire. Selon sa profondeur et son contenu, le derme est partagé en 2 zones. La zone directement sous l'épiderme est le derme papillaire. Il comprend les papilles dermiques et les crêtes épidermiques. Il est lâche et très vascularisé. Sa densité cellulaire est plus grande que pour la partie profonde du derme, appelée derme réticulaire.

Le derme supporte toutes les annexes cutanées grâce à son réseau de MEC. La production et l'organisation de la MEC dépendent largement des cellules majoritaires du derme, les fibroblastes. Ce sont des cellules d'origine mésenchymateuse. Elles sont hétérogènes et elles contiennent peu de protéines pouvant être utilisées comme marqueur cellulaire distinctif des fibroblastes. Les fibroblastes réagissent au microenvironnement en synthétisant différents composants de la MEC. Ils sécrètent aussi certains facteurs de croissance. Ces derniers sont des protéines qui peuvent être captées par des récepteurs cellulaires qui leur sont spécifiques, soit sur la même cellule soit sur d'autres cellules. La liaison subséquente des facteurs de croissance par leur récepteur activera généralement une cascade d'événements cellulaires. Il peut en découler la modification de l'adhérence des cellules entre elles, de même que leur migration, leur survie ou leur prolifération. Les fibroblastes contribuent à la différenciation épidermique par l'intermédiaire d'interactions paracrines avec les kératinocytes [71].

1.1.3 La matrice extracellulaire du derme

La MEC du derme est un réseau tridimensionnel de fibres de collagène et d'élastine ainsi que de protéoglycanes et de glycoprotéines. Le collagène, une protéine structurale, est le principal constituant de ce réseau.

Les différents types de collagène sont différenciés d'après la séquence d'acides aminés d'où découlent des formes et des propriétés distinctes [72, 73]. Le collagène fibrillaire de type I constitue environ 85% du collagène du derme et celui de type III environ 10%. Les collagènes fibrillaires ont un diamètre de 50 à 200 nm et une structure hélicoïdale rigide résultante de l'association de trois chaînes α . Ces fibrilles peuvent se regrouper en fibres de plusieurs micromètres de diamètre. Le derme papillaire est riche en fibres de collagène de type I et III d'un diamètre de 0,3 à 3 μm . Elles sont entrelacées et arrangées en filets orientés perpendiculairement à l'épiderme. Quant au derme réticulaire, il contient des fibres de collagène entrelacées, disposées en faisceaux irréguliers et de diamètre variant de 10 à 40 μm . Ceux-ci forment des vagues qui s'entrecroisent parallèlement à la surface de la peau. Le derme réticulaire est plus dense en collagène que la partie papillaire. En outre, des collagènes non fibrillaires de type XII et XIV sont associés à ces fibres par l'intermédiaire de la décorine, un protéoglycane. Tout ce réseau est consolidé par différents protéoglycanes

et glycoprotéines dont certains de ses constituants, comme la fibronectine et la téna-scine, facilitent l'adhésion cellulaire [74-76]. La MEC donne une très grande résistance au derme.

La flexibilité et l'extensibilité de la peau dépendent quant à elles de l'élastine, la composante principale des fibres élastiques de la MEC. Les monomères d'élastine se polymérisent en présence de fibrilline et ils adoptent des orientations spatiales diverses. La peau peut donc s'allonger de façon élastique au gré des forces subites. [77, 78].

Outre le collagène et l'élastine, les glycosaminoglycanes et protéoglycanes sont d'autres constituants majeurs de la matrice du derme. Étant fortement chargés négativement, ils attirent des ions positifs, dont le sodium, et ils retiennent l'eau. Ils forment ainsi un gel souple et hydraté appelé substance fondamentale [76, 79]. Ils confèrent au derme une forte résistance à la compression. Certains glycosaminoglycanes, comme l'acide hyaluronique, y forment notamment de longues chaînes non ramifiées de polysaccharides. D'autres glycosaminoglycanes, tels les chondroïtine-sulfate, héparane-sulfate, kératane-sulfate et dermatane-sulfate, y font des liaisons covalentes avec certaines protéines pour former des protéoglycanes.

1.1.4 La jonction dermo-épidermique

La CB de l'épiderme repose sur la membrane basilaire à la JDE. Elle est produite conjointement par les kératinocytes et les fibroblastes. La JDE est beaucoup plus qu'une simple structure de cohésion offrant une MEC d'ancrage. Elle contribue à moduler la diffusion des nutriments, à induire la polarité de la CB, à compartimenter le derme et l'épiderme et à contrôler l'invasion cellulaire pathologique.

Elle est divisée en trois zones. D'abord la *lamina lucida*, en contact direct avec la CB. Elle est traversée par des filaments d'ancrage de laminine-5 et de collagène XVII liés aux hémidesmosomes [80]. Ensuite, la *lamina densa* qui contient, entre autres, de la laminine-5 complexée à du collagène IV grâce à la protéine nidogène et au perlécan, un héparan sulfate protéoglycan [81]. Enfin, la *sub-lamina densa*, qui est une zone fibreuse en continuité avec

le derme. Elle contient notamment des fibres élastiques, du collagène de type III et du collagène de type VII ancrant la JDE au derme sous-jacent [82, 83].

1.1.5 L'hypoderme

L'hypoderme isole le corps, sert de réserve énergétique, absorbe les chocs et permet la mobilité de la peau sur les structures sous-jacentes. La jonction entre le derme profond réticulaire et l'hypoderme est marquée puisque le premier est un tissu conjonctif fibreux alors que le second est un tissu adipeux [84]. Le derme et l'hypoderme sont cependant très intégrés, notamment grâce aux réseaux nerveux ainsi que vasculaire et à travers la continuité des follicules pileux. L'hypoderme est un tissu hétérogène sous le derme constitué de préadipocytes, d'adipocytes, de fibroblastes, de cellules endothéliales et de macrophages. Grâce à l'élargissement des cellules adipeuses qui emmagasinent des lipides et à l'augmentation de leur nombre, la masse adipeuse de l'organisme peut augmenter. Enfin les adipocytes sont également des cellules endocrines qui libèrent de nombreuses molécules [84].

1.1.6 La guérison des plaies : vue d'ensemble

Les plaies cutanées menacent l'intégrité même de l'organisme. Lorsque la barrière épidermique protectrice est lésée, l'organisme en entier est beaucoup plus vulnérable aux agressions mécaniques, chimiques et aux infections. La gravité des plaies dépend de leur localisation, de leur étendue, de leur nature et de leur profondeur. Par ailleurs, les brûlures sont un type particulier de plaies. Elles ont été classifiées par degré de destruction des tissus cutanés. Une brûlure de premier degré altère l'épiderme et ne laissera généralement pas de cicatrice après la guérison. Une brûlure de deuxième degré altère partiellement le derme. Une brûlure de troisième degré détruit totalement l'épiderme, le derme et parfois plus profondément. La localisation de la brûlure influence sa gravité [85, 86]. Les grands brûlés doivent bénéficier de traitements médicaux particuliers pour survivre. Certains reçoivent notamment des greffes de peau. La reconstruction de peaux sera décrite à la section 1.6.

Le processus normal de guérison des plaies comprend une multitude d'étapes se chevauchant. Ce processus restaure la barrière épidermique ainsi que l'homéostasie cutanée (Figure 1-4).

D'abord, l'hémorragie est arrêtée par la formation d'un agrégat de plaquettes et le dépôt d'une matrice de fibrine. La libération d'interleukine-1 par les kératinocytes lésés et la libération locale de signaux d'alerte par les nerfs cutanés comptent parmi la multitude de processus contribuant à induire une inflammation [87, 88]. Celle-ci nettoie les tissus lésés et prévient l'infection [89]. La matrice de fibrine facilite notamment la migration des cellules immunitaires.

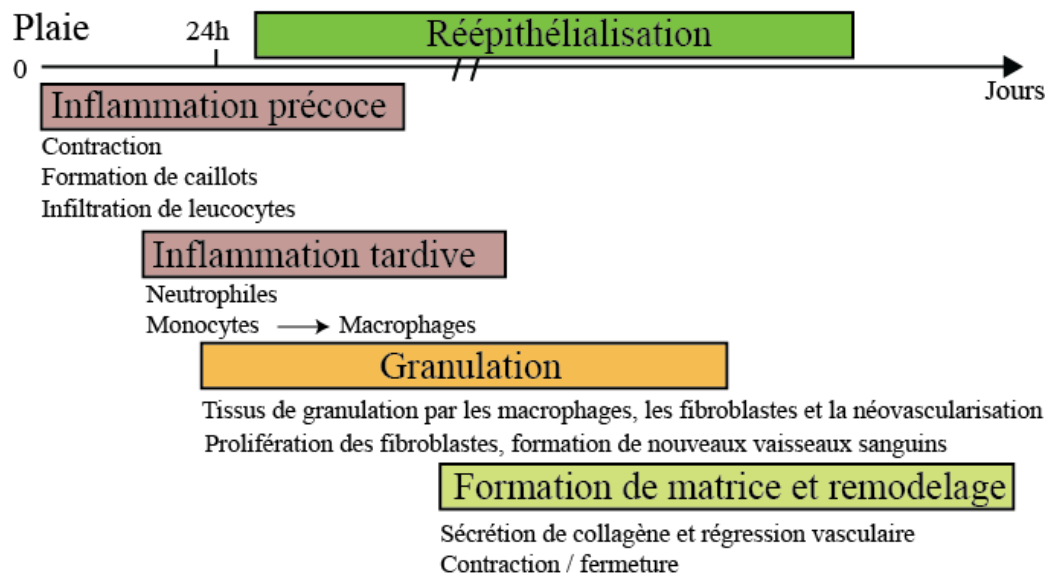


Figure 1-4. Vue d'ensemble du processus de guérison des plaies. Modifiée de [90].

Une importante migration et prolifération cellulaire aura ensuite lieu, dont celle des kératinocytes qui reconstitueront l'épiderme par réépipithélialisation. Des vaisseaux sanguins sont aussi formés par angiogenèse (voir section 1.6.3.2) et des fibroblastes migrent dans la matrice de fibrine. Cela marque le début de la formation d'un tissu de granulation qui remplacera la matrice de fibrine. Au cours de ce processus, des monocytes se différencient en macrophages. Les macrophages influencent la guérison des plaies. En outre, certains fibroblastes stimulés par les sécrétions des macrophages deviennent des myofibroblastes, des cellules contractiles [91]. Les fibroblastes et les myofibroblastes produisent de la MEC dont notamment du collagène [92]. Après plusieurs jours, un remodelage a lieu. La plupart des capillaires, des macrophages et des myofibroblastes disparaissent. Le tissu mature

contiendra ainsi généralement moins de cellules qu'avant la blessure. La nouvelle MEC est d'abord constituée principalement de collagène III et d'autres protéines. Le collagène de type I deviendra éventuellement prédominant [93].

À la fin de la guérison d'une plaie, l'épiderme est régénéré à partir de kératinocytes qui se divisent pour reformer le tissu original et le derme est réparé. Les aspects esthétiques et fonctionnels au terme de la guérison de la zone lésée peuvent varier. Le derme est parfois altéré de façon plus marquée. De plus, la guérison des plaies peut mener à des cicatrices dysfonctionnelles et invalidantes dues notamment à une trop forte accumulation de collagène dans le derme.

1.1.7 La réépithélialisation

La réépithélialisation est une étape cruciale de la guérison des plaies. En effet, elle permet la régénération de la barrière épidermique qui protège l'organisme. L'épiderme a une capacité de régénération supérieure à bon nombre de tissus. Lorsqu'une plaie affecte toute l'épaisseur de l'épiderme et qu'elle affecte aussi partiellement le derme, les kératinocytes alignés aux follicules pileux ou à d'autres annexes cutanées qui se projettent profondément dans le derme restent viables. Ils peuvent migrer et proliférer vers la surface de la plaie pour régénérer l'épiderme.

La réépithélialisation repose sur la migration, la prolifération et la différenciation des kératinocytes [94]. La migration des kératinocytes lors de la réépithélialisation implique une transition vers un phénotype cellulaire particulier (pour une revue, voir [90]). Parmi les éléments contribuant à cette transition, on trouve la libération d'interleukine-1 par les kératinocytes lésés [95, 96]. Les kératinocytes en migration diffèrent des autres kératinocytes. Ils expriment d'autres protéines, dont les kératines K6, K16 et K17 [97]; les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha V\beta 6$ liant la fibronectine [98]; l'intégrine $\alpha V\beta 5$ liant la vitronectine [99, 100]; l'intégrine $\alpha 9\beta 3$ liant la ténascine [101, 102].

La migration des kératinocytes requiert d'abord la dissociation des desmosomes et des hémidesmosomes [103]. La dissociation des desmosomes dépend de l'association de la protéine kinase C α aux desmosomes. Cela compromet leur adhésion dépendante du

calcium [104, 105]. Celle des hémidesmosomes pourrait dépendre de la rupture du lien $\alpha6\beta4$ /laminine-5 [106-108]. La migration implique ensuite la formation de lamellipodes sur les kératinocytes. Cela repose sur la polymérisation/dépolarisation du réseau d'actine [109]. L'avancée de ces lamellipodes et leur rétraction du côté opposé de la cellule contribuent au déplacement des kératinocytes lorsqu'une matrice permissive le permet. De plus, la migration des kératinocytes est facilitée par leur libération de métalloprotéases digérant les protéines qui entravent leur avancée [110, 111]. Elle est également facilitée par leur production du *plasminogen activator*. Ce dernier active la plasmine, une enzyme digérant la fibrine [112].

La réépithélialisation est influencée par des signaux solubles, comme les facteurs de croissance, qui favorisent la migration et/ou la prolifération des kératinocytes. Plusieurs d'entre eux agissent indirectement par l'intermédiaire de cellules tierces chez lesquelles la sécrétion de signaux solubles à effet direct est induite (pour une revue, voir [87]). Par exemple, l'interleukine-6 induit la migration des kératinocytes par l'intermédiaire d'un facteur dérivé des fibroblastes [113]. Parmi les signaux à effet direct, citons les *fibroblast growth factor* (FGF) FGF-2 [114, 115], FGF-7 [116, 117], FGF-10 [118-120], FGF-22 [121], le *hepatocyte growth factor* (HGF) [122], le *epidermal growth factor* (EGF) [123-125] et le *transforming growth factor* (TGF) $-\alpha$ [126]. Certains signaux, comme le TGF- β , sont sujets à controverse. En effet, certaines études suggèrent un rôle négatif sur un aspect essentiel de la réépithélialisation, soit la prolifération des kératinocytes [127-129]. Cependant, d'autres études démontrent que le TGF- β 1 contribue à induire leur migration [130-132].

1.2 Le réseau microvasculaire de la peau

L'épiderme et le derme sont nourris et oxygénés par la circulation sanguine (Figure 1-5). Le réseau microvasculaire contribue également à l'élimination des déchets métaboliques de la peau et au maintien de son homéostasie par la thermorégulation et l'équilibre hydrique. Les vaisseaux sanguins sont organisés en un réseau fermé de tubes creux dans lesquels le sang circule grâce au cœur. Puisque la diffusion de l'oxygène est limitée à environ 100 µm, le réseau vasculaire doit être étendu et très ramifié dans la peau et les autres tissus. Ainsi, l'interface entre le sang et les vaisseaux sanguins chez l'homme est évaluée à 350 m² [133]. La peau contient entre 9 et 12 % du sang corporel et elle véhicule entre 0,5 et 7 litres par minute de sang suivant l'état au repos et durant un exercice intense [17].

L'intérieur des vaisseaux sanguins est tapissé de cellules endothéliales (CE). Elles contiennent le sang et préviennent sa coagulation au contact de la MEC ou au contraire la soutiennent suivant un traumatisme. De plus, elles limitent sélectivement les échanges entre le sang et les tissus. Ainsi, le passage des ions, des macromolécules et des cellules immunitaires est contrôlé. Enfin, les CE contribuent à moduler le tonus des vaisseaux sanguins.

1.2.1 Les types de vaisseaux sanguins

La peau est vascularisée par plusieurs types de vaisseaux sanguins : les artères et les artérioles, les capillaires, les veinules et les veines. Les artères transportent le sang oxygéné du cœur vers les artérioles, qui l'acheminent aux capillaires. Les petits capillaires forment des plexus, notamment dans le derme, où ils sont des sites d'échanges avec les tissus environnants. Ensuite, les veinules, puis les veines collectent et retournent le sang pauvre en oxygène et les déchets du métabolisme. Enfin, les vaisseaux lymphatiques recueillent le liquide extravasculaire et le canalisent vers les ganglions lymphatiques. Les petits capillaires et les gros vaisseaux présentent des différences morphologiques. Les capillaires ont une seule couche cellulaire, l'endothélium, constitué de CE reposant sur une membrane basilaire. Une cellule murale, un péricyte (section 1.2.4), entoure l'endothélium. À l'opposé, les plus gros vaisseaux sanguins sont constitués de trois couches. D'abord, la première couche est l'endothélium, ou intima. Il est ancré dans la membrane basilaire et

une membrane élastique de MEC l'entoure. La seconde couche est la media. Elle peut se dilater ou se contracter pour moduler le tonus par les processus de vasoconstriction et vasodilatation. La media est presque exclusivement constituée de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV; section 1.2.4) associées à des fibres élastiques, des fibres de collagène IV, III et I ainsi que des protéoglycanes. La media est entourée d'une tunique élastique externe qui est plus épaisse dans les artères que dans les veines. La troisième couche, l'adventice, est formée de tissus conjonctifs parfois eux-mêmes vascularisés. Les vaisseaux sanguins sont innervés par des fibres nerveuses dont les terminaisons aboutissent à la limite de la media et de l'adventice [134].

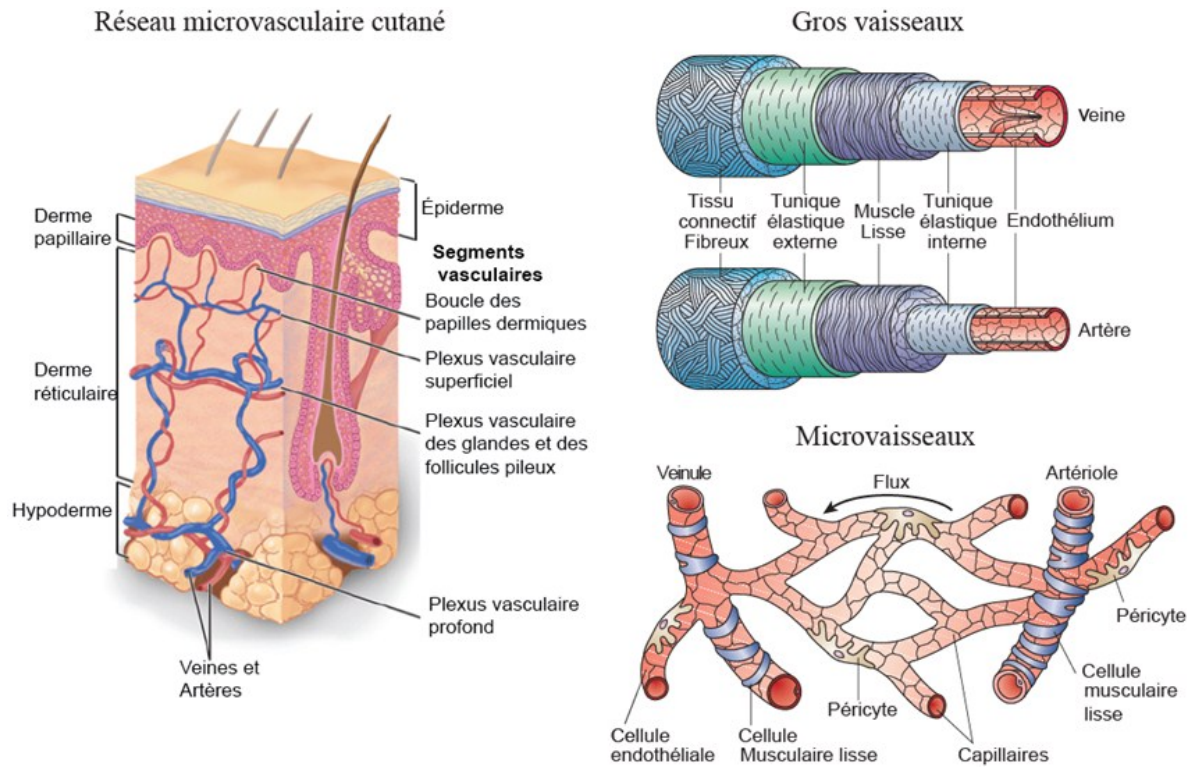


Figure 1-5. Illustration de la microvascularisation cutanée, de la structure des gros vaisseaux sanguins et des microvaisseaux. Modifiée de [84, 134].

1.2.2 Le réseau microvasculaire cutané

La microcirculation cutanée est organisée en 2 plexus principaux, horizontaux et parallèles, situés dans le derme et l'hypoderme (Figure 1-5) [135]. Aucun vaisseau sanguin ne pénètre l'épiderme. Tout d'abord, le plexus vasculaire superficiel (PVS) est situé en moyenne entre 400 et 650 μm sous la couche cornée, dans le derme papillaire. C'est un lieu d'échange très actif dont dépendent l'épiderme et le derme papillaire. Ensuite, le plexus vasculaire profond (PVP) est à la jonction du derme et de l'hypoderme [136, 137]. Enfin, des plexus moins imposants situés entre le PVS et le PVP vascularisent les follicules pileux ainsi que les glandes sudoripares et sébacées. Les plexus communiquent verticalement grâce à des artérioles riches en oxygène ascendantes et des veinules pauvres en oxygène descendantes. Elles sont jumelées en paires. Ces paires sont espacées de 1,5 à 7 mm [138].

Les artérioles ascendantes du PVS ont une membrane basilaire et sont entourées par 2 couches de CMLV. Les CMLV internes sont orientées sur la longueur des microvaisseaux. Elles percent la membrane basilaire jusqu'aux CE, qui en font autant. De fréquentes jonctions intercellulaires sont visibles entre les CE et les CMLV en microscopie électronique à transmission (MET). La seconde couche de CMLV est orientée en spirale autour des artérioles [135].

Plusieurs changements morphologiques marquent le branchement des artérioles au capillaire cutané. D'abord, les CMLV s'effacent juste avant ce branchement, alors que le diamètre des artérioles passe d'une moyenne de 17 à 26 μm de diamètre à 15 μm [139]. La transition artériole-capillaire a lieu lorsque les fibres élastiques disparaissent et que les vaisseaux sont réduits à un diamètre compris entre 10 et 12 μm [136]. Une cellule murale particulière avec plusieurs bras circonférentiels agit alors comme un sphincter précapillaire [135]. Chaque artériole se divise en 4-5 branches capillaires d'un diamètre externe de 10-12 μm et avec une lumière de 4-6 μm . Ces capillaires sont recouverts d'une membrane discontinue et ils ne sont normalement pas fenêtrés dans la peau saine. Des péricytes sont présents et leur distribution reflète les contraintes fonctionnelles imposées [84].

Enfin, les veinules du PVS collectent le sang de 8 à 10 branches capillaires. Alors que la transition capillaire-veinule débute dans le PVS, une lamelle de tissu conjonctif de 25 à 100

nm d'épaisseur, puis plusieurs autres lamelles superposées deviennent visibles en MET sur la membrane basilaire. Les veinules deviennent ultimement plus grosses que les artérioles, atteignant un diamètre allant de 18 à 23 μm et une lumière de 10 à 15 μm en moyenne. Leurs parois sont continues et des péricytes les recouvrent. Au PVP, ces veinules aboutissent à des veines collectrices qui disposent de valves orientées pour empêcher le flux rétrograde du sang. Les vaisseaux du PVP sont de plus grands calibres, ayant un diamètre pouvant dépasser 50 μm [84].

1.2.3 L'endothélium

Les CE sont polarisées, avec des intégrines du côté basal et des protéines d'adhésion pour le système immunitaire face à la lumière [140]. Les CE sont couvertes d'une mince couche de diverses protéines, glycolipides, glycoprotéines et protéoglycanes. Cette couche, qui fait face à la lumière, est appelée glycocalyx. Le glycocalix a une influence sur un grand nombre de processus et il agit également comme senseur des forces de cisaillement dues au flux sanguin. Cela modifie le comportement cellulaire et la réponse physiologique. Ces phénomènes ne seront pas approfondis ici [133]. Par ailleurs, les CE contiennent des organelles spécialisées, notamment des fenestrations (pas toujours présentes), un système calvéolaire, et des corps de Weibel-Pababe. Ces derniers sont des structures de 20 000 kDa qui peuvent, lors d'un traumatisme, fusionner avec la membrane et relâcher des protéines favorisant entre autres la coagulation et l'adhésion de cellules immunitaires. Les corps de Weibel-Pababe contiennent notamment le facteur de von Willebrand (vWF), aussi appelé facteur VIII (F8), qui stabilise l'adhésion des plaquettes sanguines à la MEC.

L'endothélium est très hétérogène selon les tissus : il peut être fenêtré ou continu. Les CE elles-mêmes varient énormément en termes de morphologie, de perméabilité, de sécrétion de certains médiateurs, d'expression de plusieurs antigènes et de réponse au stress. En fait, elles sont très adaptées aux besoins de l'organe qu'elles vascularisent [141]. Même les CE des artérioles et des veinules sont différentes entre elles. En effet, les CE des artérioles sont généralement allongées, avec un ratio largeur sur longueur de 1:6,8, alors que les CE des veinules sont plus rondes avec un ratio largeur sur longueur de 1:2,4 [142]. Le phénotype

des CE n'est pas irréversible. En effet, des CE transplantées d'un emplacement à un autre acquièrent la morphologie des cellules endothéliales résidentes [143, 144].

Les cellules endothéliales microvasculaires du derme (*human dermal microvascular endothelial cells*; HDMEC) formant l'endothélium cutané expriment certains marqueurs typiques en plus de ceux communs à toutes les CE. Les HDMEC du PVS expriment notamment le *pathologische anatomie Leiden-endothelium* (PAL-E), la N-cadherin, et CXCR4 [84, 145]. De plus, les veinules postcapillaires du PVS n'expriment pas CD36, contrairement à celles du PVP [146]. Enfin, les artérioles du PVS peuvent être spécifiquement identifiées par l'activité de l'enzyme phosphatase alcaline [147].

1.2.3.1 L'adhésion et les jonctions intercellulaires de l'endothélium

Les CE s'encastrent entre elles et présentent une distribution et une quantité de jonctions cellulaires reflétant leur perméabilité particulière, intrinsèque à leur région de l'arborescence vasculaire [148]. Les CE ont des jonctions d'adhérence comprenant les protéines *vascular endothelial cadherin* (VE-cadherin) et le *platelet/endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM-1). Ces jonctions sont assez malléables pour permettre au besoin le passage de cellules immunitaires et pour participer à la formation de tubules [149-152]. De plus, des jonctions communicantes (*gap junctions*) sont présentes entre différentes CE et ainsi qu'entre les CE et les cellules murales. Ces jonctions comprennent notamment les connexines-43, -37, -40 [153].

Les CE adhèrent à la MEC grâce à différentes intégrines. Elles adhèrent à la laminine via les intégrines $\alpha6\beta1$ et $\alpha6\beta4$, au collagène via l' $\alpha1\beta1$ et l' $\alpha2\beta1$, à la fibronectine par les intégrines $\alpha5\beta1$ et $\alpha4\beta1$ et au collagène dénaturé via l'intégrine $\alpha V\beta3$ [154]. La liaison des intégrines aux protéines matricielles engendre des événements intracellulaires modifiant l'organisation du cytosquelette d'actine des CE [155]. Cela peut favoriser la migration ou au contraire l'inhiber selon les composantes de la MEC [156-158]. Ces interactions ne sont toujours pas pleinement caractérisées et différentes intégrines sont parfois exprimées selon le microenvironnement et le contexte physiologique. Outre leurs adhésions à la matrice, les CE ont des contacts directs très nombreux et très serrés avec les cellules murales [136].

1.2.4 Les cellules murales

Les cellules murales soutiennent l'endothélium. Elles influencent leurs morphologies [159] et sécrètent plusieurs éléments de la MEC [160]. Les péricytes sont les toutes premières cellules murales à être recrutées sur les vaisseaux sanguins en formation. Leur présence sur les néovaisseaux coïncide justement avec le dépôt de la membrane basilaire [160]. Ils sont présents avec les CE à l'intérieur de celles-ci. Les CE et les péricytes communiquent par l'échange de petites molécules via leurs jonctions communicantes [161]. Les péricytes ont des origines diverses et peuvent avoir différents phénotypes. De plus, leur morphologie et leur recouvrement de l'endothélium varient en fonction de l'organe [162].

Les CMLV sont un autre type de cellules murales. Elles sont surtout présentes dans la media et elles sont plus nombreuses dans les artères que dans les veines. Elles peuvent répondre aux commandes nerveuses en se contractant ou en se relaxant. Elles modulent ainsi le diamètre des vaisseaux sanguins et donc le tonus vasculaire. Elles forment une population hétérogène qui se distingue en terme de migration, de prolifération, de synthèse de protéines de contraction et de protéines de la MEC [163-166].

1.2.5 La membrane basilaire vasculaire

La membrane basilaire vasculaire est produite conjointement par les péricytes et les CE [167, 168]. Elle contribue à l'adhésion et à la migration des CE, à maintenir l'intégrité structurale, à induire la polarité des CE. Elle peut lier et filtrer des éléments solubles du plasma. Lors d'un traumatisme, les fragments des composantes endommagées de la membrane basilaire peuvent contribuer à la balance de facteurs qui induiront soit une croissance vasculaire, soit l'inverse, dépendamment des fragments libérés et du microenvironnement [169, 170]. Les composantes principales de la membrane basilaire vasculaire sont les laminines 8 et 10, le collagène IV et le nidogène. Elle contient aussi du collagène VIII, XV et XVIII, de l'héparan sulfaté, du protéoglycan, de la trombospondine, de la fibronectine et des pro-métalloprotéases [169, 170].

1.2.6 Formation de vaisseaux sanguins

La formation de tous les vaisseaux sanguins débute par la vasculogénèse. Ce processus permet la formation d'un réseau vasculaire primitif à partir de cellules précurseurs chez l'embryon. Ensuite, ce réseau primitif prend de l'expansion par le processus d'angiogénèse.

1.2.6.1 La vasculogénèse

La vasculogénèse débute dans le mésoderme, un feuillet de cellules situé entre l'ectoderme et l'endoderme suivant l'étape du développement embryonnaire de la gastrulation. Dans les tissus extraembryonnaires du sac vitellin, certaines cellules exprimant un récepteur pour le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), le VEGFR-2, s'agrègent ensemble et forment des structures vasculaires appelées des îlots sanguins.

Le développement vasculaire extraembryonnaire repose sur les hémangioblastes. Ces cellules engendrent à la fois les précurseurs endothéliaux (angioblastes) et hématopoïétiques dans les îlots sanguins [171, 172]. L'hémangioblaste peut aussi se différencier en CMLV [173, 174]. Le développement vasculaire des tissus intraembryonnaires se fait quant à lui par des angioblastes solitaires, à l'exception d'une petite portion de l'aorte [175, 176]. Ces angioblastes sont extrêmement mobiles [177, 178]. Leur migration dans la région de la tête, une région d'abord non vascularisée, serait particulièrement évidente [179, 180]. Ces angioblastes vont par la suite former des capillaires. Ils vont sécréter des protéines de la MEC leur permettant de former une membrane basale et ils vont être envahis par des cellules hématopoïétiques provenant du sac vitellin et des regroupements para-aortiques [181, 182, 183].

Les signaux diffusibles du FGF influencent rapidement le développement vasculaire [184]. Un des événements découlant de la signalisation du FGF dans le mésoderme est l'activation du gène codant pour le VEGFR-2 [185]. La transcription du VEGFR-2 augmente à l'intérieur d'une fenêtre de 24 heures suivant une stimulation au FGF dans ce tissu [185]. Aussi, le traitement de cellules souches embryonnaires avec le FGF-2, un ligand du *fibroblast growth factor receptor-1* (FGFR-1), augmente la génération des cellules exprimant VEGFR-2 *in vitro* [186]. Le FGF restreindrait la localisation des précurseurs vasculaires dans la portion ventrale du mésoderme [187, 188]. Enfin, il active les facteurs

de transcription ETS. Ces derniers induisent la transcription du VEGFR-2. Il pourrait s'agir d'un mécanisme contribuant à l'apparition des précurseurs vasculaires [189, 190].

D'autres signaux que le FGF influencent aussi la formation du système vasculaire, dont les membres de la famille du TGF- β et sa sous-famille *bone morphogenetic proteins* (BMP) [191]. La perte de *l'activin receptor-like kinase 8* (ALK8), un récepteur des BMP-2 et -7, diminue l'expansion du mésoderme ventral [192]. Les souris déficientes en BMP-4 présentent un développement moindre du réseau de capillaires primitifs et possèdent moins de cellules sanguines [193]. Le BMP-4 serait requis pour la co-expression du VEGFR-2 et de SCL, un facteur de transcription commun aux précurseurs endothéliaux et hématopoïétiques [194]. L'expression de BMP-4 induirait l'apparition de marqueurs endothéliaux et hématopoïétiques [187]. De plus, l'inactivation du gène correspondant au récepteur du BMP-4 (Alk3) entraîne des défauts dans le remodelage et la maturation des vaisseaux sanguins, ce qui engendre des hémorragies abdominales [195]. Enfin, un inhibiteur des BMP découvert récemment, le BMPER, peut bloquer l'activation des CE dépendantes du BMP-4. Cet inhibiteur pourrait influencer la différenciation endothéliale [196].

Finalement, les signaux diffusibles de Wnt influencent aussi le développement embryonnaire du système vasculaire. L'inhibition de la signalisation de Wnt abolit la compétence des cellules souches embryonnaires à exprimer le VEGFR-2 [197]. De plus, l'activation de la signalisation de Wnt de cellules souches embryonnaires augmente le développement vasculaire *in vitro* et son inhibition le diminue [198]. En outre, l'abolition de Wnt-2 augmente le nombre de cellules hématopoïétiques et diminue le nombre de CE. Cela suggère que Wnt-2 est un modulateur positif de la différenciation endothéliale [199].

Chez l'humain, la vasculogenèse débute vers le 18^e jour embryonnaire et les premières CE sont détectables dans les îlots sanguins vers le 23^e jour embryonnaire [200, 201].

1.2.6.2 L'angiogenèse

Alors que la vasculogenèse a engendré la formation d'un plexus vasculaire primaire, l'expansion de ce réseau se fait par angiogenèse. L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. L'angiogenèse peut se faire via au moins 3 autres mécanismes, soient par intussusception, par formation de vacuoles et par bourgeonnement [202, 203]. Enfin, un autre mécanisme fut suggéré plus récemment, soit par déplacement de vaisseaux préexistants par tension mécanique (Figure 1-6).

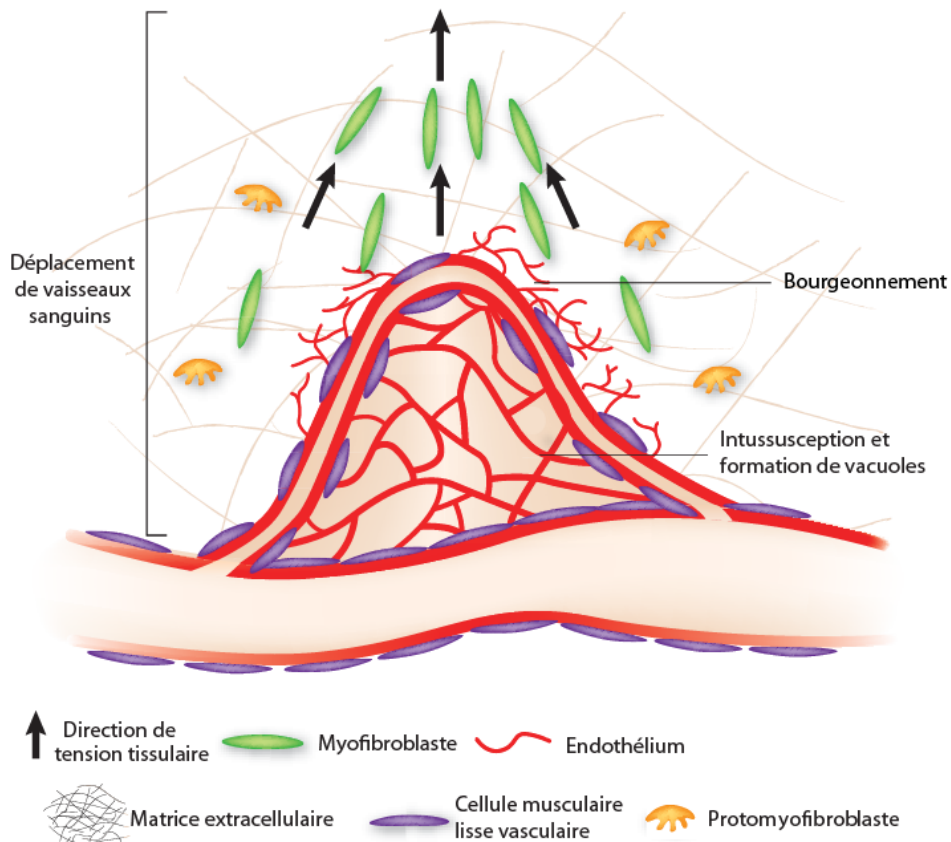


Figure 1-6. L'angiogenèse peut se faire par différents mécanismes. Modifiée de [204].

L'angiogenèse par bourgeonnement comprend plusieurs étapes. Dans un premier temps, les cellules murales présentes autour de l'endothélium se rétractent. Ensuite, les CE activées sécrètent des protéines dégradant la membrane basilaire et la MEC qui stabilisent les CE. Puis, une CE située à l'extrémité distale de la pousse vasculaire migre vers des signaux trophiques [205]. La CE de l'extrémité (*tip cell*) étend de façon dynamique des filopodes et

des lamellipodes pour détecter les signaux instructifs [206]. Elle dirige la croissance des CE qui la suivent et contrôle même le branchement avec d'autres vaisseaux. En outre, elle empêche les CE adjacentes de devenir, elles aussi, des CE de l'extrémité. Cela implique un contact CE-CE, l'expression de Dll4 par la CE de l'extrémité et sa liaison par Notch sur la CE adjacente [207-209]. Sous l'influence de Notch/Dll4 et possiblement d'autres signaux, la CE adjacente à celle de l'extrémité devient un autre type de CE, la CE de tige (*stalk cell*) [210]. Alors que la CE de l'extrémité ne prolifère que très peu, les CE de tige prolifèrent et forment un tube branché au reste du réseau vasculaire [205]. Enfin, elles recrutent de nouvelles cellules murales et sécrètent une nouvelle membrane basilaire [210, 211] .

L'angiogenèse par formation de vacuoles implique la formation de ces dernières qui s'accumulent de façon polarisée près du centrosome et permettent aux cellules de former des lumières et de s'interconnecter [212].

L'angiogenèse par intussusception se produit par division des vaisseaux (Figure 1-7). Elle peut également survenir lors de l'intercalation de vaisseaux en croissance, alors que les capillaires fusionnent ou que des CE additionnelles s'associent aux vaisseaux pour augmenter leur diamètre et leur longueur [213].

Enfin, un nouveau mécanisme d'angiogenèse fut suggéré plus récemment, soit par déplacement de vaisseaux préexistants. Cela dépendrait du déplacement d'une partie d'un vaisseau sanguin dû à des forces de tension provenant, par exemple, d'une contraction du tissu par des myofibroblastes dans un tissu cicatriciel (Figure 1-6) [204]. Le vaisseau forme alors une boucle dans le tissu où il a été étiré.

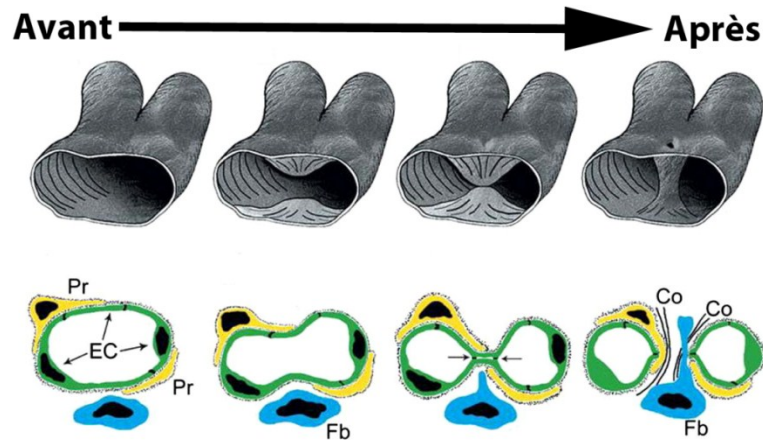


Figure 1-7. Angiogenèse par intussusception. Légendes : Pr : péricytes; EC: cellules endothéliales; Fb: fibroblastes; Co : collagène. Modifiée de [214].

L'angiogenèse est dépendante de plusieurs éléments, dont les facteurs de croissance et leurs récepteurs [215]. Les facteurs de croissance angiogéniques sont classés en deux catégories selon leur mode d'action. Les facteurs à action directe stimulent directement l'angiogenèse des CE suite à leur liaison de récepteurs spécifiques (FGF, VEGF). Les facteurs à action indirecte incitent plutôt certaines cellules à sécréter des facteurs de croissance à action directe [216]. L'angiogenèse est aussi dépendante de plusieurs autres éléments, dont les protéinases et leurs inhibiteurs [217, 218], les molécules d'adhésion [219, 220], la MEC [221, 222] et les interactions avec les cellules murales [223, 224].

De plus, la morphogénèse d'une lumière par les CE est un processus important de l'angiogenèse, mais cela est encore mal compris [203, 225]. L'établissement de la polarité de l'endothélium semble essentiel à ce processus [140, 226-228]. La polarité des CE dépend notamment des interactions intercellulaires et des interactions avec la MEC. Enfin, des études très récentes ont identifié les parois des vaisseaux sanguins comme niche de cellules souches, ce qui pourrait avoir des implications dans le processus d'angiogenèse [229].

Lorsque l'endothélium est quiescent, il y a un équilibre entre les facteurs angiogéniques et les facteurs angiostatiques [230].

1.3 Le réseau nerveux sensoriel cutané

La peau est le site d'interaction avec l'environnement le plus étendu. La peau est aussi la cible d'une innervation très dense, variée et spécialisée qui touche, entre autres, l'épiderme, le derme et le réseau microvasculaire cutané. Cette riche innervation cutanée fait de la peau l'organe du toucher. Elle permet d'expérimenter une large gamme de sensations provenant de stimuli thermiques, mécaniques, électriques, chimiques et microbiologiques. Le système nerveux étant fort complexe, il convient d'en décrire brièvement l'organisation. L'innervation sensorielle cutanée, sa morphologie, les mécanismes de la détection sensorielle, les cellules de Schwann associées aux neurones, leur développement et la régénération nerveuse cutanée seront décrits.

Enfin, en plus de sa fonction de détection, l'innervation sensorielle cutanée influence directement l'homéostasie de la peau et sa guérison. L'interdépendance et la complémentarité de l'innervation cutanée, de l'épiderme et du réseau microvasculaire seront abordées plus loin.

1.3.1 Le système nerveux périphérique

Le système nerveux est un réseau biologique qui dirige l'organisme. Il est organisé en structures anatomiques distinctes soient le système nerveux central (SNC), comprenant l'encéphale et la moelle épinière, et le système nerveux périphérique (SNP), comprenant les ganglions nerveux, les nerfs et les terminaisons nerveuses spécialisées. Les fonctions du SNC sont de choisir, moduler et coordonner les actions ou réactions biologiques. Celles du SNP sont de transmettre les informations sensorielles vers le SNC et les commandes vers les effecteurs. Le SNP doit pour cela innover la peau, les vaisseaux sanguins, les muscles, les viscères, etc.

Le SNP comprend d'une part des voies sensibles ou afférentes, qui acquièrent et transmettent l'information interne et externe au SNC. Il comprend d'autre part des voies motrices ou efférentes, qui transmettent la réponse nerveuse aux stimuli.

Le SNP est divisé en parties somatique et autonome. La division somatique du SNP détecte les stimuli externes afférents et elle contrôle de façon efférente et volontaire les muscles squelettiques. La partie autonome est elle-même divisée en 2 : sympathique et parasympathique. La division autonome module les processus non soumis au contrôle volontaire, comme la vasomotricité. En outre, il est généralement accepté que le système sympathique mobilise l'énergie en période de stress et que le système parasympathique ait un effet contraire. Lorsque ces divisions innervent les mêmes cibles, leurs actions opposées contrôlent très précisément l'organe effecteur. Enfin, le SNP autonome comprend aussi l'innervation sensorielle viscérale.

Le contrôle du SNC est exercé par le biais des cellules spécialisées du SNP soient les cellules neurales, qui comprennent les neurones et les cellules gliales.

1.3.2 Organisation du système nerveux périphérique somatique sensoriel

Les corps cellulaires des neurones sensoriels sont regroupés dans des ganglions nerveux. Ces ganglions sont répartis le long de la moelle épinière et dans la région de l'encéphale. Les ganglions trigéminaux innervent le visage et le cou. Les ganglions de la racine dorsale de la moelle épinière (*spinal cord dorsal root ganglia*; DRG) innervent le tronc et les membres (Figure 1-8). Ces neurones projettent leurs axones vers la périphérie sur des distances impressionnantes, parfois plus d'un mètre chez l'homme. Leurs fibres nerveuses sont regroupées en faisceaux entourés de gaines conjonctives et ils sont regroupés dans les nerfs spinaux (Figure 1-8). L'humain possède un total de 31 paires de nerfs spinaux, de la première vertèbre cervicale jusqu'à la seconde vertèbre lombaire. Ils joignent la moelle épinière et s'arborescent simultanément dans les tissus périphériques où ils forment parfois des plexus très denses. Le nerf sciatique est le nerf le plus imposant. Avec un diamètre de 1,5 cm chez l'homme, il s'étend du bassin jusqu'en haut du genou.

Les nerfs périphériques contiennent à la fois des fibres motrices et sensorielles, des petits vaisseaux sanguins et du tissu conjonctif. De plus, ils contiennent des cellules de soutien très importantes pour l'homéostasie des neurones, soient les cellules de Schwann. Les cellules de Schwann sont presque toujours associées aux fibres nerveuses périphériques.

Elles produisent, entre autres, une couche isolante appelée gaine de myéline sur les fibres de diamètre suffisant.

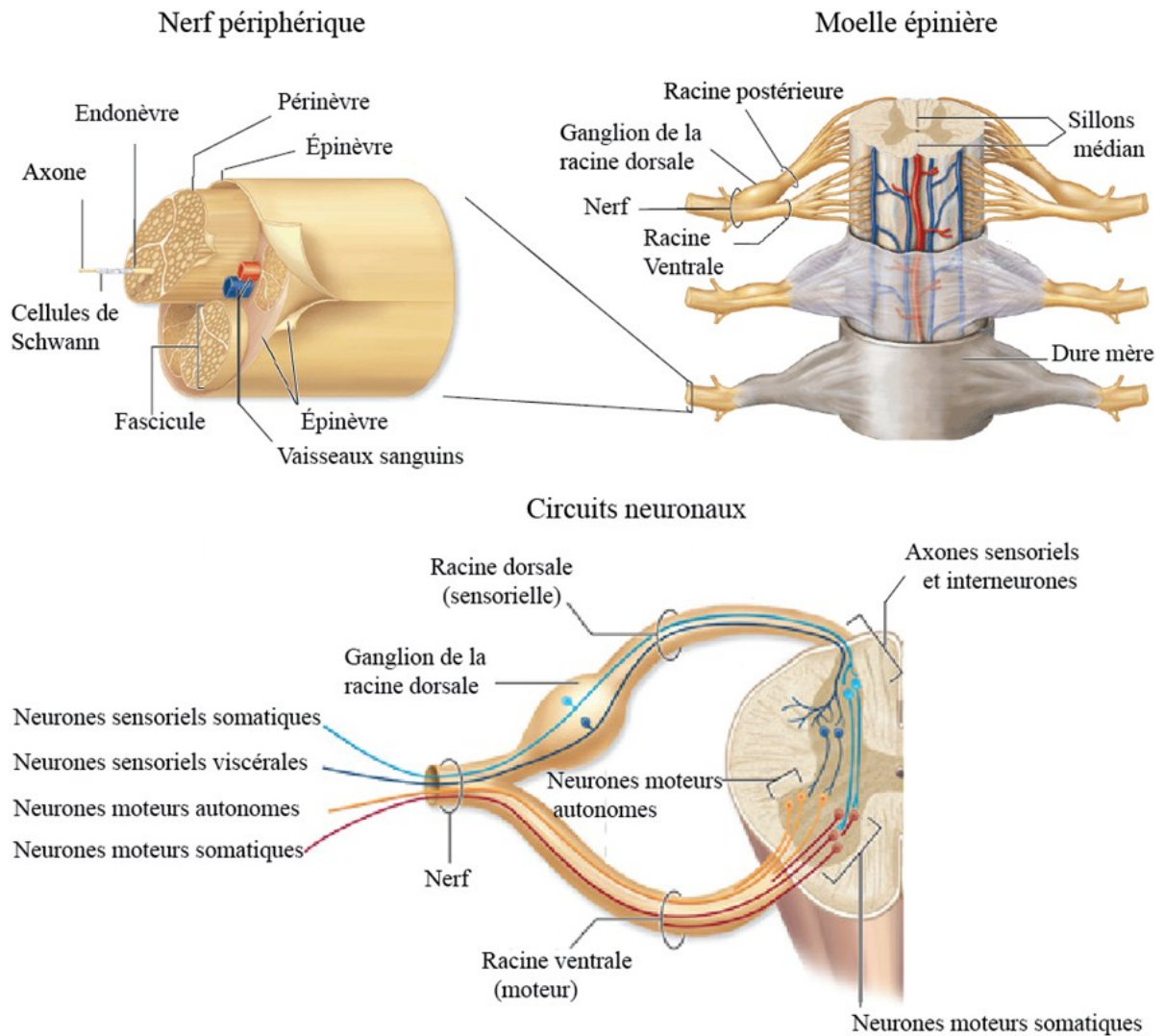


Figure 1-8. Représentation schématique de la moelle épinière, d'un nerf et des circuits neuronaux relatifs aux DRG à l'interface des SNP et SNC. Modifiée de [231].

1.3.3 L'innervation sensorielle somatique cutanée

Les fibres nerveuses cutanées peuvent être mises en évidence par immunodétection sur coupe de tissu grâce à différents marqueurs. Les marqueurs du cytosquelette sont notamment utilisés, dont le filament intermédiaire de type neurofilament M (NFM). Les fibres de fort calibre peuvent avoir en plus le neurofilament H. La β -Tubulin III et MAP1B, des protéines associées au cytosquelette de microtubules, sont deux autres excellents marqueurs des fibres cutanées [232]. Enfin, la grande majorité des fibres afférentes sensorielles cutanées sont immunoréactives pour le *ubiquitin hydrolase protein gene product 9.5* (PGP 9.5) [232, 233].

Les fibres nerveuses cutanées proviennent soit du système somatique sensitif soit du système nerveux autonome, particulièrement de la branche sympathique. Les fibres autonomes cutanées influencent principalement la thermorégulation par l'intermédiaire des vaisseaux sanguins et des glandes sudoripares. Elles ne seront pas abordées (pour une revue, voir [234]).

En provenance des DRG, les nerfs sensitifs entrent dans le gras sous-cutané, se subdivisent et forment un plexus dense dans l'hypoderme et le derme profond. Il en émerge de plus petits nerfs et des fibres longeant souvent le réseau microvasculaire. Ils forment un autre plexus plus fin et moins dense à la jonction des dermes réticulaires et papillaires. La majorité des fibres cutanées aboutissent dans le derme moyen et dans les papilles dermiques. Le réseau nerveux sensoriel cutané est très complexe et est alimenté par plusieurs types de fibres nerveuses. De plus, la distribution de ces fibres et leurs terminaisons varient selon la position anatomique et selon que l'on soit dans la peau glabre, velue, ou limitrophe aux muqueuses.

Les fibres sensorielles forment des terminaisons nerveuses libres, dilatées, et corpusculaires [235, 236]. Les terminaisons libres aboutissent dans le derme et dans les gaines épithéliales des poils. De plus, certaines ramifications libres et très fines se prolongent entre les kératinocytes, jusqu'à la couche cornée [237, 238]. Ces ramifications épidermiques ont une densité très variable selon le site anatomique. Elles varient de 12 à 114 fibres par mm^2 et il y a une corrélation entre leur densité et la densité nerveuse du derme sous-jacent [239-243].

Les terminaisons dilatées sont des fibres aplaties en forme de pointes. Elles peuvent atteindre 300 μm de long par 5 μm de large. Elles sont entourées de cellules de Schwann aplaties sur chaque face. Elles sont disposées en palissade autour des poils et elles innervent également des cellules spécialisées appelées cellules de Merkel, localisées dans la couche basale de l'épiderme (Figure 1-10) [235].

Les terminaisons corpusculaires sont de grandes structures agissant soit comme amplificateur soit comme filtre pour un stimulus particulier. Elles sont généralement constituées de cellules de Schwann, de tissus conjonctifs lamellaires et une fibre nerveuse la pénètre. Cette fibre est simplement dilatée ou au contraire elle s'arborise dans le corpuscule. De plus, certains de ces corpuscules, soient ceux de Pacini, sont microvascularisés [236].

Une certaine innervation sensorielle vasculaire non somatique existe. Elle détecte entre autres les variations de la pression artérielle, la teneur en oxygène et les variations de pH. Cependant, aucune fibre sensorielle avec de telles fonctions et localisée précisément dans le réseau microvasculaire cutané n'a été décrite. Néanmoins, des fibres sensorielles cutanées innervent bien le réseau microvasculaire. En effet, cela a été décrit récemment au niveau de la lèvre inférieure chez le rat et le singe [244]. La lèvre inférieure est innervée par les ganglions trigéminaux et non par les DRG. D'autres études devront éventuellement compléter les connaissances morphologiques dans ce domaine.

1.3.4 Les neurones sensoriels

Les fibres nerveuses sont les prolongements d'un type cellulaire unique et très spécialisé : le neurone. Les neurones véhiculent des informations par le biais d'influx nerveux, soient des variations de potentiel électrique membranaire, ou potentiel d'actions, voyageant par la membrane plasmique. De plus, les neurones peuvent sécréter des neurotransmetteurs, ce qui leurs permettent d'interagir avec d'autres neurones ou avec des cellules cibles.

Un neurone est très polarisé. Il contient des organelles et des complexes protéiques restreints à des zones très précises. Un neurone typique comprend un corps cellulaire, 2

types de prolongements ou fibres soient l'axone et les dendrites, et des synapses (Figure 1-9). C'est dans le corps cellulaire que sont synthétisées la majorité des macromolécules. Pour les transporter aux fibres, l'axone est pourvu d'un important réseau de microtubules et de neurofilaments. Sur celui-ci des molécules-cargos, soient les kinésines et dynéines, accomplissent ce transport antérograde. De plus, il se fait également un transport rétrograde, soit vers le corps cellulaire. Ainsi, les fibres transportent des organelles et des macromolécules usées aux terminaisons par transport rétrogrades. Elles transportent de plus des signaux instructifs solubles captés par endocytose aux tissus innervés de façon rétrograde. Les fibres contiennent aussi de très nombreuses mitochondries qui reflètent le métabolisme élevé des neurones [245]. La zone synaptique est une autre partie importante du neurone. Il s'agit d'une région établissant un contact fonctionnel avec un autre neurone ou un effecteur. Enfin, les dendrites constituent l'élément postsynaptique. Ils reçoivent des signaux via les synapses et ils conduisent l'impulsion nerveuse générée au niveau synaptique vers le corps cellulaire.

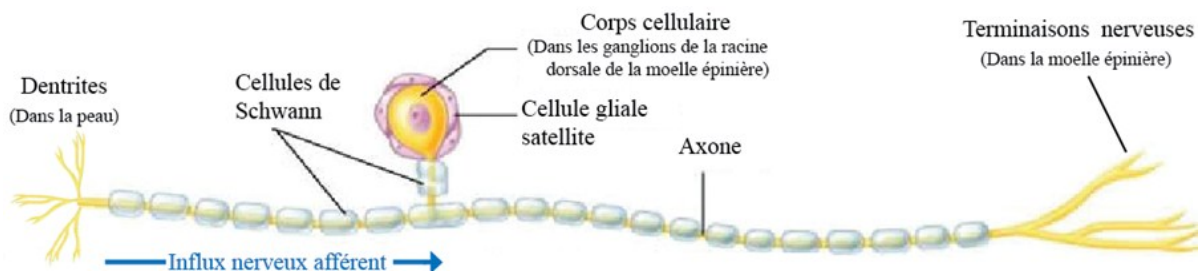


Figure 1-9. Neurone sensoriel du SNP.
Modifiée de [246].

Les neurones sensoriels sont pseudo-unipolaires : les deux branches de l'axone se fusionnent et émergent du corps cellulaire en un seul prolongement. Ils envoient ce prolongement à la fois dans le SNC et le SNP. Les dendrites agissent comme des récepteurs spécialisés avec, pour afférence, l'information sensorielle détectée le plus souvent dans la peau. Un message détecté aux terminaisons sensorielles libres, dilatées ou corpusculaires transite sous forme d'influx nerveux à travers l'axone jusqu'à la moelle épinière, d'où il sera transmis via une synapse aux dendrites d'un autre neurone.

Il y a plusieurs sous-populations de neurones somatiques sensoriels dans les DRG. Elles se distinguent notamment par leur fonction physiologique, leurs protéines de détection [247], leurs types de fibres, leurs compositions cytosquelettiques [248, 249], leurs neurotransmetteurs [250, 251] et par d'autres particularités. En particulier, selon des critères physiologiques les neurones sensoriels sont divisés en 3 groupes : mécanorécepteurs, thermorécepteurs et nocicepteurs. En dépit de cette complexité qui sera approfondie plus loin, il est généralement accepté que les plus gros neurones sensoriels innervent les muscles et les articulations, que les neurones moyens innervent les mécanorécepteurs, et que les plus petits neurones sont des thermocepteurs et des nocicepteurs [252]. Enfin, les neurones sont associés à des cellules gliales de soutien, notamment avec des cellules de Schwann dans les nerfs périphériques. Les corps cellulaires des neurones dans les DRG sont également en présence d'un autre type de cellules gliales, les cellules gliales satellites [253].

1.3.5 Les types de fibres nerveuses cutanées

Depuis les ganglions de la racine dorsale, les fibres sensorielles quittent les nerfs rachidiens pour former une arborescence nerveuse très ramifiée, notamment dans la peau. Les fibres se distinguent par leur vitesse de conduction ainsi que leur diamètre et elles sont classées selon ces critères. En ordre décroissant de diamètre et de vitesse, les fibres cutanées comprennent les myélinisées A β (6 à 12 μm ; 35 à 75 m/s), les myélinisées de type A δ (1 à 5 μm ; 4 à 30 m/s) et les non myélinisées de type C (0,2 à 1,5 μm ; 0,5 à 2,0 m/s) [254]. De plus, des fibres somatiques sensorielles de plus grand calibre sont classifiées de type A α et elles innervent principalement les articulations et les muscles (plutôt que la peau).

L'information provenant des mécanorécepteurs de la peau est généralement transmise par des fibres A β . Elles représentent une faible proportion des fibres émergeant des DRG vers la périphérie [255]. L'information provenant des thermocepteurs et des nocicepteurs est souvent transmise par des fibres A δ . Ces dernières représentent un peu moins de 80 % des fibres émergentes des DRG vers la périphérie. En outre, environ 20 % des fibres A δ sont des mécanorécepteurs et les autres sont des thermorécepteurs et des nocicepteurs.

Enfin, les fibres C représentent un peu moins de 20 % des fibres émergentes des DRG vers la périphérie. Cependant, elles peuvent s'arboriser dans les tissus périphériques pour y représenter une plus forte proportion localement. Environ 90 % des fibres C sont des nocicepteurs et environ 70 % des fibres C sont peptidergiques [255]. Ainsi, les fibres C sont classifiées en peptidergiques et non peptidergiques selon qu'elles produisent ou non de petits peptides, ou neuropeptides, qu'elles utilisent comme neurotransmetteurs (Tableau 1). Certaines fibres A δ pourraient également libérer des neuropeptides [255].

Tableau 1-1 : Caractéristiques de deux populations de fibres C.
Modifié de [230].

	Peptidergique	Non-peptidergique
Vitesse de l'influx	0,5 m s ⁻¹	1 m s ⁻¹
Diamètre	0,3–1,0 μ m	0,3–1,0 μ m
Localisation épidermique	Jusqu'à la couche épineuse	Jusqu'à la couche cornée
Récepteurs exprimés	trkA, p75, familles TRPs	c-RET, liaison Isolectin B4, Mrgprd, TrpV1
Neurotransmetteurs	Peptidergiques	Non-peptidergiques
Dépendance trophique	NGF	GDNF
Stimuli détectés	Froid, chaud, démangeaisons, excès de chaleur	Stimuli mécaniques, réchauffement léger, douleur

1.3.6 Les neuropeptides

Une conséquence possible de la dépolarisation des fibres peptidergiques est la libération de petits peptides appelés neuropeptides [255]. Les neuropeptides peuvent être relâchés dans la moelle épinière où ils sont des neurotransmetteurs. Ils peuvent aussi être relâchés en périphérie où ils sont des signaux instructifs influençant les cellules exprimant leurs récepteurs. Plusieurs dizaines de neuropeptides ont été identifiés à ce jour, dont la substance P (SP), le *calcitonin-gene related peptide* (CGRP), le *vasoactive intestinal peptide* (VIP), le *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide* (PACAP) et la somatostatine (SST). La colocalisation de certains neuropeptides permet de distinguer différentes sous populations de fibres peptidergiques. Par exemple, certaines fibres sont immunoréactives pour la SP et le CGRP [256], d'autres pour la SP et PACAP [257] et d'autres encore pour le CGRP et la SST [258]. Cependant, l'origine de ces sous-populations n'est pas bien comprise actuellement [255].

Les neuropeptides sont exclusivement produits dans le corps cellulaire puis ils sont transportés et entreposés temporairement aux terminaisons cutanées dans de grandes vésicules à noyau dense. Ces vésicules contiennent également des enzymes qui libèrent le neuropeptide bioactif à partir du précurseur. Lorsqu'il y a libération de neuropeptides, cela implique généralement : la dépolarisation du neurone, l'ouverture de canaux à Ca^{2+} (section 1.3.9.1), l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , la fusion des vésicules de neuropeptides à la membrane, leur exocytose, la diffusion des neuropeptides et la liaison des neuropeptides par un récepteur sur une cellule cible [259]. Les récepteurs aux neuropeptides sont des récepteurs couplés aux protéines G dans 80 % des cas [260]. En outre, les neuropeptides agissent typiquement à très faible concentration, soient de l'ordre du nmol/L. De plus lorsqu'ils sont libérés, ils sont rapidement dégradés s'ils ne sont pas liés par un récepteur spécifique. Les enzymes *neutral endopeptidase* (NEP) et *angiotensin-converting enzyme* (ACE) sont responsables de la dégradation rapide des neuropeptides dans la peau [261].

1.3.7 La détection sensorielle somatique

La détection sensorielle somatique est divisée en 4 modalités majeures. Premièrement, le toucher discriminatif est la reconnaissance des textures, grandeurs et formes. Deuxièmement, la proprioception est la reconnaissance du mouvement et de la position du corps. Elle implique notamment des terminaisons dans les muscles et les articulations. Troisièmement, la nociception est perçue sous forme de douleur ou de démangeaison et elle informe d'un traumatisme. Finalement, la thermoception est la reconnaissance de la chaleur et du froid. Toutes ces modalités sont détectées, encodées et transmises au SNC par des neurones sensoriels distincts dans les DRG. Ceux-ci sont également appelés récepteurs sensoriels (RS) [254]. Les stimuli excitent les RS directement ou par l'intermédiaire de cellules ou de structures réceptrices.

Les sensations sont perçues grâce au traitement que fait le SNC de 4 types d'informations transmises par les RS : la modalité, la localisation, l'intensité et le rythme. Ces informations

sont détectées et encodées sous forme d'influx nerveux par les RS. Il s'agit d'un encodage sur la base de variations du potentiel électrique membranaire des fibres nerveuses [254].

1.3.8 Les récepteurs sensoriels cutanés

Les stimuli provoquent souvent l'excitation de plusieurs types de RS simultanément tout en inhibant l'activité basale des RS non stimulés adjacents. Cela augmente le contraste sensoriel [254]. Dans les prochaines sections, les mécanorécepteurs, thermorécepteurs et nocicepteurs seront brièvement décrits.

1.3.8.1 Les mécanorécepteurs

Les mécanorécepteurs détectent les stimuli mécaniques [262, 263]. Les terminaisons cutanées des mécanorécepteurs sont libres, corpusculaires ou associées à des cellules de Merkel ou aux follicules pileux. Ils sont sensibles à différents stimuli mécaniques et ils diffèrent par leurs distributions, leurs structures, leurs champs récepteurs et leurs réponses aux stimuli. D'une part, certains ont un seuil d'excitabilité bas et répondent rapidement à un stimulus (adaptation rapide). Cependant, ils s'arrêtent aussitôt si le stimulus perdure. Ces récepteurs sont typiquement sensibles au mouvement. La fréquence et la durée de l'influx nerveux reflètent la vitesse du mouvement et sa durée. Ces mécanorécepteurs signalent notamment les impacts, l'effleurement, la palpation, la friction, et la vibration. D'autre part, certains mécanorécepteurs ont un seuil d'excitabilité élevé, mais répondent constamment à une stimulation continue. Ce sont les RS à adaptation lente [254]. Ils signalent la pression et la forme d'un objet par une fréquence d'influx proportionnelle au renforcement appliqué au récepteur (Tableau 1-2).

Les mécanorécepteurs superficiels sont souvent associés à des fibres qui innervent simultanément plusieurs mécanorécepteurs de même type. Les mécanorécepteurs profonds sont plutôt innervés par une fibre dédiée. Parmi les terminaisons corpusculaires, on trouve les corpuscules de Messner, localisés dans les crêtes des papilles dermiques. Il y a également les terminaisons de Rufini et le corpuscule de Pacini, localisés dans le derme profond. Ils distinguent différents stimuli mécaniques avec des adaptations différentes (Figure 1-10 et Tableau 1-2) [264, 265]. On trouve aussi les cellules de Merkel, des cellules

neuroépithéliales localisées dans la couche basale de l'épiderme ou près des follicules pileux.

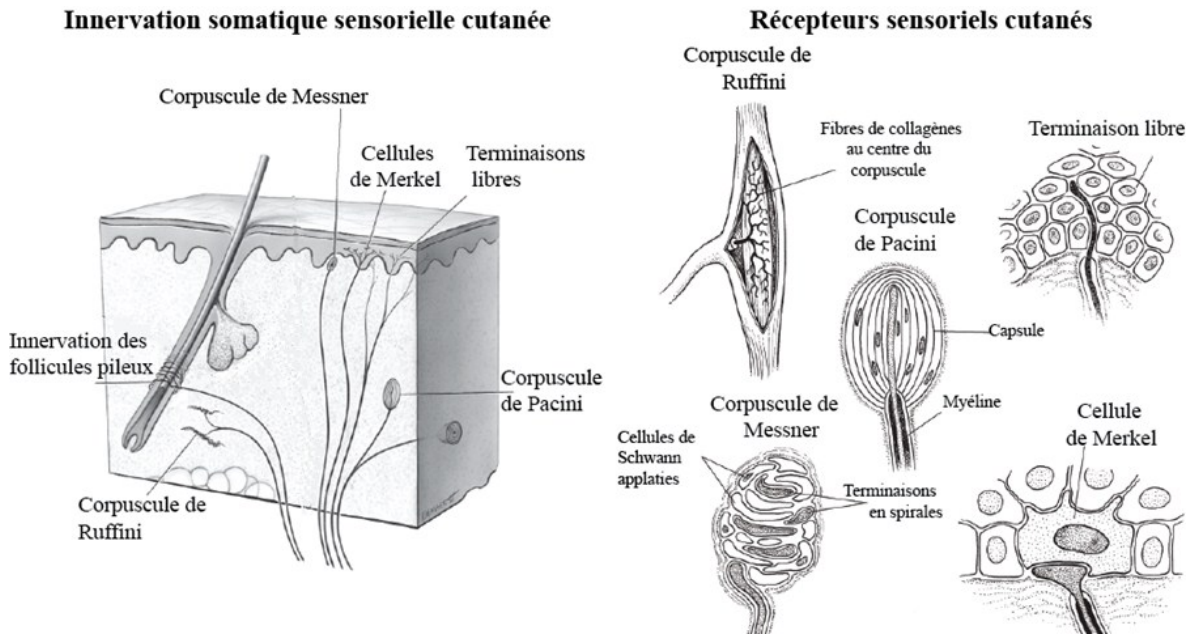


Figure 1-10. Représentation de divers types de récepteurs sensoriels dans la peau. Modifiée de [266].

Les cellules de Merkel expriment des kératines et des desmosomes et relâchent notamment des neurotransmetteurs pouvant être captés par la terminaison qui les innervent [267-269] (Tableau 1-2). Un groupe de 10 à 25 cellules de Merkel est généralement innervé par une seule et même fibre [262, 268, 270, 271]. En outre, les cellules de Merkel sont plus abondantes au niveau des lèvres, des paumes, de la pulpe des doigts et du dos des pieds. Elles forment parfois un disque (disque de Pinkus) au niveau des lèvres et de la pulpe des doigts [17].

Les follicules pileux font aussi partie des mécanorécepteurs. Chez les mammifères, on trouve ceux de la peau velue et ceux de garde. Les premiers sont innervés par des terminaisons A β et A δ ainsi que par des terminaisons lancéolées disposées en palissades autour d'eux. Les seconds sont joints par des terminaisons de fibres A δ et C, des fibres associées à des cellules de Merkel, des terminaisons lancéolées en palissades et des

corpuscules de Ruffini [252]. À l'exception des terminaisons libres qui peuvent agir comme nocicepteur, l'innervation des follicules pileux dépendrait surtout des mécanorécepteurs à adaptation rapide et lente [252, 262]. Ils répondent aux mouvements du poil qui les étirent, les déforment ou les aplatissent [272, 273]. Enfin, les mécanorécepteurs comptent aussi des terminaisons libres non myélinisées. Elles sont présentes dans la peau velue, mais pas dans la peau glabre. Elles captent des sensations plaisantes associées à l'effleurement [274].

1.3.8.2 Les thermorécepteurs

Les thermorécepteurs sont des terminaisons libres de types C et A δ détectant la chaleur, le réchauffement, le refroidissement et le froid. Alors que les mécanorécepteurs non stimulés sont silencieux, les thermorécepteurs du chaud et du froid transmettent constamment, mais leurs activités varient. Ceux du froid répondent entre 5 et 40 °C avec une activité dépendante de la température. Cette activité est distribuée en cloche et elle est maximale à 25 °C. Ceux du chaud répondent plutôt progressivement de 29 à 45 °C avec une réponse maximale à 45 °C. En outre, le refroidissement ou le réchauffement augmente la fréquence des influx des récepteurs du froid ou du chaud respectivement tout en inhibant leurs récepteurs opposés. De plus, la vitesse et l'amplitude du refroidissement ou du réchauffement sont encodées proportionnellement dans la fréquence de l'influx nerveux. Ainsi, si la nouvelle température est maintenue, les récepteurs s'adaptent et leurs taux de décharge diminuent. Pour déterminer efficacement la température, le SNC doit intégrer l'activité des différentes populations de thermorécepteurs. De plus, à des températures extrêmes, l'humain perçoit de la douleur plutôt que de la chaleur ou du froid [275, 276].

Tableau 1-2 : Les récepteurs sensoriels cutanés.
Modifié de [254].

Types de récepteurs	Modalités et particularité	Groupes de fibres
Mécanorécepteurs cutanés	Toucher	
Corpuscules de Meissner	Changement de pression, texture vibrations de 20-50 Hz, frôlement, caresse, adaptation rapide, présents uniquement dans la peau glabre	A β
Corpuscules de Pacini	Pression, vibrations de 200-300 Hz, champ de détection large, adaptation rapide, peuvent atteindre 2 mm de long, microvascularisé	A β
Terminaisons de Ruffini	Forme, pression et étirement continu, vibrations de 5-15 Hz, adaptation lente, champ de détection très large	A β
Disques de Merkel	Pression, texture, forme, sensible au pourtour, vibrations de 5-15 Hz, adaptation lente, champ de détection très petit, cellule épithéliale	A β
Récepteurs des poils Terminaisons libres	Frôlement, caresse, adaptation rapide et lente Éffleurement, présentes uniquement dans la peau velue	A β et A δ C
Thermorécepteurs	Température	
Récepteurs du froid	Refroidissement (25°C)	A δ
Récepteurs du chaud	Réchauffement (41°C)	C
Nocicepteurs du chaud	Chaud (>45°C)	A δ
Nocicepteurs du froid	Froid (<5°C)	C
Nocicepteurs	Douleur	
Mécaniques	Aiguë, picotement	A δ
Thermiques et mécaniques	Brûlante	A δ
Thermiques et mécaniques	Glaciale	C
Polymodaux	Lente, brûlante	C

1.3.8.3 Les nocicepteurs

Les nocicepteurs sont des fibres de type C et A δ qui détectent les stimuli engendrant la douleur. Il y a des nocicepteurs mécaniques, thermiques, et polymodaux. Premièrement, les nocicepteurs mécaniques sont caractérisés par un seuil d'activation élevé. Leur fréquence augmente avec la qualité destructrice du stimulus. Ils sont myélinisés et donc très rapides. Ensuite, les nocicepteurs thermiques, qui en plus d'être excités par des stimuli mécaniques forts, peuvent répondre aux températures extrêmes. Notamment, certains s'activent au-delà de 45°C et d'autres sous les 5°C. Enfin, les récepteurs polymodaux forment la plus grande partie des nocicepteurs. Ils sont activés par une grande variété de stimuli nocifs mécaniques, thermiques et chimiques. Leur activation induit une douleur lente, lancinante et brûlante [277-279].

1.3.9 Bases moléculaires de la détection sensorielle

1.3.9.1 Le potentiel de membrane et la dépolarisation neuronale

La polarisation de la membrane du neurone et sa dépolarisation suivant un stimulus sont des mécanismes fondamentaux de la transmission nerveuse. La membrane plasmique interne est relativement négative à l'état de repos. Cela repose sur la répartition inégale des ions Na^+ et K^+ sur la membrane plutôt que sur une différence marquée entre leurs concentrations intracellulaires et extracellulaires [280].

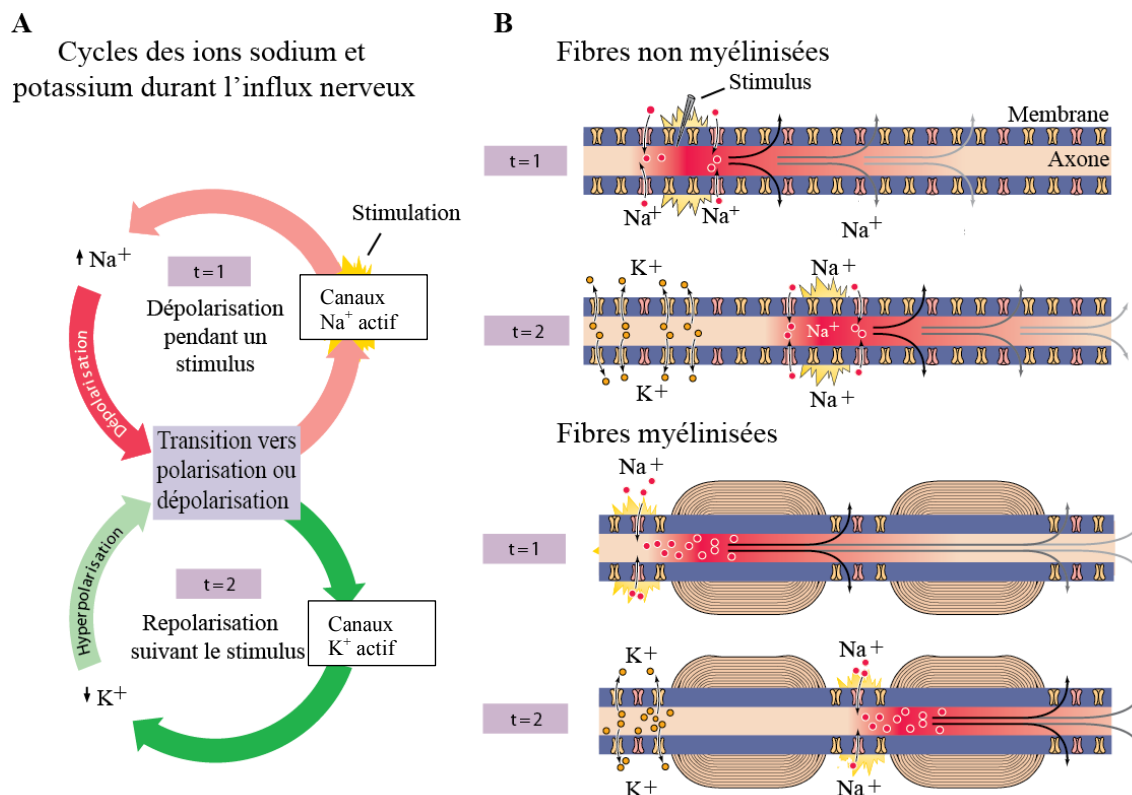


Figure 1-11. Schéma du cycle des ions sodium et potassium durant la dépolarisation neuronale (A) et illustration des mouvements ioniques à la membrane neuronale lors d'une dépolarisation pour les fibres myélinisées et non myélinisées (B). Modifiée de [216].

La polarisation initiale dépend de pompes ioniques qui échantent 3 ions sodium (Na^+) intracellulaires pour 2 ions potassium (K^+) extracellulaires. Lors d'un stimulus, des ions sodium entrent dans l'axone. Ce changement provoque une diminution de la polarisation de la membrane. Lorsque le potentiel passe d'environ -75 millivolts (mV) à -55 mV, un

potentiel d'action est créé qui dépend de canaux sodiques voltage-dépendant. Il s'en suit une dépolarisation subséquente rapide atteignant ou dépassant 0 mV [246]. Devant celle-ci, une dépolarisation se crée qui active d'autres canaux sodiques voltage-dépendant en aval. Ce processus se répète encore en aval, déplaçant la dépolarisation (Figure 1-11). Les canaux sodiques à l'origine de l'influx cationique de départ sont désactivés et des canaux voltage dépendants rejetant le K^+ contribuent à la repolarisation. Les pompes ioniques permettent ensuite de rétablir les concentrations de Na^+ et de K^+ de part et d'autre de la membrane à l'état de repos.

Le déplacement du potentiel d'action s'effectue de façon continue sur les fibres non myélinisées. Pour les fibres myélinisées, les canaux sodiques voltage-dépendant sont regroupées aux nœuds de Ranviers, entre les gaines de myélines, plutôt que sur toute la longueur de la fibre [281, 282]. Entre les nœuds de Ranviers, les gaines de myélines isolent les fibres nerveuses, si bien que le potentiel d'action voyage par sauts entre les gaines de myélines. Le potentiel d'action voyage ainsi plus rapidement sur les fibres myélinisées A β et A δ (Figure 1-11 B) [246].

Le potentiel membranaire varie en amplitude et en fréquence. Ce sont ces variations qui forment le code complexe reflétant la modalité, la localisation, le rythme et l'intensité d'un stimulus. Cela réfère aux propriétés électrophysiologiques des différentes populations neuronales. La complexité de l'analyse de ces signaux par le SNC est accrue par le fait qu'un même stimulus engendre l'activation et la transduction de plusieurs récepteurs sensoriels cutanés simultanément [216].

Il existe plusieurs types de courant et de canaux ioniques. Ils sont caractérisés par le type d'ions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-), le voltage, le décours temporel et la sensibilité aux seconds messagers. Parmi eux, les canaux à Ca^{2+} sont activables par la dépolarisation elle-même. Ils contribuent à titre de second messenger à différents processus dont notamment à l'induction de la relâche des vésicules de neurotransmetteurs et neuropeptides. Les neuropeptides peuvent être relâchés directement dans la peau.

1.3.9.2 Les protéines servant à la détection sensorielle

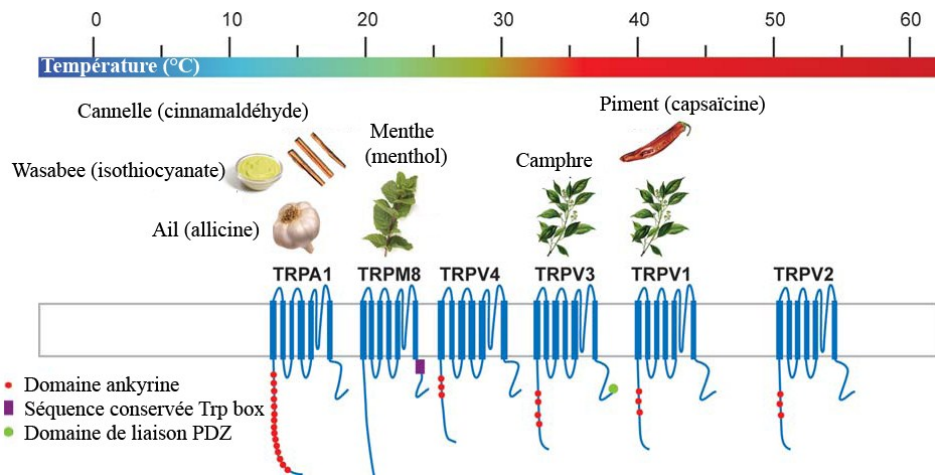


Figure 1-12. Illustration de certains récepteurs TRP impliqués dans la thermoception ainsi que la nociception et identification de composés naturels pouvant les activer. Modifiée de [283].

La détection sensorielle cutanée repose souvent sur des canaux ioniques permettant ou non l'entrée d'ions induisant la dépolarisation. Des mécanismes d'inhibition et de sensibilisation complexes influencent ce processus. Ces canaux confèrent largement les spécificités de détection des sous-populations de neurones sensoriels des DRG qui les expriment. Parmi ces canaux, la famille de récepteurs *transient receptor potential* (TRP) est généralement perméable aux ions Na^+ et Ca^{2+} . Notamment, le récepteur TRP de type V1 (TRPV1) est présent sur les fibres A δ et C. Il est activé à une température seuil de 42 °C (Figure 1-12) [284]. Le TRPV1 est aussi sensible aux chocs osmotiques, aux protons et à la capsaïcine, une neurotoxine à l'origine de la détection du goût piquant du piment. Ainsi, la capsaïcine induit la dépolarisation des fibres exprimant le TRPV1 et la relâche de neuropeptides dans la peau [255]. En plus du TRPV1, plusieurs autres TRP détectent une large gamme de stimuli. Parmi eux, le TRPM8 est un thermorécepteur actif sous les 30°C et qui est aussi activé par le menthol [285, 286]. Également, le TRPA1 est activé par l'ail (allicine), la cannelle (cinnamaldéhyde) et le wasabi (isothiocyanate) [283]. Enfin, d'autres TRP répondent à des stimuli mécaniques comme l'étirement [247].

1.3.10 Les cellules de Schwann

Les cellules de Schwann (CS) sont des cellules neurales de soutien très importantes pour les neurones. Elles favorisent leur développement, maintiennent leur intégrité fonctionnelle et structurale, influencent le transport dans l'axone et favorisent la régénération nerveuse lors de traumatisme [282, 287-289]. Dans le PNS, les CS sont beaucoup plus nombreuses que les neurones et contrairement à ces derniers, elles peuvent proliférer. C'est pourquoi il est par exemple possible d'établir et d'amplifier expérimentalement des lignées de CS, notamment à partir de culture de nerfs en explants [290]. Les CS constituent environ 75 % des cellules résidentes des nerfs périphériques et sont rarement absentes des fibres nerveuses [291].

Il y a 5 types de CS dans le SNP : immatures, myélinisantes, non myélinisantes, associées aux jonctions neuromusculaires et associées aux terminaisons des récepteurs sensoriels (Figure 1-13). Les CS immatures sont prolifératives. Éventuellement, elles adopteront un phénotype spécialisé lié au contact neuronal. En son absence, elles perdureront un certain temps puis elles finiront par disparaître [292]. Les CS immatures sont présentes durant le développement ou proviennent de la dédifférenciation de CS spécialisées ayant perdu le contact neuronal.

Les CS myélinisantes sont associées à seulement un axone de 1 μm et plus. Elles l'entourent plusieurs fois d'une extension de leur membrane plasmique. Cette extension exclut la presque totalité du cytoplasme, comme un ballon rempli d'air enroulé sur un tube. Ces CS synthétisent une membrane basilaire et de la myéline. Cette dernière isole l'axone, ce qui permet une transmission plus rapide de l'influx nerveux (Figure 1-11). Une CS synthétise un seul segment de myéline et il faut donc plusieurs CS pour myéliniser toute une fibre. En plus d'isoler électriquement l'axone, il fut démontré chez le zebrafish que les CS inhibent le regroupement des canaux à Na^+ hors des nœuds de Ranvier ce qui optimise la conduction rapide et par sauts de l'influx nerveux [293].

Les CS non myélinisantes s'associent à une fibre de moins de 1 μm ou à plusieurs fibres simultanément et produisent autour de chaque fibre une membrane basilaire prémunissant les différentes fibres de contacts non désirés entre elles [294]. Dans le nerf sciatique de souris, il y a environ 8000 axones non myélinisés pour 5000 axones myélinisés [295, 296].

Les CS associées aux jonctions neuromusculaires entourent les terminaisons et les boutons synaptiques. Elles synthétisent elles aussi une membrane basilaire [294]. De plus elles modulent la fonction synaptique en participant entre autres à l'élimination rapide des neurotransmetteurs [297].

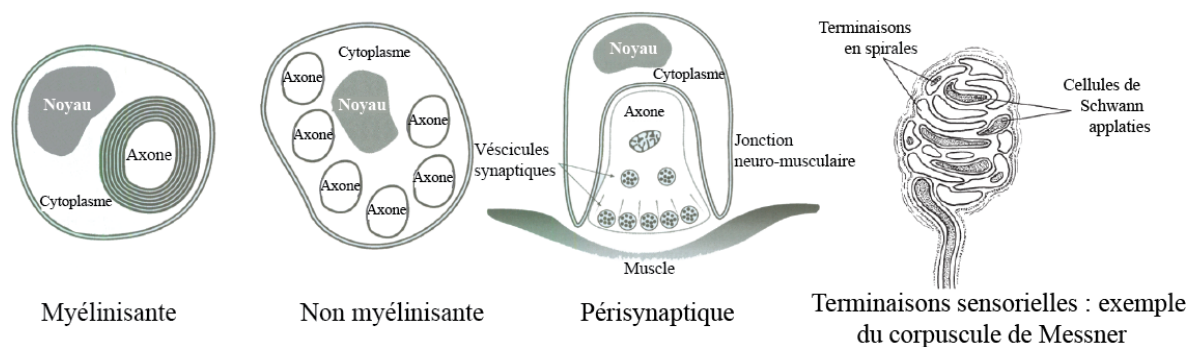


Figure 1-13. Les différentes spécialisations des cellules de Schwann. Modifiée de [266] et [294].

Enfin, les CS des terminaisons sensorielles peuvent être comparées sur certains points à celles des jonctions neuromusculaires [298]. En outre, elles réagissent à la fonction nerveuse et cela se reflète notamment par une augmentation de leur calcium intracellulaire [299]. De plus, elles seraient aussi à l'origine de l'enveloppe lamellaire de certains mécanorécepteurs. Il y aurait entre 140 et 300 cellules de Schwann associées aux terminaisons nerveuses par mm^2 de peau [300].

1.3.10.1 La membrane basilaire des cellules de Schwann

La membrane basilaire des fibres nerveuses est synthétisée par les CS. Le contact avec un neurone est obligatoire pour sa production [301]. Elle maintient l'intégrité structurale des fibres nerveuses [302, 303]. En outre, sa synthèse précède la myélinisation lorsqu'elle a lieu [304]. Elle est composée entre autres de laminines 2 et 8, d'héparan sulfate protéoglycane, de nidogène, de collagène IV, V et XV et de fibronectine [305-308]. Les CS

expriment un certain nombre de récepteurs cellulaires d'adhésion à cette membrane. Notamment, des molécules d'adhésions pour la laminine 2 sont exprimées sur les CS durant leur changement de phénotype et leur spécialisation. Tout d'abord, l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ apparaît dans les CS immatures. Puis, s'ajoutent l' $\alpha 6\beta 4$, l' $\alpha 7\beta 1$ ainsi que le dystroglycan dans les CS myélinisantes et non myélinisantes. Enfin, s'ajoute l' $\alpha 1\beta 1$ pour les CS non myélinisantes [309-311]. De plus, les CS peuvent exprimer entre autres les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ pour la laminine, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha V\beta 3$ liant la fibronectine, $\alpha V\beta 8$ liant la fibrine et le glypican-1 liant le collagène V($\alpha 4$) [312-316]. Les composantes de la membrane basilaire sont également importantes pour l'adhérence et la migration des fibres nerveuses.

1.3.10.2 La gaine de myéline

La myéline est une couche isolante qui facilite la conduction de l'influx nerveux. Son poids sec comprend 70 % de lipides, dont des cholestérols, des phospholipides, des glycolipides et des glycosphingolipides dont des galactosphingolipides. L'autre 30 % comprend des protéines très spécifiques et structurantes pour les multiples couches de myélines superposées [294]. La section de couches où la myéline est très compacte est l'internode. Elle est délimitée de part et d'autre des sections latérales moins compactes soient les paranodes. La CS accède à l'ensemble de la gaine de myéline par les incisions de Schmidt-Lanterman qui communiquent avec le cytoplasme. La gaine de myéline forme une structure observable en MET sur une coupe transversale de nerf, où elle apparaît comme une alternance de lignes foncées et claires espacées de 2 nm. L'épaisseur de la gaine dépend du diamètre de l'axone. En effet, le rapport entre la largeur de l'axone et l'épaisseur de la gaine de myéline demeure constant à 0,6 [317, 318]. Enfin, les nœuds de Ranvier sont les zones non myélinisées entre 2 CS (Figure 1-14). La distance séparant 2 nœuds de Ranvier a une longueur de 100 fois le diamètre de l'axone [319].

La plus abondante protéine de la gaine est la protéine P0. Elle constitue entre 50 et 70 % des protéines totales de la myéline du SNP [294, 320]. Son expression coïncide avec la formation de myéline compacte et ce processus implique une interaction homotypique entre les côtés extracellulaires des membranes apposées (Figure 1-14) [294, 321, 322]. La *myelin*

basic protein (MBP), qui constitue entre 5 % et 15 % des protéines totales de la myéline, attache les côtés cytoplasmiques. Ensuite, la protéine PMP22 est un partenaire dans la liaison des intégrines à la laminine de la membrane basilaire [294]. Puis, la protéine MAG est présente dans la membrane périaxonale de la myéline mature. Elle participe à la reconnaissance de l'axone; sa déficience entraîne chez la souris une atrophie de l'axone [323]. Enfin, la connexine 32 (Cx32) participe à la formation et à la maintenance de la gaine et à l'homéostasie des ions en formant notamment des jonctions communicantes à l'intérieur du feuillet de myélines [294].

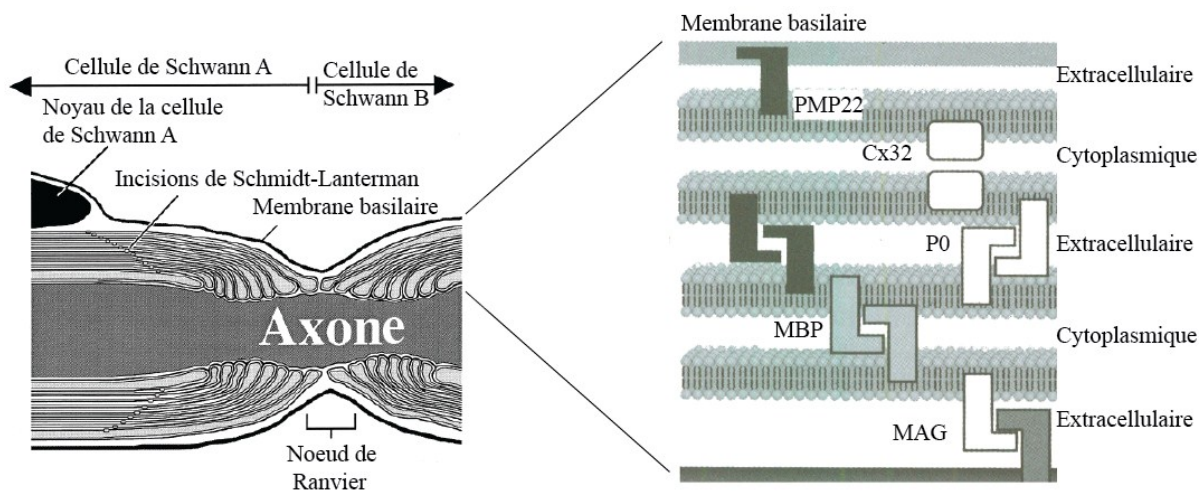


Figure 1-14. Représentation de la gaine de myéline d'un axone sur une coupe longitudinale et représentation des protéines structurantes. Modifiée de [294, 324].

1.3.10.3 La formation de la gaine de myéline

Le processus de formation de la gaine de myéline nécessite une interaction CS-axone initiale puis l'enroulement des CS sur l'axone.

L'interaction initiale et l'élongation des CS sur l'axone dépendent de protéines d'adhésion, notamment de la liaison d'une molécule d'adhésion L1 sur l'axone avec une autre sur la CS [325-327]. La CS entoure alors l'axone en creusant un sillon tout en se projetant pour l'entourer. Ensuite, les molécules d'adhésion *nectin-like* (necl) contribuent à la myélinisation. Ainsi, Necl-4 sur la CS lie Necl-1 sur l'axone et leurs absences inhibent la myélinisation [328].

L'enroulement de la CS sur l'axone et la formation de la gaine de myéline dépendent de la quantité de protéine neurégulin 1 de type III (NRG1-III) sur l'axone [329, 330]. Cette quantité est proportionnelle au diamètre de l'axone et elle dicte l'épaisseur de la gaine de myéline. En outre, la NRG1-III induit une augmentation du calcium intracellulaire et l'activation de la protéine calcineurine. Celle-ci induit la translocation au noyau des protéines NFAT, qui se complexent alors au facteur de transcription SOX-10. Les facteurs de transcription sont des protéines qui ont pour fonction d'activer ou d'inhiber l'expression d'autres protéines. Ainsi, le complexe NFAT-SOX-10 augmente l'activité de Krox20, qui module alors la transcription de gènes pour la production de la gaine de myéline [331]. Par ailleurs, la NRG1-III induit également la phosphorylation du facteur de transcription Yin Yang 1 (Yy1) qui active lui aussi la transcription de Krox20 [332]. En outre, l'inactivation de Krox20 empêche l'enroulement des CS autour des axones et bloque l'apparition des marqueurs de la myéline, ce qui inhibe sa formation [333]. D'autres facteurs tels que le *octamer-binding transcription factor 6* (Oct6) et la *brain 2 class III POU domain protein* (Brn2) sont aussi impliqués dans le processus de myélinisation [334].

Lors de l'étape d'enroulement de la CS sur l'axone, la CS subit des changements morphologiques majeurs. Cela implique une réorganisation importante du cytosquelette d'actine [335, 336]. La protéine N-Wasp est un acteur spécifique dans cette réorganisation du cytosquelette [337, 338]. La membrane plasmique des CS myélinisante est particulièrement imposante par rapport à celles des autres cellules, une conséquence de l'enroulement des CS [294]. Son développement dépend notamment de la polarisation des CS, un autre aspect essentiel à la myélinisation. [339, 340].

1.3.11 Développement embryonnaire du système nerveux

L'ectoderme est le tissu embryonnaire d'où proviennent les kératinocytes et les cellules neurales. La mise en place dans le mésoderme adjacent à l'ectoderme d'une structure tubulaire transitoire appelée notocorde marque le début de la neurulation [341-344]. C'est durant la neurulation que l'organogenèse du système nerveux débute. L'ectoderme s'épaissit alors pour former le plateau neurale, ou plaque neurale. La notocorde induit la

plaque neurale à se creuser longitudinalement en une gouttière pour ensuite se replier encore et former le tube neural (Figure 1-15). La partie caudale du tube neural deviendra la moelle épinière alors que la partie rostrale deviendra le cerveau. Les ganglions du SNP proviennent quant à eux de cellules aux marges de l'ectoderme neural et non neural. Ils migrent, entre autres, près du tube neural en direction ventrale pour former les DRG.

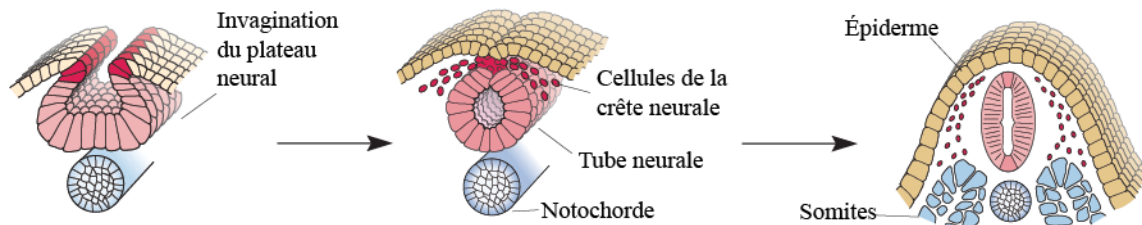


Figure 1-15. Formation du tube neural et migration des cellules de la crête neurale. Modifiée de [345].

1.3.11.1 La spécification neurale

La spécification neurale ou épidermique de l'ectoderme dépend de l'acquisition de l'identité des cellules de l'ectoderme et de la génération de cellules souches neurales [346-349]. Les différentes populations cellulaires de l'ectoderme sont spécifiées par un gradient de BMP et d'autres membres de la famille du TGF- β , dont l'activine [348, 350-355]. Une région organisatrice neurale produit des signaux neutralisant l'action de ces molécules pour permettre la spécification neurale. En effet, l'incubation des cellules de l'ectoderme en présence de BMP-4 inhibe leur spécification neurale et induit leur spécification épidermique [356]. À l'opposé, l'inhibition des BMP dans l'ectoderme induit l'expression des facteurs de transcription SOX2 et ZIC-R1, qui à leur tour activent des gènes de différenciation neurale tels que N-CAM [357].

D'autres signaux influencent la spécification neurale. Entre autres, la famille du FGF est requise pour que les antagonistes des BMP induisent l'expression de marqueurs neuraux [346, 358-360]. Le FGF serait important pour le développement de l'axe postérieur [361]. Également, la famille de facteurs solubles de Wnt réprime la transcription du Bmp [362-364]. Enfin, le *sonic hedgehog* (Shh) est sécrété par la notochorde et il contribue au développement ventral de la gouttière neurale (Figure 1-16) [361].

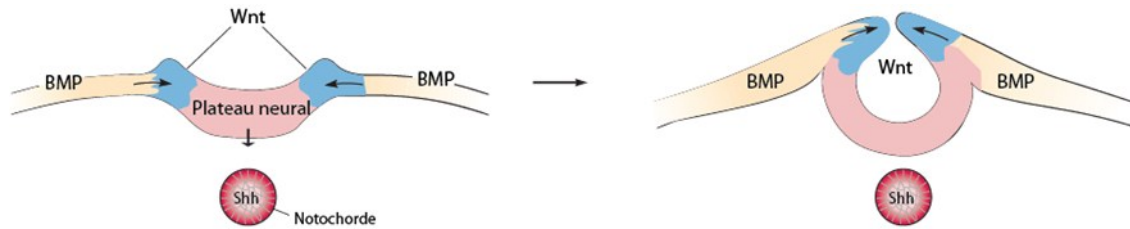


Figure 1-16. Influence du BMP, de Wnt et du Shh sur la formation du tube neural dans l'axe dorso-ventral.
Modifiée de [345].

1.3.11.2 Les cellules de la crête neurale

L'expression de plusieurs gènes est spécifique aux marges de l'ectoderme neural [365-370]. Cette différence est due, entre autres, à l'influence du FGF, du BMP et de Wnt. Les mécanismes régissant le développement embryonnaire activent l'expression de facteurs de transcription contrôlant la spécification des cellules de la crête neurale [371, 372]. Ces cellules acquerront une capacité de migration qui repose sur une réorganisation du cytosquelette d'actine, sur la perte de la polarité épithéliale ainsi que sur l'altération des adhésions cellulaires. Elles migreront pour former, entre autres, les ganglions nerveux et devenir les neurones sensoriels et les CS (Figure 1-15).

1.3.11.3 Formation des ganglions de la racine dorsale

Les cellules souches multipotentes de la crête neurale migrent largement dans l'embryon. Ensuite, elles se différencient en divers types cellulaires selon la séquence de signaux instructifs qu'elles rencontrent. Certaines qui migrent dans l'axe ventral deviendront, sous l'influence de Wnt sécrété par la partie dorsale du tube neural, les neurones sensoriels [345]. D'autres deviendront grâce à la NRG1 produite par les précurseurs neuronaux des CS.

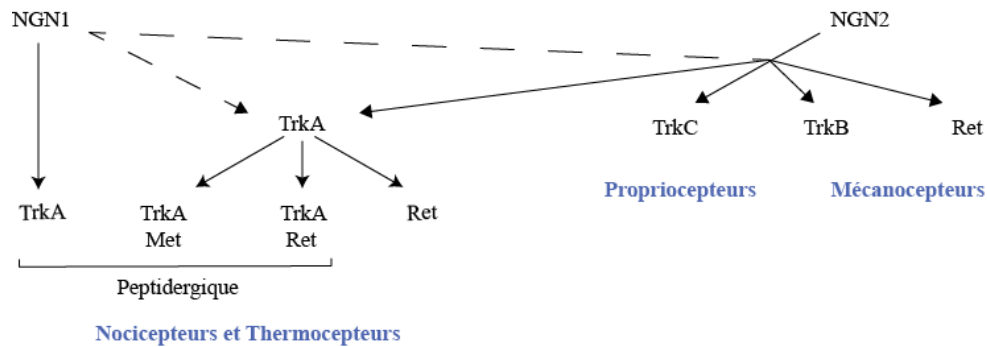


Figure 1-17. Influences croisées des facteurs de transcriptions Ngn1 et Ngn2 sur l'expression des récepteurs aux facteurs neurotrophiques TrkA, B et C, Ret et Met par les neurones sensoriels.

Les lignes pointillées indiquent une influence de second ordre. Modifiée de [373].

1.3.11.3.1 Différenciation en neurones sensoriels

Une première vague de cellules migratoires de la crête neurale devient les mécanorécepteurs formant surtout les fibres A β . Une deuxième et une troisième vague deviennent les thermorécepteurs et les nocicepteurs formant les fibres A δ et C. Cela repose sur l'influence des facteurs de transcriptions Ngn1 et Ngn2 (Figure 1-17) [374]. L'identité des neurones sensoriels est ensuite déterminée par des processus transcriptionnels complexes qui ne seront pas approfondis ici (voir [373, 375-377]). Ils contribuent à déterminer avec d'autres processus les récepteurs à facteurs neurotrophiques (FN) qui seront exprimés, dont les *tropomyosin-related kinase* (Trk). Ces récepteurs à FN sont d'une importance capitale. Leur élimination chez la souris induit la mort de 70 % des neurones sensoriels pour TrkA, 30 % pour TrkB et 20 % pour TrkC [345]. Ils contribuent fortement à l'identité des populations de neurones sensoriels en influençant de manière décisive la différenciation, la survie et l'élongation vers des cibles spécifiques des différents types de fibres sensorielles. TrkA influence fortement les nocicepteurs peptidergiques et les thermorécepteurs, TrkB les mécanorécepteurs, TrkC les propriocepteurs des muscles et des articulations, et Ret influencent à la fois certains mécanorécepteurs et les fibres C non peptidergiques (Figure 1-17) [373, 378]. Ces récepteurs à FN déterminent la sensibilité des neurones sensoriels aux FN sécrétés notamment dans la peau. Ces FN définissent ainsi où migreront les différents types de fibres nerveuses. Ces FN et leurs récepteurs seront traités plus amplement à la section 1.4.2.

1.3.11.3.2 Différenciation en cellules de Schwann

Les CS proviennent de cellules de la crête neurale exprimant le facteur de transcription Sox10 [379-383]. Sox10 induit l'expression du récepteur erbB3, qui peut alors lier une forme soluble de la NRG1. Cette NRG1 soluble est sécrétée par les cellules de la crête neurale déjà spécifiées pour une différenciation neuronale, lorsqu'elles commencent à se regrouper en une masse cellulaire qui deviendra un ganglion nerveux. La NRG1 pourrait favoriser la gliogenèse en inhibant la neurogenèse vers laquelle les cellules de la crête neurale sont naturellement biaisées [384, 385]. Cependant, il est aussi suggéré que la NRG1 ne soit pas nécessaire à la gliogenèse et serait plutôt un facteur de survie obligatoire aux CS [384, 386-389]. Par ailleurs, alors que les neurones se différencient, elles commencent à exprimer la protéine transmembranaire delta-like (Dll) de type 1. Celle-ci lie la protéine transmembranaire Notch sur les cellules voisines, dont les précurseurs gliaux. La famille de protéines Notch comprend 4 récepteurs (Notch 1-4), auxquels peuvent se lier cinq ligands (jagged 1-2, delta-like-1, -3, -4). La liaison de Delta-like sur les cellules de la crête neurale inhibe la différenciation neuronale des futurs CS et accélère également la génération des CS [390-393].

1.3.11.4 Mécanismes de croissance des fibres nerveuses

Une fois déterminés et établis dans les ganglions nerveux, les neurones sensoriels projettent une extension du corps cellulaire pour atteindre une ou plusieurs cibles. À l'extrémité de la fibre, une structure hautement mobile et sensible explore le microenvironnement et elle détecte des signaux de migration et de survie : c'est le cône de croissance. Le cône de croissance déploie des filopodes et des lamellipodes de façon dynamique pour détecter et réagir aux différents signaux attractifs ou répulsifs qu'il rencontre. Les signaux peuvent être des facteurs diffusibles dérivés des régions à innover. Ce guidage à distance est appelé chimiotropisme. Les signaux peuvent aussi être des molécules de la MEC ou liées à celle-ci. Les divers sentiers signalétiques activés par la reconnaissance de ces signaux provoquent des changements dans le cytosquelette de filaments d'actine du cône de croissance. Il réagit en poursuivant, en se rétractant, en s'immobilisant, ou en changeant de

direction [394]. La polymérisation et la dépolymérisation de l'actine sont des mécanismes majeurs impliqués dans la réorientation du cône de croissance [395]. Un autre mécanisme implique la polymérisation et la dépolymérisation du réseau de microtubules [396, 397].

Une fois sa cible atteinte, l'axone peut simplement faire une synapse ou faire une synapse et s'arboriser pour permettre la connexion avec d'autres cibles [398]. Plusieurs des facteurs diffusibles dont dépend la migration de l'axone, dont en particulier les FN, sont captés par endocytoses et transportés au corps cellulaire par transport rétrograde. Ils déclenchent alors des processus permettant aux neurones de survivre et ils activent d'autres voies métaboliques.

1.3.12 La régénération nerveuse cutanée

Les fibres nerveuses cutanées sont parfois détruites lors d'un traumatisme ou simplement endommagées. La partie distale séparée du corps cellulaire dégénère alors progressivement jusqu'au prochain nœud de Ranvier [399]. Ce processus est la dégénérescence Wallérienne. Il implique la dégradation de la gaine de myéline, la migration de macrophages, la phagocytose des débris de myéline et de nerfs et la prolifération des CS [400-405]. Les CS en prolifération s'alignent dans la membrane basilaire qui entourait les fibres nerveuses. Elles se positionnent en formant un tube continu appelé bandes de Büngner. Elles produisent également des facteurs de survie et de croissance neuronale, dont notamment des FN [406-409]. Attirées par ces derniers, les fibres nerveuses en croissance migrent pour réinnover leurs cibles [399, 410, 411].

La régénération nerveuse implique le guidage des axones en croissance par différentes molécules, tel que cela a lieu durant la phase de développement de l'innervation [398, 399]. La régénération peut s'effectuer de façon précise [412], mais les fibres atteignent parfois une autre cible que l'originale [413-417]. De plus, lorsque la formation des bandes de Büngner est compromise et que le gradient neurotrophique est plus faible, la régénération est compromise [418].

La régénération nerveuse cutanée est souvent imparfaite. Par exemple chez la souris, une coupure du nerf sciatique entraîne après la régénération du nerf une innervation

intraépidermale réduite et anormale [419]. Dans le cas des brûlures profondes, alors que ce sont les terminaisons nerveuses dans le tissu cible qui est détruit, les victimes souffrent souvent de déficits sensoriels permanents [420-422]. En effet, 71 % des grands brûlés souffrent de sensations anormales et 36 % souffrent de douleurs chroniques [423]. En outre, les déficits sont plus prononcés s'il y a eu une greffe de peau [424]. Parmi les causes possibles de cette sensibilité anormale, on trouve : le manque de fibres nerveuses [425, 426], une réinnervation faite surtout par les petites fibres C et A δ ainsi qu'un déficit en grosses fibres myélinisées A β [427] et le manque de structures sensorielles annexées par exemple les follicules pileux [428]. Parmi d'autres causes possibles, il pourrait y avoir des changements dans le traitement des signaux afférents par le SNC [429 , 430]. En effet, l'élévation des seuils de sensibilité même dans les parties du corps non brûlées laisse supposer des modifications dans le traitement de l'information sensorielle par le SNC [431].

1.4 Similarités des réseaux nerveux et microvasculaires

Le développement de l'innervation dépend de signaux instructifs provenant de la peau. Ceux-ci influencent aussi le réseau microvasculaire, comme cela sera décrit. Les vaisseaux sanguins sont les premiers à migrer dans la peau. Ensuite, les nerfs suivent et ils s'organisent d'abord indépendamment de ceux-ci. L'innervation peut induire plus tard un certain remodelage des petits vaisseaux sanguins en leur faveur [432-434]. Les nerfs et les vaisseaux sanguins peuvent d'ailleurs bénéficier de leurs proximités en suivant la même trajectoire [435]. Enfin, les petites fibres nerveuses non myélinisées sont parfois en étroite association avec les parois superficielles des artérioles [436].

Dans la peau, les fibres nerveuses et les microvaisseaux suivent fréquemment des trajets parallèles d'où l'émergence du concept de congruence neurovasculaire [436]. Bien que de façon générale, les vaisseaux sanguins et les nerfs s'organisent indépendamment l'un de l'autre, ils peuvent être sensibles aux mêmes signaux. Cette sensibilité à des signaux communs commence très tôt dans le développement, car diverses études permettent de constater que le FGF, le TGF- β et Wnt influencent à la fois la spécification des précurseurs neuraux et vasculaires (section 1.2.6.1 et 1.3.11) [211, 346, 434]. Ainsi, la congruence neurovasculaire pourrait découler d'une part d'un répertoire commun de récepteurs cellulaires les sensibilisant aux mêmes signaux trophiques. Elle pourrait découler d'autre part de la libération par les fibres nerveuses de signaux attirant les vaisseaux sanguins et vice versa. Certains signaux diffusibles influençant la croissance nerveuse de même que vasculaire et leur contexte cutané seront présentés ici.

1.4.1 Signaux instructifs influençant les réseaux nerveux et vasculaires

Parmi les signaux instructifs qui influencent la migration des nerfs et des vaisseaux sanguins, on trouve : le VEGF; les sémaphorines; les éphrines et les ephrin receptor (Eph); certains FN. Enfin, d'autres signaux tels que les nétrines avec leur récepteurs DCC et UNC5 influencent les nerfs ainsi que les vaisseaux sanguins, mais leur rôle dans le contexte cutané est à préciser.

1.4.1.1 Les récepteurs du VEGF et leurs ligands

D'abord mis en évidence par sa capacité à augmenter la perméabilité vasculaire, le VEGF est un facteur angiogénique majeur. Il induit la prolifération, la migration, la survie et l'assemblage des CE en un réseau vasculaire [437-439]. Parmi les membres de la famille du VEGF, on compte le VEGF-A, aussi appelé simplement le VEGF, le VEGF-B, le VEGF-C le VEGF-D, et le *placental growth factor* (PLGF) (Figure 1-18). Les VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 sont les récepteurs des différents variants du VEGF.

Le VEGF-A est transcrit à partir d'un seul gène en plusieurs variants. Ils sont constitués de 121, 145, 165, 183, 189 et 206 acides aminés chez l'homme et leurs équivalents murins possèdent un acide aminé en moins [440-442]. Le nombre d'acides aminés est proportionnel au potentiel de liaison à la MEC [440, 441]. Cette particularité est à l'origine d'une gradation en VEGF dans les tissus qui influence considérablement le développement du réseau vasculaire [211, 443].

Dans la peau, le développement de la vascularisation est influencé par le VEGF exprimé par les kératinocytes et les fibroblastes [440, 444-446]. Sa surexpression dans l'épiderme augmente considérablement la densité microvasculaire [447]. L'effet angiogénique du VEGF dans la peau serait contrebalancé, entre autres, par les thrombospondines, qui ont un effet angiostatique [448].

Les nerfs sont une source de VEGF et cela a une influence majeure sur le développement local et la différenciation du réseau vasculaire. En utilisant un modèle d'embryons murins transgéniques, l'équipe du Dr Anderson a décrit comment les artérioles cutanées, mais pas les veines, sont spécifiquement alignées sur les nerfs [433]. Or, les mutations qui désorganisaient le SNP maintenaient cet alignement. L'élimination des nerfs périphériques ou des CS prévenait même l'artériogénèse cutanée [433]. Le mécanisme par lequel le VEGF dérivé des nerfs induit un phénotype artériel est que la plus forte présence de VEGF à proximité des nerfs induit l'expression de Neuropiline (NRP) -1 sur les vaisseaux sanguins. La NRP-1 sensibilise encore davantage les CE au VEGF [432]. Ces données

suggèrent qu'au cours du développement, les nerfs périphériques fournissent une base paracrine qui contribue au schéma vasculaire et artériel [432, 433].

Bien que les neurones sensoriels expriment eux aussi le VEGF-A, ils n'expriment pas son récepteur VEGFR-2. Ainsi *in vitro*, l'inhibition pharmacologique du VEGF-A lors d'une culture de DRG en explant n'affecte que le réseau vasculaire [449]. Cependant, les neurones sensoriels expriment aussi le VEGF-B et son récepteur VEGFR1 [450]. L'expression de VEGF-B n'induirait par l'angiogenèse dans le contexte cutané, mais il a un effet neuroprotecteur [450].

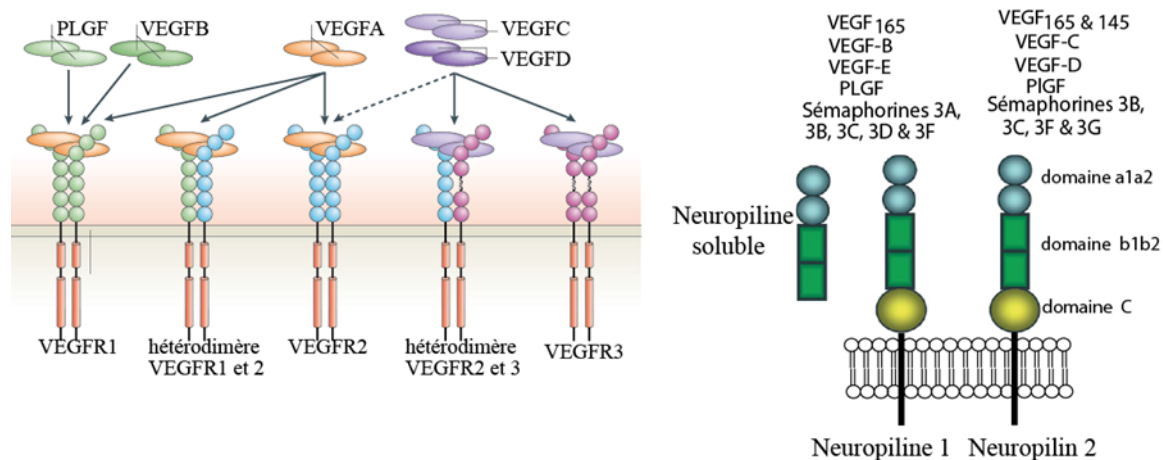


Figure 1-18. Les ligands VEGF et sémaphorines ainsi que leurs récepteurs. Modifiée de [451, 452].

1.4.1.2 Neuropilines, plexines et sémaphorines

Les NRP-1 et NRP-2 sont toutes les deux exprimées par les neurones sensoriels durant le développement, mais seul NRP-1 est exprimée par la suite [453, 454]. Les CE quant-à-elles expriment NRP-1 et NRP-2. Cependant, NRP-2 est surtout limitée aux veines durant le développement. NRP-2 disparaît du réseau vasculaire chez l'adulte et n'est plus exprimée que dans le réseau lymphatique [455, 456].

Les NRP-1 et NRP-2 agissent comme des co-récepteurs pour 2 différentes familles de récepteurs. La première famille est celle des VEGFR. En outre, NRP-1 augmente l'affinité du VEGFR-2 pour le VEGF [457, 458] et il favorise l'angiogenèse [459]. La seconde

famille est celle des plexines. Les neuropilines contribuent à la liaison spécifique de certaines sémaphorines sur les plexines (Figure 1-18).

Les sémaphorines (SEMA) sont une famille de molécules sécrétées, transmembranaires ou liées à la membrane cellulaire. Elles sont impliquées dans l'angiogenèse [460, 461]. La liaison de SEMA3A sur NRP-1 inhibe la migration endothéliale dépendante du VEGF [459, 462] et inhibe l'activation des intégrines [463]. Lors du développement, les vaisseaux sanguins intersomitiques ne se branchent pas correctement chez les mutants négatifs pour la plexine D1 et SEMA3A du zebrafish ainsi que les mutants négatifs plexine D1 et SEMA3E chez la souris [464-466]. Les sémaphorines n'ont cependant pas toutes un effet répulsif sur la navigation vasculaire [467, 468].

Les sémaphorines sont aussi impliquées dans le guidage des prolongements nerveux [460, 461]. En effet, SEMA3A avait d'abord été nommée collapsine dû au fait qu'elle repousse le cône de croissance nerveux en agissant par un complexe NRP1/Plexine [469]. La signalisation sous-jacente à NRP-1/VEGF, NRP-1/SEMA3A et NRP-2/SEMA3F contribue notamment à la navigation neuronale et à la segmentation des DRG [470, 471].

Dans la peau, SEMA3A est exprimée dans l'épiderme, mais pas dans le derme [472]. Elle est absente de la couche basale, et l'expression serait maximale dans la couche épineuse. SEMA3A inhibe l'élongation des fibres C dans les couches supérieures de l'épiderme [473]. De plus, chez les souris déficientes en SEMA3A, des fibres nerveuses normalement absentes de l'épiderme y sont présentes [474].

Enfin, bien que la capacité de NRP-1 à lier le VEGF et les sémaphorines de type 3 contribue à la fois au développement neuronal et vasculaire, cela ne peut expliquer totalement l'origine de la congruence neurovasculaire [475].

1.4.1.3 Les récepteurs éphrines et Eph

Les éphrines sont une famille de protéines membranaires. Les huit éphrines ont été divisées en classe A (éphrine-A1 à 5) et en classe B (éphrines-B1 à 3). Les éphrines interagissent

avec la famille de récepteurs Eph. Les quatorze récepteurs Eph ont été divisés en classe A (EphA1-8 et 10) et en classe B (EphB1-4 et 6). Généralement les éphrines-A interagissent avec les EphA et les éphrines-B interagissent avec les EphB. Les éphrines et les récepteurs Eph peuvent induire un signal intracellulaire lorsque deux cellules possédant ces récepteurs sont en contact. La signalisation éphrines/Eph est bidirectionnelle, c'est-à-dire que le signal est transmis aux deux cellules en contact.

Les interactions éphrines/Eph contribuent au guidage des prolongements nerveux [476, 477], à la formation de l'arborescence du système nerveux [478-480] et au développement vasculaire [481-483]. En effet, l'éphrine-B2 est exprimée spécifiquement sur les CE artérielles et les CMLV d'artères, mais pas dans les veines [483], alors que l'EphB4 est plutôt exprimé sur les CE de veines et de veinules. Les interactions éphrines/Eph entre les CE et entre les CE et les cellules adjacentes contrôlent la ségrégation des vaisseaux sanguins en artères et en veines de même que la navigation des vaisseaux sanguins [484, 485].

1.4.1.4 Les nétrines et leurs récepteurs UNC5 et DCC

Les nétrines font partie d'une famille de protéines de sécrétion qui partagent certaines homologies structurales avec la laminine [486, 487]. Pour l'instant, les gènes codant pour la nétrine-1, -3, -4, G1 et G2 ont été identifiés chez les mammifères, de même que 6 récepteurs (néogénine, DCC, UNC5A, B, C, D) [488]. Dans le système nerveux central, les nétrines participent au branchement des deux hémisphères du cerveau en liant les récepteurs DCC sur les axones en migration lorsqu'elles traversent la ligne médiane les séparant. Lorsqu'elles lient les récepteurs UNC5, les nétrines induiraient la répulsion des axones [489].

Dans le système vasculaire, le récepteur UNC5b pour la nétrine-1 causerait la rétractation des filopodes lors du processus de croissance des vaisseaux sanguins, à condition qu'il soit exprimé [490]. Le récepteur néogénine pourrait contribuer à cet effet [491]. Cependant, l'effet des nétrines sur l'angiogenèse pourrait être soit positif, soit négatif. En effet, l'expression de UNC5b sur les CE induirait un effet négatif, mais d'autres ont aussi rapporté que la nétrine-1 stimule la prolifération, la migration et la formation de tubules

[492, 493]. Cet effet pourrait dépendre du récepteur DCC [494]. Au niveau des CE lymphatiques, cela pourrait aussi dépendre de certaines intégrines puisque la liaison de la nétrine-4 par l'intégrine $\alpha\beta 1$ fut montrée pour induire leur migration [495, 496]. D'autres études seront de toutes évidences nécessaires pour bien comprendre l'implication des différentes nétrines et de leurs récepteurs dans la navigation vasculaire, en particulier dans le contexte cutané.

1.4.2 Les facteurs neurotrophiques et leurs récepteurs

1.4.2.1 Les neurotrophines

Les FN sont des molécules diffusibles impliquées dans la survie et la différenciation des neurones et dans le guidage des axones [497]. Parmi les FN les mieux caractérisés, les neurotrophines sont une famille qui comprend le *nerve growth factor* (NGF), le *brain-derived growth factor* (BDNF) et les *neurotrophin-3, -4/5, -6* (NT-3, NT-4/5 et NT-6). Les récepteurs à haute affinité des neurotrophines sont les récepteurs TrkA, TrkB et TrkC [498]. Le récepteur TrkA est activé préférentiellement par le NGF, mais aussi par la NT-3. TrkB est activé préférentiellement par le BDNF, mais aussi par NT-4/5 et NT-3. Enfin TrkC est activé par la NT-3. Comme cela a été décrit pour l'ensemble des récepteurs à activité tyrosine kinase, la liaison des neurotrophines aux récepteurs Trk induit d'abord leur dimérisation, l'activation de la kinase puis la transphosphorylation des tyrosines au niveau du domaine intracellulaire du récepteur [499].

1.4.2.1.1 Les récepteurs des neurotrophines

Chez l'humain, il existe deux variants longs du récepteur TrkA qui possèdent le domaine kinase intracellulaire, soient TrkA I et TrkA II [500]. Ces deux variants se distinguent par la présence de 6 acides aminés dans le domaine extracellulaire du récepteur TrkA II. Cette séquence participe à la sélectivité du récepteur TrkA pour le NT-3, puisque ce dernier ne se lierait qu'en présence de celle-ci [501]. Un autre variant résultant d'un épissage alternatif a été mis en évidence plus récemment, soit TrkA III [502-505].

Le gène humain du récepteur TrkB, quant à lui, peut générer jusqu'à 10 protéines [506]. Cependant, les analyses faites par la technique de Northern blot et par RT-PCR ont révélé que seulement trois variants majeurs sont produits chez l'humain : TrkB pleine longueur, TrkB-T1 tronqué pour le domaine kinase et TrkB-T-Shc tronqué pour le domaine kinase, mais contenant un domaine de liaison pour la protéine adaptatrice Shc. D'autres études ont rapporté l'expression d'un variant tronqué appelé TrkB-T2, cependant il n'a été détecté que chez les rongeurs [507-509]. Les études réalisées auparavant suggéraient que TrkB-T1 et TrkB-T-Shc pourraient être de potentiels modulateurs négatifs de la signalisation du récepteur TrkB pleine longueur [506]. Cependant, il a été démontré récemment que la forme tronquée TrkB-T1 pouvait, malgré l'absence du domaine kinase, induire la libération du calcium contenu dans les compartiments intracellulaires de cellules gliales astrocytaires, qui expriment naturellement TrkB-T1. Ces travaux démontrent donc que TrkB-T1 a un effet direct sur la signalisation intracellulaire dépendante du calcium malgré l'absence du domaine kinase [510]. De plus, TrkB-T1 induirait des changements dans la morphologie des cellules gliales [511].

Il existe deux variants longs du récepteur TrkC chez l'humain, qui se distinguent par la présence d'une insertion de 14 acides aminés dans le domaine kinase [512, 513]. La présence de cette insertion modifierait la spécificité de la kinase, inhibant l'activation de plusieurs substrats et interférant avec l'habileté du récepteur à promouvoir la différenciation neuronale [514, 515]. De plus, il existerait au moins une forme tronquée du domaine kinase chez l'humain, TrkC-T1, aussi connu comme TrkCTK et TrkC NC2 [516]. Ce variant peu se lier à la protéine du cytosquelette tamaline et ainsi activer la signalisation intracellulaire malgré l'absence du domaine kinase [517]. TrkC-T1 peut également induire la différenciation des cellules de la crête neurale [518].

En plus des récepteurs Trk, les neurotrophines lient aussi le *neurotrophin receptor* p75 (p75^{NTR}). Ce dernier lie le NGF avec une plus faible affinité que le récepteur TrkA [519, 520]. Cependant, le p75^{NTR} lie l'ensemble des neurotrophines avec la même affinité [520]. Le récepteur p75^{NTR} appartient à la famille des récepteurs de mort cellulaire. Ces derniers sont caractérisés par la présence d'un domaine intracellulaire appelé domaine de mort qui induit les voies de l'apoptose [521]. Mais toutes les cellules exprimant p75^{NTR} ne

déclenchent pas nécessairement l'apoptose en réponse aux neurotrophines. En fait, le récepteur p75^{NTR} peut induire des voies de signalisation conduisant à l'apoptose, ou au contraire à la survie. Le choix de ces voies de signalisation dépendrait de plusieurs paramètres dont la nature du ligand et aussi des protéines adaptatrices recrutées par le récepteur à l'intérieur des cellules (Figure 1-19) [522, 523]. Le récepteur p75^{NTR} est également un co-récepteur des protéines Trk. La façon dont p75^{NTR} améliore la réponse des Trk aux neurotrophines n'est pas claire: soit il concentre ou présente le ligand dans une conformation favorable [237, 524, 525], soit il a un effet allostérique sur les récepteurs Trk, et ce, peu importe qu'il soit ou non lié lui-même au NGF [526]. De plus, p75^{NTR} favoriserait le transport rétrograde de certaines neurotrophines [527].

Des études récentes suggèrent que le rôle des FN et des neurotrophines ne se limite pas au système nerveux. Dans les prochaines sections, leur rôle dans le SNP ainsi que dans le système vasculaire sera détaillé.

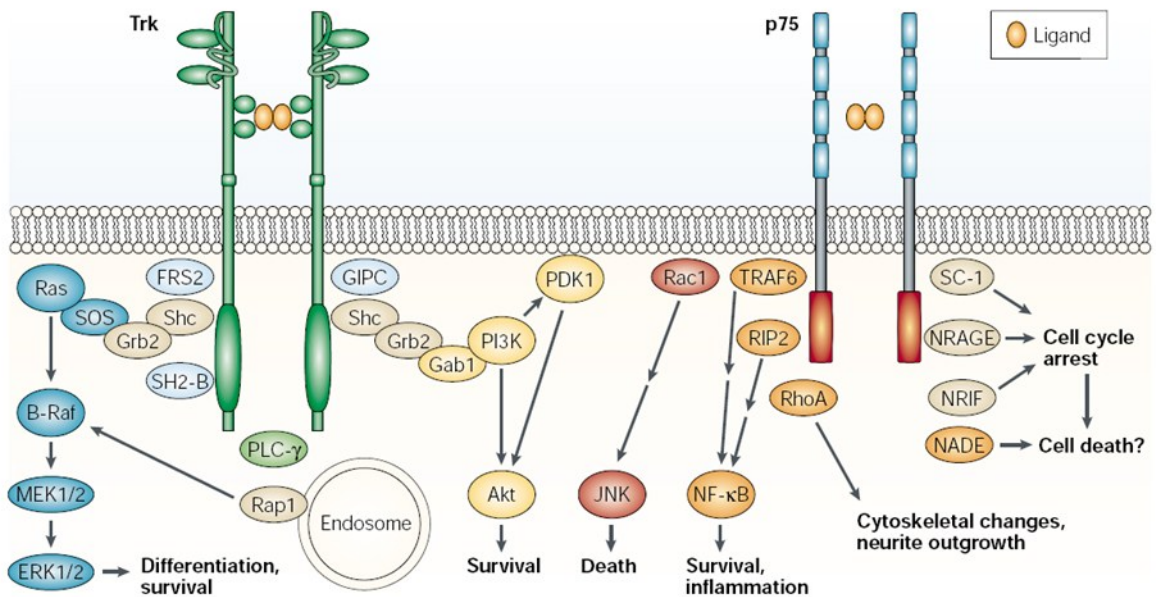


Figure 1-19. Représentation schématique des récepteurs des neurotrophines et de leur signalisation
Modifiée de [523].

1.4.2.1.2 *Le NGF*

Le concept selon lequel la peau et les autres tissus périphériques fournissent une base neurotrophique supportant le développement des fibres afférentes a été établi notamment grâce à la découverte du NGF [528, 529]. En outre, les fibroblastes expriment le NGF [530-532], tout comme les kératinocytes [533-536], les CMLV [537-539] et les CS [540]. De plus, certains groupes ont rapporté l'expression du NGF par des CE [541-543]. Chez la souris, la plus forte concentration de NGF est atteinte dans la peau au jour embryonnaire (E) 13 et cela coïncide avec la migration des fibres nerveuses. La réduction de la concentration vers E14-19 coïncide ensuite avec la mort cellulaire des neurones dont les terminaisons n'ont pu trouver de cibles à innover. Les cibles à innover libèrent des FN, ce qui attire les fibres nerveuses [544].

Le NGF est la première neurotrophine découverte et également la mieux caractérisée. Elle est si importante que la déficience en NGF chez les souris mutantes entraîne la disparition de 80 % des neurones sensoriels [545]. La déficience de son récepteur à haute affinité TrkA entraîne quant-à-elle la disparition de 40 à 50 % des neurones sensoriels [546]. En plus de participer à la différenciation, à la morphogenèse et à la survie des neurones sensoriels, le NGF est essentiel à la régénération nerveuse suivant un traumatisme [529]. En effet, en présence d'une lésion du nerf sciatique chez le rat [407] et chez la souris [547], la transcription du NGF à proximité de la lésion augmente rapidement ce qui favorise la régénération nerveuse. En outre, la liaison du NGF à TrkA active plusieurs voies de signalisation (Figure 1-18). Le complexe TrkA-NGF est internalisé dans un endosome, qui migre le long de l'axone jusqu'au corps cellulaire où il active différentes voies de signalisation [548]. La présence de NGF permet notamment au cône de croissance de mieux résister à la déstabilisation en présence de SEMA3A.

Le NGF influencerait aussi le système vasculaire. Les premiers indices furent la découverte de la sécrétion de NGF par des CMLV de rats [549] et l'expression des récepteurs TrkA, B et C par les CMLV [550]. Ensuite, il fut montré que le NGF activait les mêmes sentiers métaboliques sur les CMLV que sur des neurones et qu'il induisait la migration des CMLV, mais pas leur prolifération [538]. L'activation de TrkA sur les CMLV induirait aussi l'expression de MMP-9 [551].

Le premier indice de l'influence du NGF sur les CE fut l'observation que l'ajout de NGF permettait d'augmenter la sécrétion de VEGF chez des souris diabétiques [552]. Peu après cette étude, l'équipe de la Dre Levi-Montalcini a testé l'hypothèse selon laquelle le NGF était associé à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Ils ont constaté que le NGF induisait l'angiogenèse postnatale dans leur modèle de rat. Ils ont suggéré qu'une demande neurale pour l'angiogenèse pouvait être promue par des FN comme le NGF [553]. Depuis lors, plusieurs publications ont confirmé que le NGF stimule la prolifération et la migration des CE de même que la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Tableau 1-3).

1.4.2.1.3 Le BDNF

Le BDNF influence le développement de l'innervation cutanée. Chez la souris, son expression cutanée débute vers E11 [554]. Son absence provoquerait la perte de 30 % des neurones des DRG [555]. La surexpression du BDNF sous le contrôle du promoteur K14 induit, chez la souris, une plus grande innervation des follicules pileux, des cellules de Merkel, des corpuscules de Meissner, une diminution du nombre de fibres non myélinisées et leur absence dans l'épiderme [556].

Pour l'instant, encore très peu d'études se sont penchées sur le rôle du BDNF dans le système vasculaire. En utilisant des souris génétiquement modifiées pour qu'elles n'expriment pas de BDNF, le groupe du Dre Hempstead a démontré que l'absence de BDNF diminue la survie des CE des artères et des capillaires cardiaques. Les souris mutantes présentaient notamment des hémorragies cardiaques et pulmonaires. Inversement, ils ont constaté dans leur modèle qu'une surexpression de BDNF augmente la densité des capillaires cardiaques. Selon eux, le BDNF vasculaire est exprimé chez la souris adulte spécifiquement au niveau des CE et des cellules musculaires cardiaques, de même qu'au niveau des CMLV des artères les plus larges [550, 557]. Plus récemment, le BDNF a été décrit comme un nouveau modulateur positif de l'angiogenèse dans un modèle d'angiogenèse tumorale et dans un modèle *in vitro* bidimensionnelle utilisant des HUVEC [558-560].

Tableau 1-3. Le NGF influence l'angiogenèse.

Type cellulaire / modèle	Origine	Effet	Références
Ganglion cervical supérieur	Rat	Angiogenèse	[553]
Cornée	Rat	Angiogenèse, guérison	[561]
HDMEC de dermes	Humain	Prolifération et expression de ICAM	[562]
CE de cordons ombilicaux et CE de membrane chorioallantoïque	Humaine et poulet	Prolifération et angiogenèse	[542]
HDMEC de tissus ischémiques	Souris	Néovascularisation réparatrice , artériogénèse et vasodilatation	[563]
Ischémie	Souris	Angiogenèse	[564]
CE de rétine et de choroïde	Humain	Migration et prolifération	[565]
CE immortalisées de cerveau	Rat	Prolifération	[566]
CE aortiques	Souris	Protection	[541]
HDMEC d'ulcère cutané diabétique de type 1	Souris	Angiogenèse réparatrice et accélération de la guérison de plaie	[567]
Cornée	Rat	Angiogenèse, guérison	[568]
CE aortiques et adrénales médullaires	Humain et rat	Migration	[569]
CE aortiques	Cochon	Migration et angiogenèse	[570]
HDMEC	Humain et souris	Angiogenèse, augmentation de l'expression du VEGF	[571]
CE d'ovaire	Rat	Angiogenèse et augmentation de l'expression de VEGF	[572]
HDMEC	Humain	Prolifération et augmentation de l'expression de VEGF	[573]
CE de cordons ombilicaux	Humain	Angiogenèse et induction de l'expression de métalloprotéases	[574]
HUVEC	Humain	Formation de lumière	[575]
CE de lésions oculaires	Humain	Corrélation entre l'expression de NGF/TrkA et la densité HDMEC	[576]
CE de rétine	Souris	Néovascularisation	[577]

1.4.2.1.4 Le NT-3

Le NT-3 est un facteur neurotrophique très important pour le développement de l'innervation sensorielle. Son absence en cours de développement induit la mort d'environ 70 % des neurones des DRG [578, 579]. La surexpression du NT-3 dans l'épiderme augmente de 42 % le nombre de neurones sensoriel dans les DRG, elle augmente le nombre de cellules de Merkel associées et le nombre de fibres myélinisées [580]. Au niveau vasculaire, une étude récente suggère que le NT-3 est un facteur angiogénique pour les CE

de muscle squelettique, qui expriment le récepteur à haute affinité pour le NT-3, TrkC [581]. En transfectant des HUVEC pour qu'elles expriment aussi TrkC, ils rapportent que le NT-3 peut aussi produire un effet angiogénique avec ce type de CE. Cependant, cette étude ne permet pas de dire si le NT-3 est angiogénique pour les HUVEC sans leur transfecter TrkC, car ce contrôle est manquant.

1.4.2.2 Le GDNF

Les FN qui appartiennent à la superfamille du TGF- β comprennent le *glial-derived neurotrophic factor* (GDNF), l'artémine, la neurturine et la perséphérine. Ils agissent via un complexe de deux récepteurs : le ligand se lie d'abord à son récepteur GFR α spécifique (Figure 1-20), puis il est recruté sur la protéine membranaire à activité tyrosine kinase Ret, qui est une composante signalétique dans ce système [582].

Plus particulièrement, le GDNF a d'abord été caractérisé comme un facteur favorisant la survie de certains neurones du SNC et des neurones moteurs [583-585]. Dans le SNP, il favorise la survie d'une sous-population de neurones nociceptifs non peptidergiques [586, 587] (Figure 1-20). Il est notamment exprimé dans l'épiderme [588-590]. Dans ce contexte, c'est un FN influençant la différenciation nerveuse [591, 592]. Dans le système vasculaire, le GDNF est un des modulateurs paracrins généraux de l'établissement d'une barrière à perméabilité sélective entre le sang et les tissus [593]. En outre, la perméabilité vasculaire de CE de cerveaux de porc et de rat exprimant GFR α -1 lorsqu'elles étaient stimulées par du GDNF est diminuée [594, 595]. Par ailleurs l'expression de GFR α -1 et de protéines de jonctions serrées sur les vaisseaux sanguins forme la barrière sang-testicule [52].

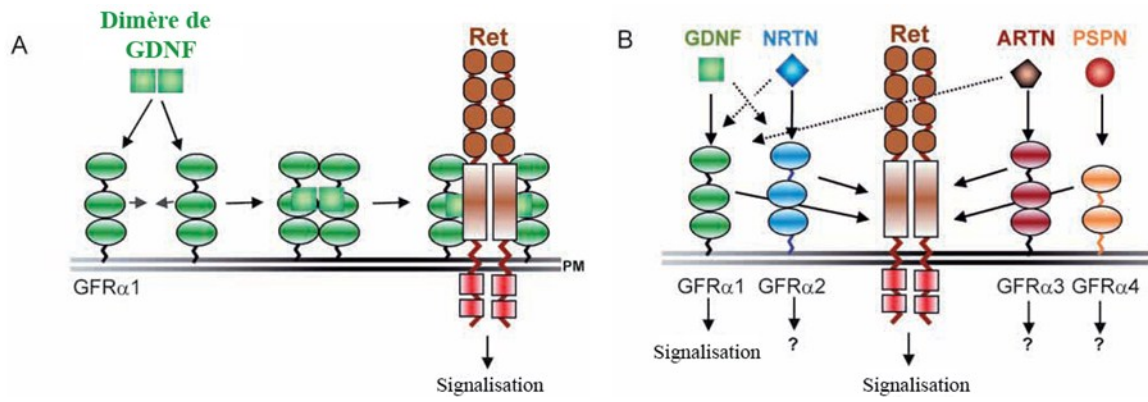


Figure 1-20. La famille de ligands du GDNF et leurs récepteurs.
Modifiée de [582].

1.5 Influence de l'innervation sensorielle sur l'homéostasie cutanée

Si l'on exclut le processus d'inflammation induit par les nerfs (inflammation neurogène), nous avons peu de connaissances fines sur l'impact de l'absence d'un réseau nerveux sensoriel sur l'homéostasie cutanée [596]. Cependant, certaines données sont disponibles à l'étape du développement embryonnaire et d'autres sont disponibles pour des tissus adultes.

D'abord, les nerfs sensoriels peuvent influencer le développement embryonnaire vasculaire localement (section 1.4). Ensuite, ils pourraient aussi influencer le développement des papilles dermiques [596, 597]. Enfin, la guérison d'une plaie cutanée sans formation d'une cicatrice hypertrophique observée chez les fœtus est dépendante de l'innervation cutanée. En absence d'innervation, soit la plaie ne cicatrise pas, soit elle forme une cicatrice hypertrophique [598]. Chez l'adulte, l'exemple le plus direct de l'importance de l'innervation dans la peau humaine est celui des patients paraplégiques. En effet, ils font des plaies cutanées plus facilement en aval du niveau de dénervation de la moelle épinière et ces plaies guérissent très difficilement [599]. En outre, on sait maintenant que l'absence d'innervation altère toutes les étapes de la guérison des plaies et cela par des mécanismes qui restent à préciser (revue dans[600]).

Le Dr Hsieh et ses collègues ont par ailleurs étudié l'impact de l'absence d'un réseau nerveux sur l'épiderme avec des modèles d'études adultes. Ils ont sectionné les nerfs sciatiques de souris ou de rats et observé une diminution de l'épaisseur de l'épiderme de la plante des pieds supérieur à 25 % [601-603]. Ils ont également observé une diminution de l'incorporation de bromodéoxyuridine (BrdU), ce qui reflète une diminution de la prolifération des kératinocytes dans l'épiderme [602, 604]. Cependant, ils n'ont pas identifié de mécanisme causal.

1.5.1 Mécanisme de l'influence de l'innervation sensorielle sur la peau

Bien que les mécanismes d'influence de l'innervation sur le tissu cutané soient inconnus, deux hypothèses ont été avancées par le Dr Hsieh et ses collègues : une influence par signaux diffusibles et une influence par activité neuronale [605]. Cependant, cette dernière hypothèse pourrait impliquer la formation de zones fonctionnelles entre la terminaison et une structure innervée. De telles zones ont bien été observées aux jonctions neuromusculaires [606], mais pas avec les kératinocytes ou les fibroblastes. Par ailleurs, l'hypothèse des signaux diffusibles pour expliquer l'influence de l'innervation sur le tissu cutané peut quant à elle s'appuyer sur la libération de VEGF [432, 433] et sur la libération de neuropeptides dans la peau, qui est un phénomène bien documenté [255]. Certains auteurs parlent du concept de réflexe d'axone en référence à cette libération de neuropeptides par les fibres nerveuses dans les tissus périphériques [607].

Le plus connu et le plus étudié des processus causés par la libération de neuropeptides est l'inflammation neurogène. Elle implique la dépolarisation des fibres peptidergiques suivant des stimuli mécaniques, thermiques ou chimiques spécifiques. Ces substances chimiques peuvent provenir de l'environnement, comme certains allergènes ou la capsaïcine; elles peuvent provenir de cellules endommagées, comme le K^+ , l'histamine et l'ATP; elles peuvent dériver du plasma ou d'enzymes activées suite à un traumatisme; elles peuvent être produites par le système immunitaire, comme la bradykinine, la prostaglandine, les protéases [608]. Il résulte de la dépolarisation des fibres peptidergiques la libération de neuropeptides tels la SP ainsi que le CGRP. Ceux-ci peuvent provoquer la vasodilatation des vaisseaux sanguins, une augmentation de leur perméabilité et une réponse inflammatoire. Ainsi, grâce aux neuropeptides les fibres nerveuses cutanées influencent l'inflammation, notamment par l'intermédiaire des mastocytes dans le derme [609, 610] et des cellules de Langerhans dans l'épiderme [611, 612]. L'inflammation est notamment réduite en absence d'innervation [613].

Les neuropeptides sont en concentration moindre dans la peau lorsqu'elle est dénervée, même dans un contexte non inflammatoire [614-619]. Des études émergentes suggèrent que pourtant les neuropeptides agissent aussi dans un contexte non inflammatoire. D'abord, le NGF sécrété de façon endogène dans la peau et dont dépend une forte proportion des

fibres sensorielles cutanées pourrait induire une relâche basale de neuropeptides [620]. Ensuite, certaines cellules résidentes de la peau expriment aussi les récepteurs à ces mêmes neuropeptides. En outre, plusieurs de ces neuropeptides peuvent influencer directement les kératinocytes, les CE et les fibroblastes. Cela sera présenté dans la prochaine section.

1.5.2 Effet des neuropeptides dans la peau

1.5.2.1 La substance P et les tachykinines

La SP est un neuropeptide de 11 acides aminés appartenant à la famille des tachykinines. Les tachykinines comprennent également la neurokinine A (NKA), le neuropeptide-K, le neuropeptide- δ et la neurokinine B (NKB). La NKB est cependant exprimée exclusivement dans le SNC [621, 622]. Les tachykinines activent les récepteurs couplés aux protéines G NK1, NK2, et NK3 avec différentes affinités. La plus forte affinité du récepteur NK1 est pour la SP. Celle de NK2 est pour le NKA, le neuropeptide-K et le neuropeptide- δ . Enfin celle de NK3 est pour le NKB [623-625].

Les fibres sensorielles cutanées possédant la SP sont parfois associées aux vaisseaux sanguins et certaines sont aussi retrouvées dans l'épiderme [626]. La SP pourrait avoir une influence significative dans l'épiderme. En effet, la stimulation de NK1 par la SP y induit l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} [627]. La SP induit la production d'IL-1 et de NGF par les kératinocytes [628-630]. Elle augmente aussi leur production de NGF ce qui pourrait influencer le maintien et le développement des fibres nerveuses [628, 629]. Enfin, certains groupes ont rapporté que la SP diminuait la prolifération des kératinocytes [631, 632]. Au niveau microvasculaire, la SP induit l'angiogenèse et augmente la concentration en Ca^{2+} des HDMEC [633, 634]. Enfin, pour les fibroblastes, la SP stimule leur migration et leur prolifération et cela dépendrait du récepteur NK1 [635-637].

Dans le contexte de la guérison des plaies, une étude rapporte que les souris déficientes en NK1 n'ont pas de retard dans la guérison de leurs plaies [638]. Cependant, la fermeture des plaies se fait beaucoup plus par contraction que par réépithélialisation chez la souris, ce qui est différent chez l'homme.

Peu d'études ont été réalisées pour les autres tachykinines. Sinon il fut rapporté que le NKA induirait également l'angiogenèse [633] et la production de NGF par les kératinocytes [628], mais qu'il ne favoriserait pas la prolifération de kératinocytes immortalisés [631].

1.5.2.2 Le calcitonin gene related peptide

Le CGRP est un neuropeptide de 37 acides aminés. Ses récepteurs couplés aux protéines G sont les *calcitonin receptor-like receptor* (CRLR) CRLR-1 et CRLR-2 [639, 640]. L'activité du CRLR dépend du *receptor activity modifying protein-1* (RAMP1), qui est impliqué dans la présentation du CRLR à la surface cellulaire [641]. Le CGRP a 2 variants, les CGRP α et CGRP β [642, 643]. Le variant CGRP α est la forme préférentiellement exprimée par les neurones sensoriels [644]. Le CGRP α est généralement co-localisé soit avec la SP soit avec la somatostatine [645, 646]. S'il est colocalisé avec la SP, il est présent dans les fibres C libres, celles des papilles dermiques, et celles pénétrant l'épiderme. S'il est localisé avec la somatostatine, il est présent dans les fibres périvasculaires et également dans d'autres pénétrant l'épiderme [646-649]. Les fibres nerveuses activées par la chaleur peuvent notamment libérer du CGRP par un mécanisme dépendant du calcium [650].

Peu d'études ont rapporté un effet direct du CGRP sur les cellules cutanées. Il augmenterait la prolifération et la migration des fibroblastes [637, 651]. Il aurait de plus un effet vasodilatateur et mitogénique sur les CE [652-654]. En outre, le CGRP stimulerait l'angiogenèse et la formation d'AMPc [655, 656]. Enfin, le CGRP pourrait moduler la production de cytokines des kératinocytes, augmenter leur prolifération et leur activité adénylate cyclase [657, 658].

1.5.2.3 Le VIP et PACAP

Le *Vasoactive intestinal peptide* (VIP) est un peptide de 28 acides aminés détectés dans les fibres nerveuses associées aux vaisseaux sanguins du derme, aux follicules pileux et aux cellules de Merkel [659, 660]. Le *Pituitary adenylylase activating polypeptide* (PACAP) appartient à la même famille que le VIP. Il y a les variants PACAP-38 et PACAP-27. PACAP a entre autres été localisé dans les fibres nociceptives, notamment

autour des vaisseaux sanguins et des follicules pileux, où ils peuvent coexister avec la SP, le CGRP ou le VIP [659, 661] .

Trois sous-types de récepteurs qui peuvent lier PACAP et VIP ont été identifiés jusqu'à maintenant. Ainsi, le VIP et PACAP peuvent lier les mêmes récepteurs avec différentes affinités [662, 663]. Par nom et affinité, on trouve: PAC1-R (PACAP >> VIP); VPAC1-R (VIP \geq PACAP); VPAC2-R (VIP = PACAP) [664]. Ces récepteurs sont couplés à des protéines G qui activent l'adénylate cyclase (135, 706).

Le VIP induit la prolifération et la migration des kératinocytes [631, 663]. Il induit également une augmentation de leur production de VEGF [665, 666]. Les CE peuvent répondre au VIP par la vasodilatation, par une augmentation de la production d'AMPC et par angiogenèse [667-669].

Peu d'études se sont intéressées au rôle de PACAP sur les kératinocytes. Le rôle de PACAP sur l'angiogenèse reste quant à lui à déterminer. Cependant, une étude rapporte une augmentation du nombre de capillaires après 4 jours de stimulation dans un modèle de peau cultivée *ex vivo* [670]. Une autre étude soutient un effet antiprolifératif de PACAP (et du VIP) sur les CE dans un contexte de culture en hyperglycémie [671].

Enfin, les fibroblastes n'exprimeraient pas les récepteurs de PACAP et du VIP [637, 651, 672].

1.6 La médecine régénérative et le génie tissulaire

Lorsque les tissus sont complètement détruits par un traumatisme, la guérison déficiente crée un besoin clinique pour des tissus de remplacement. De nos jours, les progrès de la médecine régénérative en culture cellulaire et en génie des biomatériaux permettent de reconstruire des équivalents de certains tissus, dont la peau. Les techniques développées à cet effet pour répondre à ce besoin en tissus de remplacement sont celles du génie tissulaire [673]. Les tissus reconstruits sont constitués soit uniquement de cellules, de cellules incluses dans un biomatériau, de cellules déposées sur un biomatériau, de cellules déposées sur des organes décellularisés. Plusieurs équipes de recherches sont spécialisées dans la reconstruction *in vitro* de différents tissus, dont le tissu adipeux, les tendons, les disques intervertébraux, les os, le foie, le poumon, le cœur et les vaisseaux sanguins [674-679].

Nous aborderons ici la reconstruction d'équivalent cutané, l'utilisation en recherche du génie tissulaire pour l'étude de la réépithélialisation, de l'angiogenèse ainsi que de la régénération nerveuse et enfin l'utilisation des cellules souches pour la médecine régénérative.

1.6.1 Les équivalents cutanés

1.6.1.1 Les équivalents épidermiques

Les équivalents épidermiques ont une importance historique, car ils furent les premiers tissus reconstruits à avoir été greffés et commercialisés (Epicel[®]) [680]. Pour reconstruire ces équivalents, des kératinocytes provenant d'un site non brûlé (donneur) sont cultivés sur des fibroblastes irradiés afin de former un feuillet [681]. Ces feuillets peuvent être greffés directement sur des brûlures débridées [680]. Les équivalents épidermiques sont greffés sur des sites donneurs pour accélérer leur régénération ou alors sur des brûlures débridées, parfois en combinaison avec de la peau prise du site donneur pour être greffé immédiatement [682-686]. Un paramètre critique de ces greffes est le besoin de vascularisation rapide du greffon. Les équivalents épidermiques greffés sur des sites donneurs, plutôt que sur une plaie fraîchement débridée, peuvent compter sur une vascularisation déjà établie. D'autres méthodes ont été développées ou sont en

développement pour les équivalents épidermiques : la culture puis la greffe de kératinocytes sur un revêtement de silicone facilitant le transfert des cellules sur les plaies (MySkin[®]) [687]; la culture sur de l'acide hyaluronique puis la greffe (Laserskin/Vivoderm[®]) [688-690]; la pulvérisation aérosol de kératinocytes sur les plaies seules (Cellspray[®]) [691, 692] ou combinés à un gel de fibrine scellant (Bioseed-S[®]) [693, 694].

1.6.1.2 Les équivalents avec derme et épiderme

Les greffes d'équivalents cutanés avec derme et épiderme nécessitent des coûts supplémentaires par rapport aux greffes d'équivalents épidermiques seuls. Cependant, l'ajout du compartiment dermique aux équivalents cutanés pour greffer une plaie plutôt qu'un site donneur est avantageux par comparaison à la greffe de seulement la portion épidermique [695]. En effet, les kératinocytes survivent difficilement sans le support des fibroblastes. De plus, le derme apporte un soutien mécanique lors de la reconstruction *in vitro*. Cependant, la vascularisation rapide du greffon reste une étape critique.

1.6.1.3 La reconstruction du compartiment dermique

La reconstruction du derme se distingue de celle de l'épiderme de par l'importance de la MEC dans ce tissu. Les méthodes de reconstruction dermique font souvent appel à l'ajout d'un substrat de MEC qui dispose dès le départ les cellulesensemencées de façon tridimensionnelle. Plusieurs méthodes ont été élaborées en ce sens pour reconstruire le compartiment dermique, dont les gels et les biomatériaux. Parmi ces méthodes, les substituts acellulaires misent sur une migration cellulaire à l'intérieur de la matrice une fois greffée alors que les autres substituts comprennent déjà une composante cellulaire avant la greffe. Enfin, la méthode d'autoassemblage se distingue des autres, car les cellules produisent leur propre MEC.

1.6.1.3.1 Les gels

Les équivalents ont été reconstruits en utilisant un gel de collagène avec fibroblastes sur lequel étaient cultivés des kératinocytes [696, 697]. Cette méthode est commercialisée (Apligraf[®]) [698]. Cependant, la présence de fibroblastes allogéniques, la forte contraction du gel lorsque des cellules sont ajoutées, la faible résistance mécanique et la dégradation limitent l'utilisation de tels modèles sur gels [699, 700].

1.6.1.3.2 Les biomatériaux

Une autre méthode de reconstruction du derme repose sur l'utilisation de biomatériaux naturels, synthétiques biodégradables ou synthétiques non biodégradables [701-704]. Les biomatériaux naturels ont l'avantage de pouvoir être remodelés par les cellules [673].

Une des premières approches commercialisées fut la décellularisation de peau cadavérique (AlloDerm[®]). Ces substituts allogéniques sont dépourvus de fibroblastes, mais ils permettent d'utiliser la MEC cutanée [705, 706]. Cependant, ils sont souvent utilisés comme pansement temporaire permettant la restauration d'un réseau vasculaire. D'autres produits issus de peau humaine décellularisée sont aujourd'hui en développement ou disponibles dont SureDerm[®] et GraftJacket[®] [707, 708].

Le collagène étant la protéine majeure de la MEC des tissus conjonctifs comme la peau, les biomatériaux à base de collagène comportent de nombreux avantages. Parmi les autres biomatériaux avec collagène commercialisés pour la reconstruction de la peau, on retrouve notamment des éponges de collagène (OrCel[®]) [709], des éponges de collagène et de chondroïtine-6-sulfate (Integra[®]) [710, 711], des éponges de collagènes et d'élastine (Matriderm[®]). Certains biomatériaux incluent aussi des composantes synthétiques. Parmi eux, citons les treillis de nylon et collagène (TransCyte[®]) [712] et les treillis de polyglactine (Dermagraft[®]) [713]. Les biomatériaux sont utilisés en clinique avec une certaine efficacité et des coûts élevés [714, 715]. En outre, certaines éponges commercialisées sont réticulées en utilisant des aldéhydes; des composés toxiques pouvant aussi induire une calcification de l'éponge [716, 717].

D'autres types d'éponges de collagène ont été développés, dont celles réticulées avec du chitosane [718-720]. Dans ce modèle, les groupements carboxylés libres du collagène,

chargé négativement, et les groupements amines des unités glucosamines du chitosane, chargés positivement, forment des liaisons ioniques. Le nombre de liaisons créées est proportionnel à la déacétylation du chitosane qui crée des groupements amines libres [721-724]. L'éponge de collagène et chitosane a une épaisseur, des pores et des dimensions facilement modulables [724]. Les cellules peuvent la remodeler et y synthétiser leur propre matrice [725, 726].

1.6.1.3.3 L'autoassemblage

Une peau reconstruite constituée uniquement de matrice endogène a été fabriquée par une méthode d'autoassemblage. Les fibroblastes synthétisant naturellement du collagène, cette caractéristique peut être exploitée pour produire des feuillets de cellules manipulables qui sont par la suite empilés [695, 727]. Cette méthode constitue une avancée importante pour la reconstruction de tissu avec uniquement les cellules du patient.

1.6.2 Modèles d'études issus du génie tissulaire

Les équivalents reconstruits par génie tissulaire sont assez représentatifs des tissus natifs pour être utilisés en clinique [673]. Les modèles d'études *in vitro* étant indispensables à la recherche, l'utilisation de tissus reconstruits plutôt que des modèles en deux dimensions comme modèle d'étude est avantageuse, car elle est plus représentative du microenvironnement tissulaire. Ces modèles ne peuvent remplacer totalement l'expérimentation animale, mais ils permettent l'utilisation de cellules humaines. Ils permettent aussi l'ajout de molécules dont on veut déterminer l'effet biologique. Par exemple, les équivalents cutanés peuvent servir d'alternative aux modèles animaux pour classer la dangerosité d'éléments chimiques et de plus ils sont appelés à devenir un outil majeur pour l'industrie des cosmétiques [728-732].

En recherche fondamentale, le développement d'équivalents plus performants qui favorisent le retour des fonctionnalités physiologiques une fois greffés est souhaitable. Pour développer de nouveaux modèles, il est possible de choisir les types cellulaires à inclure. Par exemple, l'ajout d'un réseau microvasculaire permettrait une vascularisation rapide des

greffons et améliorerait possiblement le succès des greffes [733]. De même, on pourrait poser l'hypothèse que des composantes favorisant la régénération nerveuse des greffons pourraient potentiellement améliorer la qualité de vie des patients après la greffe. Ainsi, la peau reconstruite idéale devrait favoriser la régénération du tissu, son remodelage, sa vascularisation et sa réinnervation [734].

Enfin, les tissus reconstruits permettent de modéliser *in vitro* des processus tissulaires pour mieux les comprendre. Les équivalents cutanés peuvent par exemple servir à la modélisation de pathologies comme le psoriasis [735, 736] ou la sclérodermie [737, 738]. La réépithélialisation, l'angiogenèse, la régénération nerveuse et la différenciation de cellules souches sont d'autres processus pouvant être modélisés par génie tissulaire.

1.6.2.1 Les modèles de réépithélialisation

La recherche sur les plaies cutanées est justifiée par la prévalence croissante des plaies et des ulcères au Canada [739-742]. Ainsi les brûlures, les ulcères diabétiques, les fractures ouvertes, les plaies de lit et les incisions chirurgicales doivent être réépithélialisés rapidement pour prévenir l'infection. Plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro* permettent l'étude de la réépithélialisation.

Des modèles d'études *in vivo* ont été développés avec différentes espèces, dont le rat, la souris, le lapin et le cochon. Parmi les techniques utilisées pour créer une zone à réépithélialiser, citons l'abrasion par du papier collant, l'excision, l'incision, la succion, l'eau chaude et la chaleur sèche. Des différences particulières à chaque espèce existent par rapport à l'homme dans le processus de réépithélialisation.

Les modèles *in vitro* sont plus souhaitables éthiquement et ils peuvent de plus simplifier l'étude de la réépithélialisation, qui est influencée par tellement d'éléments différents *in vivo* que cela peut rendre les études très complexes à réaliser. Le modèle le plus simple mise sur la culture de kératinocytes en deux dimensions puis sur la création d'un sillon sans cellules qui sera éventuellement refermé par les kératinocytes en migration. Par ailleurs, un modèle *ex vivo* consistant en une peau humaine dans laquelle une excision a été faite a aussi été développé [743]. Cependant dans ces modèles la réépithélialisation a lieu dans un

contexte où un tissu natif cultivé en explant ne peut que se détériorer progressivement *in vitro*.

Enfin, un modèle issu du génie tissulaire a aussi été développé. Ces modèles ont l'avantage de reproduire les interactions entre les composantes du derme et de l'épiderme. L'équipe de la Dre Moulin en a développé un par la méthode d'autoassemblage. C'est un modèle de peau reconstruite, constituée d'un derme et d'un épiderme troués [744]. L'épiderme est régénéré par la migration des kératinocytes à partir des bords de la plaie.

1.6.2.2 Les modèles pour étudier l'angiogenèse

L'étude de l'angiogenèse est essentielle à la compréhension de certaines pathologies de même qu'à celle du remodelage et de la réparation tissulaire. Les modèles d'étude de l'angiogenèse permettent notamment de déterminer la réponse angiogénique en fonction de la concentration d'une substance, d'obtenir des informations morphologiques quantitatives et de vérifier des caractéristiques fonctionnelles [745].

Les modèles d'étude *in vitro* facilitent le contrôle des conditions expérimentales et souvent ils simplifient la mesure de paramètres plus fins comme la migration cellulaire, la prolifération cellulaire ou l'analyse des interactions paracrines. Ces modèles peuvent être bidimensionnels, ils peuvent provenir de tissus cultivés en explant, ou ils peuvent être reconstruits en laboratoire.

Les modèles de co-culture sont plus près de la réalité, car les interactions entre les cellules endothéliales et les autres types cellulaires comme les fibroblastes contribuent à la formation des tubules [746, 747]. Sur cette base, la culture de tissus en explant a l'avantage de regrouper plusieurs types cellulaires et d'être tridimensionnelle. Le modèle de l'aorte de rat est l'un des plus utilisés [748-751]. Cependant, ce modèle a lieu dans un contexte où le tissu en explant se détériore.

Un modèle en trois dimensions de derme endothélialisé reconstruit par génie tissulaire a été développé dans notre laboratoire. Lorsqu'une éponge de collagène et de chitosane est

ensemencée avec des fibroblastes et des cellules endothéliales, des capillaires se créent spontanément sans ajout de facteurs de croissance exogènes [752]. Les capillaires de ce modèle ont des lumières fermées et ils sont organisés en un réseau tridimensionnel [753]. Le succès de ce modèle repose notamment sur la sécrétion par les fibroblastes de facteurs de croissance comme le VEGF, de même que de leur dépôt de matrice extracellulaire dans l'éponge [754]. Le derme endothélialisé reconstruit par génie tissulaire peut être utilisé pour déterminer si un composé est potentiellement angiogénique ou angiostatique [754, 755].

Par rapport au modèle d'angiogenèse issu du génie tissulaire, le contexte physiologique des modèles d'étude de l'angiogenèse *in vivo* est leur principal avantage [756]. L'angiogenèse peut être étudiée directement sur des tissus animaux ou sur des polymères compatibles implantés [745]. Il est ainsi possible de greffer les modèles issus du génie tissulaire si nécessaire [733]. Il existe plusieurs approches *in vivo* (revue dans [756]).

1.6.2.3 Les modèles pour étudier les réseaux nerveux

La régénération nerveuse périphérique est souvent imparfaite, et cela a des conséquences désastreuses chez les victimes. Pour étudier cela, les modèles d'étude tridimensionnels offrent un environnement plus physiologique que les cultures bidimensionnelles. Ils permettent notamment d'étudier l'élongation des fibres nerveuses ou l'impact de la présence d'un réseau nerveux sur les autres types cellulaires.

Divers modèles en trois dimensions ont été utilisés. Les modèles organotypiques peuvent être constitués soit de ganglions nerveux cultivés en explant ou soit de tranches de moelle épinière [757-761]. Parmi les gels, on compte les hydrogels d'agarose additionnés ou non de laminine [762-765], les gels de fibrine [766-768] et le Matrigel [769]. En outre, les gels de collagène sont permissifs à la croissance de cellules de Schwann et à l'élongation des prolongements nerveux de neurones sensoriels [770-772]. De plus, des gels synthétiques ont été développés, comme les gels de fluoropolymères seuls ou additionnés de peptides dérivés de la laminine qui permettent l'extension et le guidage des prolongements de neurones sensoriels [773, 774]. Parmi les substrats poreux, l'acide polylactique tapissé

d'alcool polyvinylique permet la survie de l'élongation des prolongements de neurones sensoriels [775].

La modélisation des réseaux neuronaux à l'aide du génie tissulaire est récente. Notre équipe a notamment développé une nouvelle méthode pour le faire. Elle consiste à reconstruire d'abord un tissu conjonctif avec une épongeensemencée avec des fibroblastes et cultivée deux semaines. Les neurones sensoriels ou moteurs extraits des DRG ou de la moelle épinière de souris au 12^e jour embryonnaire sont ensuite ensemencés à la surface de l'éponge, qui est placée en culture à l'interface air-liquide [776-778]. Cela crée un gradient de facteurs de croissance qui stimule la migration axonale vers l'intérieur du tissu alors que les corps cellulaires des neurones demeurent à la surface. Il est possible d'ajouter un épiderme et des CE [778]. La co-culture de neurones avec d'autres types cellulaires permet d'étudier les interactions entre ces cellules et les neurones. De plus, lorsque ce modèle est greffé chez la souris, des fibres nerveuses en provenance de l'hôte migrent spontanément dans le greffon [779]. Ce modèle requiert l'obtention de neurones de souris fraîchement isolées et une expérience typique nécessite souvent de 6 à 10 semaines de culture.

1.6.3 Les cellules souches pour le génie tissulaire

Le génie tissulaire vise à répondre à un besoin clinique. Ainsi, l'utilisation de cellules humaines et autologues est souhaitable. Dans le cas des peaux reconstruites, l'obtention de tous les types cellulaires désirés (kératinocyte, fibroblastes, cellules de Schwann, etc..) à partir d'un seul prélèvement de peau depuis un site donneur serait souhaitable. Cependant, certains types cellulaires, comme les cellules neurales, sont difficiles à obtenir à partir d'un échantillon de peau. Autrement, le tissu nerveux humain est difficilement accessible. Ainsi pour modéliser expérimentalement des maladies ou des processus cellulaires, l'absence d'alternative peut contraindre l'expérimentateur à l'utilisation de cellules animales plutôt qu'humaines. L'utilisation de cellules animales permet tout de même le développement initial d'un modèle.

La possibilité d'utiliser des cellules souches prélevées dans la peau comme source de cellules difficiles à obtenir par d'autres méthodes ajoute un potentiel énorme aux modèles issus du génie tissulaire [780]. Les cellules souches sont des cellules indifférenciées caractérisées par leur autorenouveaulement, leur cycle cellulaire lent et leur potentiel de différenciation. Pour le génie tissulaire, les cellules souches peuvent être différenciées puis ajoutées dans les tissus reconstruits ou alors être incluses directement sans différenciation préalable [781-783]. Enfin, il est possible de les modifier génétiquement afin de corriger un défaut, d'apporter des agents pharmacologiques ou encore de produire des facteurs de croissance.

Les cellules souches peuvent être embryonnaires, reprogrammées et adultes. Les cellules souches adultes sont particulièrement intéressantes pour le génie tissulaire, car elles peuvent être autologues et elles ne posent pas de problèmes éthiques, contrairement aux cellules souches embryonnaires [784]. De plus, elles ont déjà été greffées chez des patients, alors que plusieurs défauts de reprogrammation de même que d'autres enjeux empêchent pour l'instant l'utilisation des cellules souches dérivées de cellules reprogrammées chez l'homme [785-790]. Cependant, les cellules souches adultes peuvent avoir un potentiel de différenciation plus restreint que les cellules souches embryonnaires humaines ou reprogrammées.

1.6.3.1 Les cellules souches de la peau

La peau adulte contient plusieurs types de cellules souches, dont les cellules souches épidermiques, les *skin-derived precursor cells* (SKP) et les *adipose-derived stem/stromal cells* (ASC).

D'abord, des cellules souches adultes épidermiques permettent le renouvellement de l'épiderme (section 1.1.1.2). Ensuite, les SKP proviennent de la crête neurale. Elles migrent durant l'embryogenèse et nichent dans les follicules pileux chez l'adulte. Les SKP auraient un certain potentiel de différenciation et elles contribueraient à l'homéostasie du derme et des follicules pileux [791-793]. Enfin, les ASC sont des cellules souches d'origine mésenchymateuse présentes dans les tissus adipeux [794]. Elles pourraient représenter jusqu'à 2 % des cellules de l'hypoderme [795-798]. Les ASC ont un large potentiel de

différenciation, pouvant notamment se différencier en chondrocytes, en neurones, en cellules musculaires, en ostéoblastes et en adipocytes *in vitro* [797-803].

1.6.3.1.1 Les cellules souches des tissus adipeux

Les ASC sont caractérisées par l'expression de certains marqueurs de cellules souches mésenchymateuses (CD10, CD13, CD29, CD34, CD44, CD54, CD71, CD90, CD105, CD106, CD117, et Stro-1); elles sont négatives pour certains marqueurs hématopoïétiques (CD45, CD14, CD16, CD56, CD61, CD62E, CD104, CD106) et endothéliales (CD31, CD144, et vWF) [798, 804, 805]. Elles ont une morphologie proche de celle des fibroblastes *in vitro* [806]. Leur origine n'est pas claire. Certains suggèrent qu'elles sont dérivées de cellules circulantes provenant de la moelle osseuse qui s'infiltreraient dans le compartiment adipeux par les parois des vaisseaux et d'autres suggèrent qu'elles seraient des péricytes (voir [806] pour une revue) .

1.6.3.2 L'intérêt d'avoir des cellules de Schwann humaines pour le génie tissulaire grâce aux cellules souches stromales des tissus adipeux

Les cellules de Schwann (CS) ont la capacité de favoriser la régénération nerveuse dans les nerfs périphériques [807]. Leur capacité à améliorer la régénération nerveuse pourrait être utilisée pour favoriser la régénération nerveuse en médecine régénérative. Même si les cellules souches adultes n'ont pas toutes le même potentiel de différenciation, des cellules souches adultes provenant de différents tissus ont pu être induites à avoir un phénotype similaire à des cellules de Schwann : les cellules souches adultes de la moelle osseuse [808-814], de cordons ombilicaux [815] des follicules pileux [793, 816, 817] et des tissus adipeux [810, 812, 813, 818-820].

L'utilisation des cellules souches des tissus adipeux pour l'obtention de cellules de Schwann est avantageuse étant donné que les ASC peuvent être prélevées par lipoaspiration, une procédure courante et peu invasive. De plus, cette population cellulaire est très abondante et elle a déjà été greffée chez l'homme [785-789]. Enfin, les ASC sont intéressantes de par leur grand potentiel de différenciation [821].

1.7 Problématiques du projet de recherche

L'importance des facteurs neurotrophiques pour le développement et la survie des neurones sensoriels est bien établie. Leur expression dans la peau humaine native fut notamment décrite par analyse des transcrits d'ARN messagers [822, 823]. Le NGF et le BDNF, deux FN qui induisent avec d'autres molécules diffusibles le développement de l'innervation dans la peau, influencent positivement la croissance du réseau vasculaire dans d'autres tissus. Cela suggère qu'il est possible que d'autres FN favorisent l'angiogenèse, mais cela n'a pas été spécifiquement vérifié. L'acquisition de nouvelles connaissances sur un effet positif des facteurs neurotrophiques de la peau sur l'angiogenèse est pertinente dans le contexte de la réparation tissulaire et de la pathogenèse, comme cela sera discuté. On ignore par ailleurs si le NGF est plus puissant que le BDNF ou que d'autres FN pour favoriser l'angiogenèse, car la comparaison n'a pas été faite. Mon premier objectif est de décrire par immunofluorescence et analyse ELISA l'expression des FN par les types cellulaires majeurs de la peau pour ensuite vérifier leur influence sur le développement d'un réseau vasculaire.

Dans un second temps, les connaissances actuelles en neurobiologie cutanée suggèrent que les fibres nerveuses sensorielles font beaucoup plus que détecter les stimuli externes et les transmettre au SNC. Par exemple, durant le développement, elles influencent l'organisation et la différenciation en artères des vaisseaux sanguins, elles accélèrent l'apparition des papilles dermiques et elles favorisent la guérison normale des plaies chez les fœtus. Durant la vie adulte, leur absence altère l'épiderme dans les modèles murins et elle altère toutes les étapes de la guérison des plaies chez l'homme. Ainsi, plusieurs indices peuvent permettre de poser l'hypothèse que le SNP influence favorablement la peau en contribuant à son homéostasie. L'absence d'innervation altère toutes les étapes de la guérison des plaies, incluant la réépithélialisation, mais les mécanismes causaux doivent être précisés. Les études réalisées jusqu'à maintenant sont peu nombreuses et elles utilisent principalement des modèles d'études murins. Leur thèse dominante est que les changements survenant dans les interactions entre les neurones sensoriels et leurs cellules cibles contribuent à

l'influence du SNP sur la réépithélialisation. Des neuropeptides libérés par les fibres nerveuses, comme la SP et le CGRP, sont en concentration moindre dans la peau lorsqu'elle est dénervée [56, 614-616, 619, 824]. Or, le processus de guérison dans son ensemble est accéléré par leur application exogène [825-827] et il est ralenti par leur diminution [826, 828]. Certains travaux pourraient suggérer que l'augmentation des niveaux de SP et de CGRP a un impact positif sur la réépithélialisation [824]. Les études portant sur l'influence des nerfs sensitifs sur la réépithélialisation cutanée ont été réalisées très majoritairement chez le rat ou la souris plutôt que chez l'homme. Conséquemment, leurs conclusions sont difficilement transposables à l'homme. En effet, le mécanisme de guérison même diffère : contrairement à l'homme, les rongeurs guérissent leurs plaies principalement par contraction plutôt que par réépithélialisation. Par ailleurs, un autre obstacle complique l'étude des interactions directes entre les fibres nerveuses et les kératinocytes dans un contexte tissulaire, soit la difficulté d'enlever totalement les cellules immunitaires de la zone de la plaie. C'est une problématique majeure, car les neuropeptides induisent le processus d'inflammation neurogène, qui implique la vasodilatation des vaisseaux sanguins et recrutement de cellules immunitaires dans la plaie. Ces dernières influencent à leur tour le processus de guérison notamment par leur sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines. Ainsi, les interactions entre les neurones sensoriels et la peau sont surtout décrites pour leur action sur le système immunitaire. Notre second objectif est de déterminer si les nerfs sensoriels influencent la réépithélialisation directement, sans l'intermédiaire du système immunitaire, par l'intermédiaire de la SP. Pour étudier cela, les modèles de peaux reconstruites par génie tissulaire offrent des avantages décisifs sur les difficultés intrinsèques aux autres modèles d'études. En développant un modèle de réépithélialisation reconstruit par génie tissulaire, les cellules immunitaires seront absentes si on ne les ajoute pas et nous serons tout de même dans un contexte tissulaire.

Le groupe de recherche du Dr Berthod, auquel je me suis joint, est situé au laboratoire d'organogénèse expérimentale et il est spécialisé dans l'étude de la régénération nerveuse et dans la modélisation du système nerveux périphérique. Les problématiques de recherches décrites seront étudiées en s'appuyant notamment sur la compétence et les atouts de ce groupe. Les tissus reconstruits par génie tissulaire offrent un énorme potentiel pour modéliser et comprendre le rôle cutané du SNP. Ce sont des outils prometteurs pour

élucider les interactions entre les différents types cellulaires et leur environnement. L'innervation étant nécessaire au bon fonctionnement de la plupart des tissus, la régénération nerveuse après une greffe doit être achevée dans les tissus greffés. Des travaux que j'ai réalisés en ce sens durant mon doctorat ont été annexés pour consultation.

2 Les facteurs neurotrophiques NGF, BDNF, NT-3 et GDNF augmentent l'angiogenèse in vitro

Avant-propos

Ce chapitre fait l'objet d'un article intitulé *NGF, BDNF, NT-3 and GDNF enhance angiogenesis in vitro* qui est soumis dans la revue *Tissue Engineering*.

J'ai conçu, réalisé et écrit en collaboration avec Dr. François Berthod 95 % des expériences décrites dans ce manuscrit.

2.1 Résumé

La peau est une source majeure des facteurs neurotrophiques NGF, BDNF, NT-3 et GDNF qui influencent très favorablement le développement de l'innervation sensitive cutanée. Outre leur contribution neuronale, nous avons émis l'hypothèse que les facteurs neurotrophiques modulent également le réseau microvasculaire cutané. Tout d'abord, nous avons montré que le NGF, le BDNF, le NT-3 et le GDNF sont tous exprimés dans l'épiderme, tandis que le NGF et le NT-3 sont exprimés par les fibroblastes et que le BDNF l'est par les cellules endothéliales humaines. Nous avons montré que ces peptides sont de très puissants facteurs angiogéniques en utilisant un modèle de derme endothélialisé humain reconstruit par génie tissulaire. Une augmentation de 40 à 80% du nombre de capillaires en forme de tubes fut observée après l'addition de 10 ng / ml de NGF, 0,1 ng/ml de BDNF, 15 ng/ml de NT-3, et 50 ng/ml de GDNF. Il s'agit de la première étude sur l'effet direct angiogénique pour le NT-3 et le GDNF sur les HUVEC et les HDMEC. Cet effet angiogénique dépend de la liaison avec les récepteurs des facteurs neurotrophiques TrkA, TrkB, GFRa-1 et c-ret, qui sont tous exprimés par les cellules endothéliales humaines, tandis que cet effet a été bloqué pour les neurotrophines par l'addition de l'antagoniste des Trk, le K252a. Ainsi, si le NGF, le BDNF, le NT-3 et le GDNF influencent même modérément le réseau microvasculaire dans la peau saine, ils ont le potentiel d'accroître considérablement l'angiogenèse dans des situations pathologiques.

2.2 NGF, BDNF, NT-3 and GDNF enhance angiogenesis in vitro

Mathieu Blais, Philippe Lévesque, Sabrina Bellenfant, François Berthod*.

Centre CMDGT/LOEX de l'Université Laval, Centre de recherche FRSQ du Centre hospitalier universitaire de Québec, and Département de Chirurgie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada

Keywords : Neurotrophic factors, angiogenesis, skin.

Abstract

Skin is a major source of secretion of the neurotrophic factors NGF, BDNF, NT-3 and GDNF controlling cutaneous sensory innervation. Beside their neuronal contribution, we hypothesized that neurotrophic factors also modulate the cutaneous microvascular network. First, we showed that NGF, BDNF, NT-3 and GDNF were all expressed in the epidermis, while only NGF and NT-3 were expressed by cultured fibroblasts, and BDNF by human endothelial cells. We demonstrated that these peptides are highly potent angiogenic factors using a human tissue-engineered angiogenesis model. A 40 to 80% increase in the number of capillary-like tubes was observed after the addition of 10 ng/ml of NGF, 0.1 ng/ml of BDNF, 15 ng/ml of NT-3, and 50 ng/ml of GDNF. This is the first characterization of the direct angiogenic effect of NT-3 and GDNF. This angiogenic effect was mediated directly through binding with the neurotrophic factor receptors TrkA, TrkB, GFR α -1 and c-ret that were all expressed by human endothelial cells, while this effect was blocked by addition of the Trk inhibitor K252a. Thus, if NGF, BDNF, NT-3, and GDNF may only moderately regulate the microvascular network in normal skin, there potential to greatly increase angiogenesis in pathological situations needs to be assessed carefully.

Introduction

The Nerve growth factor (NGF), the Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and the Neurotrophin-3 (NT-3) are members of the neurotrophin family of growth factors. Neurotrophins are well known to regulate growth, survival, differentiation, function and plasticity of neuronal cells [1]. NGF is the preferred ligand for the tyrosine kinase receptor tropomyosin-related kinase A (TrkA), BDNF for TrkB and NT-3 for TrkC. NT-3 has also been shown to activate TrkA and TrkB [2]. Trk activity leads to activation of Ras, phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase C- γ 1, and signaling pathways downstream of these proteins, including the mitogen-activated protein kinases [3]. All neurotrophins can also bind with smaller affinity the p75 receptor [1]. The neurotrophin family belongs to a larger collection of secreted factors called neurotrophic factors. They include, among others, the Glial-derived neurotrophic factor (GDNF) with its multi-component receptor system Gfr α -1 and c-Ret [4].

The epidermis is known to be a major source of neurotrophic factors, including NGF, BDNF, NT-3 and GDNF, to support skin innervation [5, 6]. Moreover, NGF has been demonstrated to promote keratinocyte proliferation, which express TrkA and p75 in the basal layer of the epidermis [7]. Thus, neurotrophic factors do not only control the cutaneous innervation, but could also modulate epidermal homeostasis. In addition, NGF and BDNF have been shown to promote angiogenesis in other tissues and context [8-12]. Angiogenesis is defined as the formation of new blood vessels from pre-existing ones. The link between NGF and angiogenesis is notably intriguing in the context of skin repair, remodeling and pathogenesis. NGF is known to be upregulated in psoriatic skin, while increased angiogenesis contribute to this disease. Thus NGF, as well as other neurotrophic factors could participate at least in part to the modulation of the dermal microvascular network in normal skin as well as in pathological situation like wound healing and psoriasis. However, if NGF expression in the epidermis has been well described, the specific secretion of BDNF, NT-3 and GDNF in skin was not known. Most importantly, the

secretion of each factor from the epidermis and from the dermal fibroblasts, endothelial cells and Schwann cells has never been quantified.

We hypothesized that NGF, BDNF, NT-3 and GDNF were all expressed in skin in significant amounts and that these neurotrophic factors are highly potent angiogenic factors.

Materials and methods

Cell isolation

Fibroblasts were isolated from human skin biopsies after breast reductive surgeries as previously described [13] using 0.2 IU/ml collagenase H (Roche Diagnostics, Laval, Canada). The study was approved by the CHA research ethical committee DR-002-951. Cells were grown in Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Burlington, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, UT) and antibiotics: 100 U/ml penicillin G (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) and 25 µg/ml gentamicin (Shering, Pointe-Claire, Canada) in 8% CO₂ at 37°C. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from healthy newborns by enzymatic digestion with 0.25 µg/ml thermolysin (Sigma-Aldrich) as previously described [14]. Human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) were purified from human foreskin using Dynabeads coupled with anti-CD31 antibodies (DynaL Biotech, Lake Success, NY)[15]. HUVEC and HDMEC were grown on collagen coated surface in Endothelial Growth Medium-2 (EGM-2; Cambrex Bioscience Baltimore, Inc., Baltimore, MD) and characterized as previously described [16]. Sensory neurons and Schwann cells were extracted from the dorsal root ganglia of mouse embryos (E13) and were cultured as previously described [17].

Indirect immunofluorescence

Indirect immunofluorescence assays were performed on paraformaldehyde (4%) or formaldehyde (3.7%) followed by methanol (100%) fixed culture cells or frozen tissue sections embedded in O.C.T compound (Sukura, Finetek U.S.A. Inc., Torrance, CA). For tissues fixed with paraformaldehyde, a further step of permeabilization was performed with PBS containing 0.5 % (v/v) Triton X-100 (Bio-Rad, Hercules, CA). The primary antibodies used were: goat polyclonal anti-human TrkA, TrkB, TrkC, GFR α -1 and c-Ret (R&D Systems, Minneapolis, MN), mouse monoclonal anti-human NGF R/TNFRSF16 (R&D Systems), sheep polyclonal anti-human platelet-endothelial cellular adhesion molecule-1

(PECAM-1; R&D Systems), rabbit polyclonal anti-human von Willebrand Factor (vWF; Dako Diagnostics Canada Inc., Mississauga, Canada), sheep polyclonal anti-mouse NGF, BDNF, NT-3 and GDNF (millipore, Billerica, MA). The secondary antibodies used were: goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor®488, chicken anti-goat IgG Alexa Fluor®488, donkey anti-sheep IgG Alexa Fluor®594, chicken anti-rabbit IgG Alexa Fluor®594 (all from Invitrogen), goat anti-mouse IgG FITC, goat anti-rabbit IgG FITC, rabbit anti-goat IgG Biotin (all from Upstate), Alexa®488-conjugated Streptavidin (Invitrogen). Cell nuclei were labeled with Hoechst reagent 33258 (Sigma-Aldrich). As a control, the primary antibody was omitted.

ELISA analysis

Supernatants of cultured cells were harvested, clarified by centrifugation and frozen at -80°C. Lysates of epidermis were obtained following digestion with dispase II (Sigma-aldrich) for 3 h at 37°C and crushing of the epidermis in liquid nitrogen. The lysis buffer contained 137mM NaCl, 20mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% NP40, 10% glycerol, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Sigma-aldrich), 10 µg/ml aprotinin (Sigma-aldrich), 1µg/ml leupeptin (Sigma-aldrich), 0.5mM sodium vanadate (Sigma-aldrich), and Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics). NGF, BDNF, NT-3 and GDNF contents from culture supernatants or epidermis were assayed at 450 nm using the E-Max ImmunoAssay system (Promega, Madison, Wi) according to the manufacturer's instructions.

Preparation of the collagen/chitosan biopolymer

Collagen sponges were prepared as described previously [18] without chondroitins 4-6 sulphates. Briefly, type I and III bovine collagen (Symatase, Chaponost, France) and chitosan (Kemestrie Inc., Sherbrooke, Canada) were dissolved in 0.1% acetic acid, mixed, and 1 ml/well (3.8 cm²) of the final solution was poured in 12-well plates (BD Biosciences, Mississauga, Canada), frozen at -80°C, and lyophilized in a vacuum lyophilizer (Dura-Stop™ Freeze-Dryer; FTS Systems inc., Stone Ridge, NY).

Preparation of the tissue-engineered model of angiogenesis

The model was prepared by the addition of a 1:1 ratio suspension of human dermal fibroblasts and HUVEC or HDMEC on the top of the collagen sponge. Each cell type was seeded at a concentration of 2.1×10^5 cells/cm² and culture medium was added two hours later. The sponges were cultured for 10 days in immersion and fed with a 1:1 ratio of EGM-2 : DMEM, supplemented with 75 µg/ml ascorbic acid. Subsequently, they were cultured for 7 days in a 3:1 ratio of DMEM-Ham's F-12 medium supplemented with 10% FBS, 0.4 µg/ml hydrocortisone, 5 µg/ml bovine insulin, 100 µg/ml ascorbic acid and antibiotics. The constructs were then elevated to the air-liquid interface for the remaining 14 days.

Treatment with neurotrophic factors and inhibitors

NGF 2.5S (Invitrogen), BDNF, NT-3 and GDNF (Cell Sciences, Canton, MA) were added in the culture medium at three successive doses on days 17, 19, and 21 at the following concentrations: NGF (1, 10, 50, and 100 ng/ml), BDNF (0.01, 0.1, 1, and 10 ng/ml), NT-3 (1, 15, 60 and 120 ng/ml), and GDNF (1, 10, 50, 100 ng/ml). For the stimulation of the construct containing HDMEC and all other experiments using neurotrophic factors, 10 ng/ml of NGF, 0.1 ng/ml of BDNF, 15 ng/ml of NT-3 or 50 ng/ml of GDNF were tested. For the Trk receptors inhibition studies, constructs were cultured with the above mentioned neurotrophins, and with 100 nM of the antagonist of TrkA, B, C (K252a; Calbiochem) dissolved in 1 mM DMSO, or 1mM DMSO alone in the controls.

Quantification of capillary-like tubes (CLT) and evaluation of their maximal depth of migration in the angiogenesis model

Six microns transversal histological sections covering the whole construct were stained with Masson's trichrome and visualized with a Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon, Montreal Canada). CLT were counted by a single observer in a blinded fashion. To evaluate the maximal depth of migration, immunofluorescent staining of human PECAM-1 was performed on whole construct transversal sections. Individual high-resolution images were assembled in Adobe® Photoshop® 10.0 (San Jose, CA, USA) to reconstitute the total

section of the construct. The maximum depth of migration of the CLT was determined in an automated fashion using MATLAB[®] version 6.5 (Math Works, USA) with the resolution of 1 pixel (0.5 μ m).

Western immunoblotting

Cells were lysed in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% Nonidet p40, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, Complete Protease Inhibitor Cocktail, 1 mM PMSF. The primary antibodies were: goat polyclonal anti-human TrkA (R&D Systems), rabbit polyclonal anti-human phospho-TrkA (Tyr490 and Tyr674/675; Cell Signaling Technologies, Beverly, MA), rabbit polyclonal antibody anti-mouse TrkB (Santa Cruz, Santa Cruz, CA), mouse monoclonal anti-actin (Upstate). Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (ECL Plus Western blotting kit, Amersham Biosciences) using rabbit anti-goat IgG horseradish peroxidase-conjugated (Upstate), goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-conjugated (Sigma-Aldrich) or goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase-conjugated (Upstate). For the endothelial cells stimulation with NGF for western blot analysis of TrkA phosphorylation, confluent HUVEC were starved overnight in EGM-2 containing 0.1 % serum and incubated with EGM-2 containing 0.1 % serum and 100 ng/ml NGF (Invitrogen) for 5 or 15 minutes.

Intracellular phosphorylation analysis following treatment with neurotrophic factors

For the HDMEC stimulation, cells were starved 15 h in EGM-2 containing only 0.1 % serum and incubated with EGM-2 containing only 10 ng NGF (Invitrogen), 0.1 ng/ml BDNF, 15 ng/ml NT-3 or 50 ng/ml GDNF (Cell science). Then, Proteome Profiler human phospho-kinase antibody arrays (R&D Systems) were used according to the manufacturer's instructions. Significant results are presented as the mean of at least 3 different experiments as the relative pixel densities in respect to the control, more or less the standard deviation.

Statistical analysis

Values were expressed as the means more or less the standard deviation. Statistical analysis was performed using the Student's bilateral t-test with variance equal, $p < 0.05$ was regarded

as significantly different. Each experiments were reproduced at least twice to ensure reproducibility.

Results

Expression of NGF, BDNF, NT-3 and GDNF in normal human skin

NGF immunostaining of human skin was homogeneously distributed in the dermis and the epidermis (Figure 2-1 A). Although NGF and all other neurotrophic factors tested were not detected in supernatants of cultured keratinocytes, they were measured by ELISA in native lysed epidermis, which expressed 5.6 ± 1.8 pg/mg of NGF (Tableau 2-1). Cultured fibroblasts released 53.65 ± 25.8 pg/ 10^6 cells/ml NGF, and Schwann cells 35.6 ± 10.8 pg/ 10^6 cells/ml. BDNF immunoreactivity was present in the epidermis and in the dermis (probably corresponding to capillaries) (Figure 1 B). Epidermis contained 12.0 ± 8.9 pg/mg BDNF while Schwann cells secreted 37.3 pg/ 10^6 cells/ml BDNF (Tableau 2-1). Human vein endothelial cells (HUVEC) secreted 68.3 pg/ 10^6 cells/ml BDNF but human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) did not express detectable BDNF. NT-3 staining was found in all layers of the epidermis (Figure 2-1 C). Fibroblasts expressed 45.0 ± 14.4 pg/ 10^6 cells/ml of NT-3 while 7.9 ± 6.6 pg/mg NT-3 were measured in lysed epidermis. Immunostaining for GDNF was detected in the suprabasal layers of the epidermis (Figure 2-1 D) that expressed 39.8 ± 27.2 pg/mg GDNF in native lysed epidermis and 42.0 ± 25.6 pg/mg for Schwann cells culture supernatant (Table 2-1).

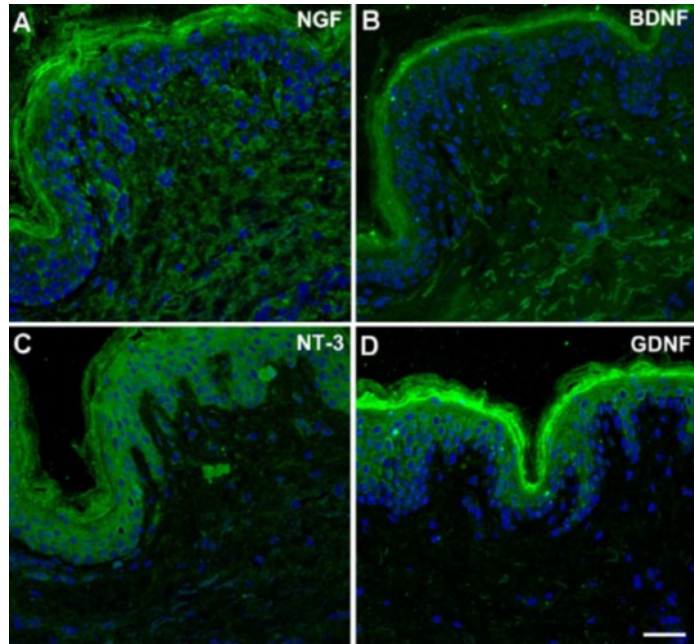


Figure 2-1. NGF, BDNF, NT-3 and GDNF expression in human skin. The expression of neurotrophic factors in human skin was assessed by immunofluorescent staining of normal human skin cross sections. The four neurotrophic factors NGF (A), BDNF (B), NT-3 (C) and GDNF (D) were expressed in epidermis, while NGF and BDNF were also detected in the dermis. Bar in D = 40 μ m.

Tableau 2-1 : Release of NGF, BDNF, NT3 and GDNF by epidermis and fibroblasts, endothelial cells, Schwann cells and neurons.

Neurotrophic factors were quantified by ELISA from culture supernatant of human fibroblasts and endothelial cells, rat Schwann cells and mouse sensory neurons, and from fresh human epidermis. A minimum of 3 different samples from 3 different donors were used for each assay. The results are presented as the mean +/- standard deviation (- : no detection).

Specimen	NGF	BDNF	NT-3	GDNF
<i>Tissue lysate (pg/mg)</i>				
Human epidermis	5,6 ± 1,8	12,0 ± 8,9	7,9 ± 6,6	39,8 ± 27,2
<i>Culture supernatant (pg/million of cells/ml)</i>				
Dermal fibroblasts	53,6 ± 25,8	-	45,0 ± 14,4	-
HUVEC	-	68,3 ± 29,4	-	-
HMVEC	-	<i>below detection range</i>	-	-
Schwann cells	35,6 ± 10,8	37,3 ± 19,2	-	42,0 ± 25,6
Sensory neurons	-	-	-	-

NGF, BDNF, NT-3 and GDNF promote angiogenesis

To assess whether neurotrophic factors could promote angiogenesis and to compare their specific angiogenic potential, we used a tridimensional tissue-engineered model of angiogenesis made of human dermal fibroblasts and endothelial cells cultured in a collagen sponge. The number of capillary-like tubes (CLT) in the model cultured in presence of each neurotrophic factors was significantly higher compared to controls (Figure 2-2 B). These differences were clearly visible on the Masson's trichrome staining (Figure 2-2 A). There was 40% more CLT in constructs treated with 10 ng/ml of NGF ($p=0.006$), 80% more CLT in constructs treated with 50 ng/ml GDNF ($p=0.00002$) or 0.1 ng/ml BDNF ($p=0.0001$), and 70% more CLT in constructs treated with 15 ng/ml NT-3 ($p=0.0004$), compared to control. These results were confirmed with HDMEC extracted from human skin and treated with 10 ng/ml of NGF, 0.1 ng/ml of BDNF, 15 ng/ml of NT-3 and 50 ng/ml of GDNF. The increase in the number of CLT was limited to 20% in the constructs made of HDMEC (Figure 2-2 C).

The addition to the construct of K252a, a specific inhibitor of Trk, abolished the increase of CLT induced by NGF, BDNF or NT-3 (Figure 2-2 D).

To further investigate the remodeling of the CLT network induced by neurotrophic factors in the model, the maximal depth of migration of the CLT was measured according to immunohistochemical staining of PECAM-1 in the constructs made of HUVEC (Figure 2-3 A-E) and HDMEC. The CLT were observed migrating significantly deeper in the models in respect to the controls for all the conditions with the neurotrophic factors (Figure 2-3 F-G). The average depth of migration with HUVEC was $244 \pm 28 \mu\text{m}$ in control, $359 \pm 83 \mu\text{m}$ in NGF ($p=0.03$), $361 \pm 131 \mu\text{m}$ in BDNF ($p=0.06$), $394 \pm 72 \mu\text{m}$ in NT-3 ($p=0.006$) and $387 \pm 32 \mu\text{m}$ in GDNF ($p=0.0001$). The average depth of migration with HDMEC was $307 \pm 15 \mu\text{m}$ in control, $443 \pm 29 \mu\text{m}$ in NGF ($p=0.02$), $354 \pm 13 \mu\text{m}$ in BDNF ($p=0.05$), $380 \pm 15 \mu\text{m}$ in NT-3 ($p=0.008$) and $376 \pm 21 \mu\text{m}$ in GDNF ($p=0.05$).

In order to assess whether the neurotrophic factors influence the proliferation of endothelial cells, HDMEC and HUVEC were cultured in presence of 10 ng/ml of NGF, 0.1 ng/ml of BDNF, 15 ng/ml of NT-3 and 50 ng/ml of GDNF, but no difference was observed in the number of cells in presence or absence of these neurotrophic factors for 24 hours in monolayer cultures (Supplemental figure 2-5 A). Moreover, this result was confirmed using a colorimetric method to assay the relative number of HDMEC over a 72 hour period of subconfluent culture (Supplemental Figure 2-5 B). Finally, the proportion of HUVEC (over fibroblasts) cultured in the 3D construct with and without neurotrophic factors was quantified by flow cytometry after staining of endothelial cells with antibodies against von Willebrand Factor. NGF, BDNF, NT-3 and GDNF did not induce significant changes in the proportion of HUVEC present in the constructs (Supplemental Figure 2-5 C).

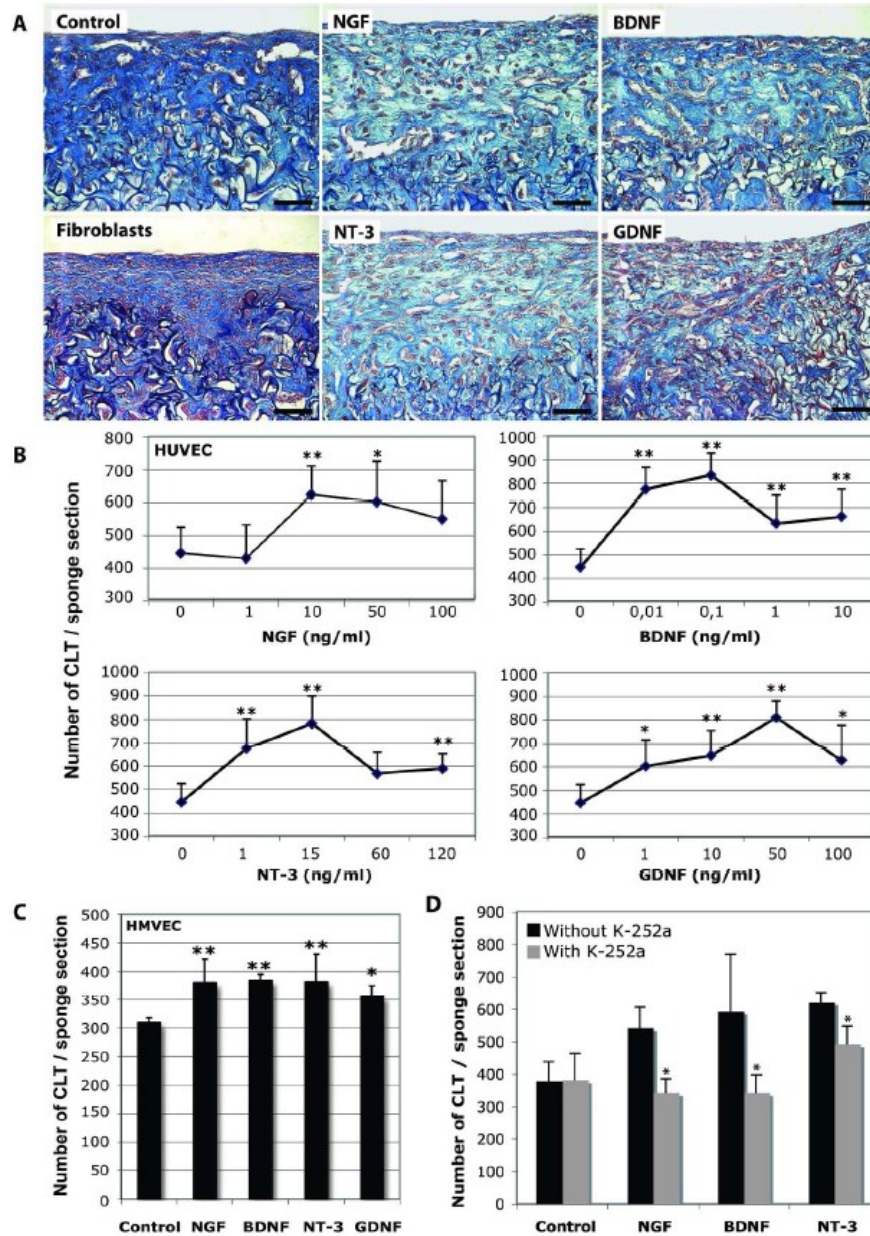


Figure 2-2. Neurotrophic factors induced a significant dose-dependant increase in CLT formation by HUVEC and HDMEC

Neurotrophic factors were added in the culture medium of the construct between days 17 and 24. The analyses were performed on biopsies taken one week after the removal of the neurotrophic factors after 31 days of culture. A : CLT formation was observed on Masson's trichrome staining of 4 μ m thick tissue cross sections. B : In constructs made with HUVEC, the addition of each neurotrophic factors induced the formation of more CLT, with a maximum at 10 ng for NGF, 0.1 ng for BDNF, 15 ng for NT-3 and 50 ng for GDNF (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.02$; $n=5$). C : These optimal concentrations of neurotrophic factors were

used in constructs made of HDMEC instead of HUVEC and also promoted an increase in the number of CLT (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.02$; $n=5$). D : The increase in CLT number induced by NGF, BDNF and NT-3 in our model of angiogenesis with HUVEC was abolished by the inhibition of the Trk receptors with 100 nM of K252a (*: $p < 0.05$; $n=4$). Bar in A = 50 μm .

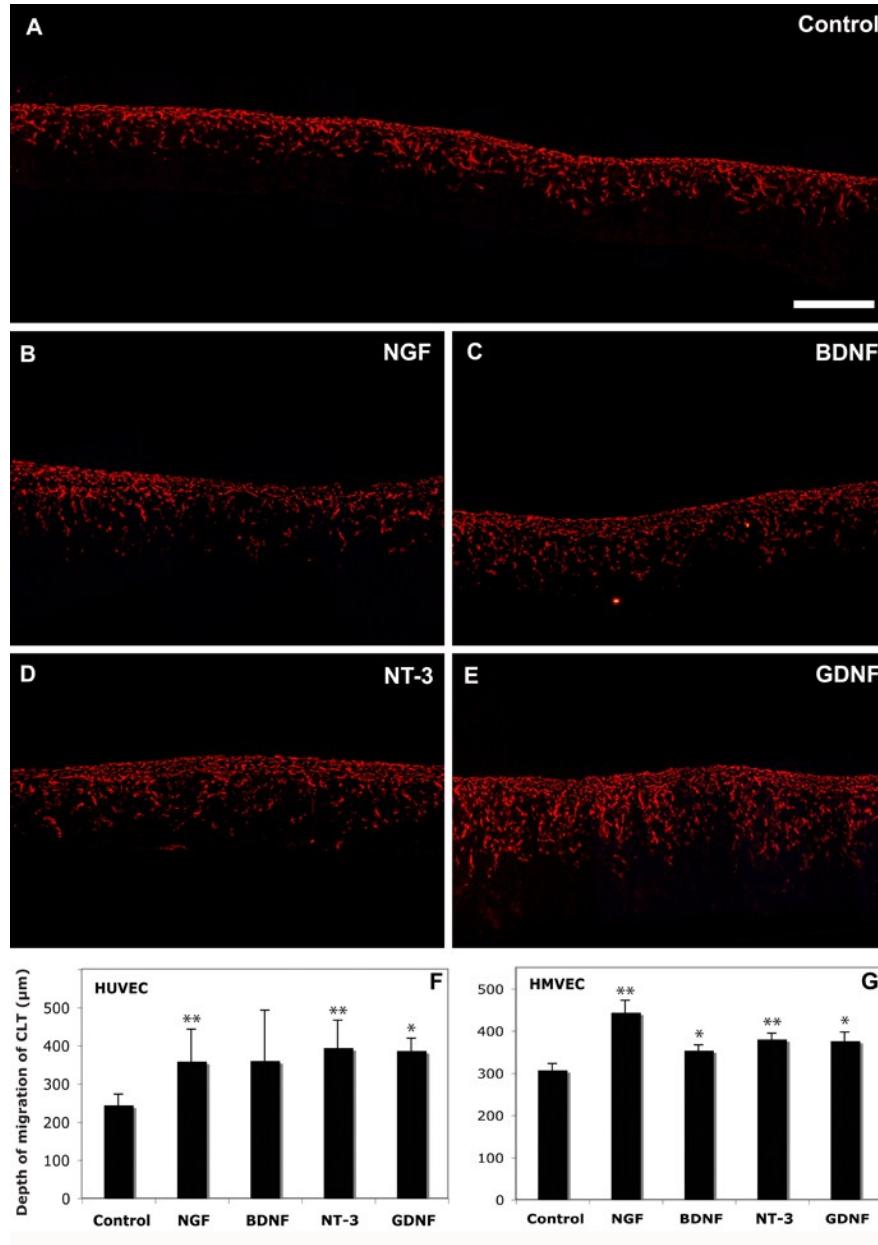


Figure 2-3. The maximum depth of migration of the CLT was increased by the addition of neurotrophic factors in the culture medium. A-E: The CLT were stained with an antibody against human PECAM-1 (red) on 5 µm thick cross-sections. The neurotrophic factors were added at the bottom of the constructs and induced a chemoattractant effect on CLT from top to bottom. The maximum depth of migration of the CLT was determined using Matlab software. F-G: The addition of neurotrophic factors increased the maximum depth of migration in the construct compared with the control for both HUVEC (F) and HDMEC (G) (*: $p < 0.02$; $n = 5$; **: $p < 0.05$; $n = 4$). Bar 250 µm.

Human endothelial cells express the receptors for NGF, BDNF, NT-3 and GDNF

Given the increased number and depth of migration of CLT in presence of neurotrophic factors, we assessed whether the neurotrophic factors receptors were expressed by endothelial cells and/or fibroblasts. The expression of TrkA and TrkB, the preferred high affinity receptors for NGF and BDNF respectively as well as the low affinity receptor for all neurotrophins, p75, were shown by indirect immunofluorescence both on HUVEC (Figure 2-4 A-C) and HDMEC (Figure 2-4 F-H). The preferred high affinity receptor for NT-3, TrkC, was not found to be expressed. However, NT-3 can bind TrkA and TrkB as well as p75. The expression of the GDNF multicomponent receptor complex GFR α -1 and c-Ret tyrosine kinase co-receptor was shown on HUVEC (Fig 2-4 D-E) and HDMEC (Fig 2-4 I-J). No staining for TrkB, TrkC, p75, c-Ret and Gfr α -1 was observed in fibroblasts (not shown).

Western blot analysis of TrkA showed that HUVEC and HDMEC express a variant of the 140 kDa full length receptors at 68 kDa (Figure 2-4 K; lane 1 for keratinocytes, lane 2 for HUVEC, lane 3 for HDMEC, lane 4 for fibroblasts). We showed that stimulation of HUVEC with NGF induces the phosphorylation of TrkA on both Tyr490 and Tyr674/675 (Figure 2-4 M). The phosphorylation on Tyr674/675 has been shown to increase the kinase activity of the receptor [19] while the phosphorylation on Tyr490 is required for the recruitment of the adaptator protein SHC and the subsequent initiation of the MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathways [20, 21].

The main variant TrkB-T1 was also expressed by HUVEC and HDMEC (Figure 2-4 L; lane 1 keratinocyte, lane 2 HUVEC and lane 3 HDMEC). TrkB-T1 was also found in fibroblasts (Figure 2-4 L; lane 4). There was also a strong expression of a band corresponding to the molecular weight of the variant TrkB-T-shc in HUVEC, HDMEC and a light one in fibroblasts. The full length variant of TrkB was detected for HUVEC and HDMEC [22].

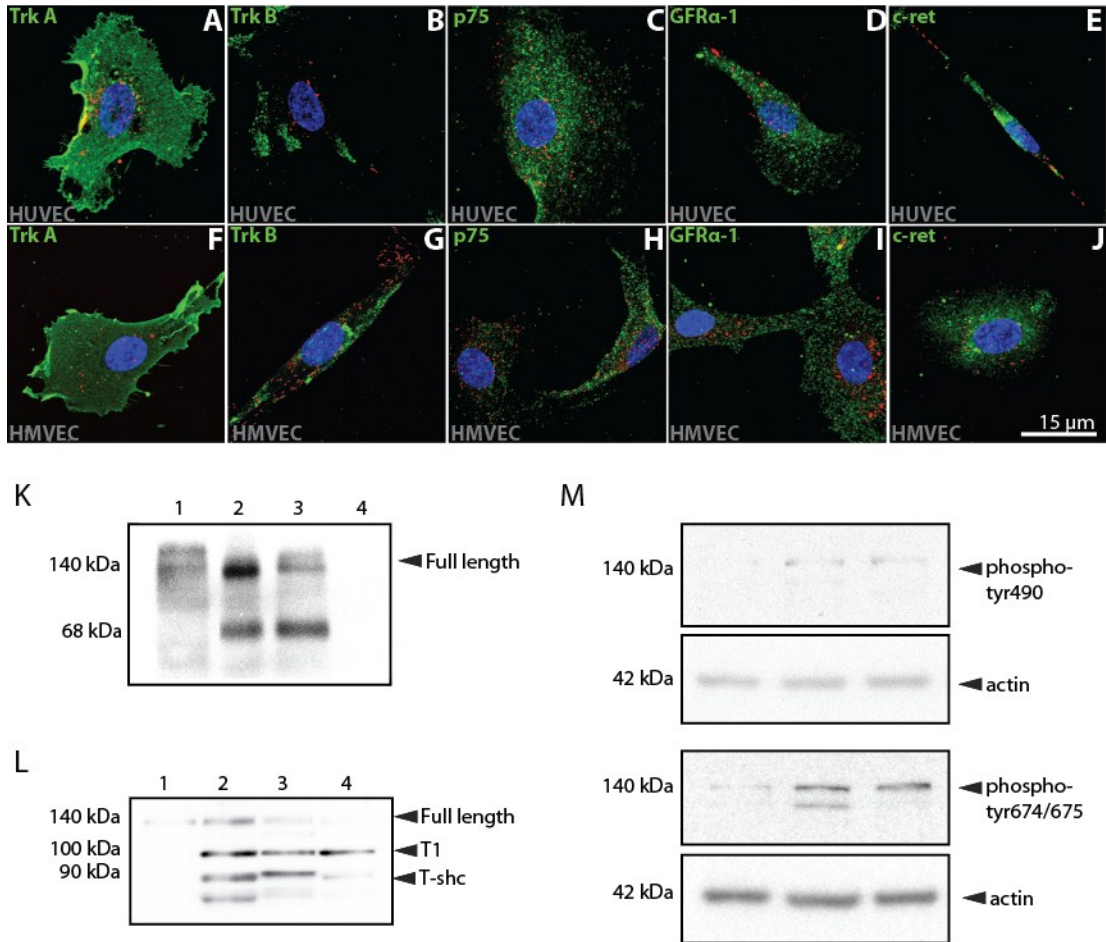


Figure 2-4. Human endothelial cells express TrkA, TrkB, p75, GFR α -1 and c-ret. The expression of the receptors for NGF, BDNF, NT-3 and GDNF on HUVEC and HDMEC was assessed by immunofluorescent staining and western blot analysis. A-J : Expression of TrkA, TrkB, p75, GFR α -1 and c-ret on HUVEC (in green, A to E respectively) and HDMEC (F to J respectively), stained in red with vonWillebrand Factor antibodies. K : Western blot analysis of TrkA expression on total cell lysates. TrkA is expressed on keratinocytes, the positive control (lane 1), on HUVEC (lane 2) and HDMEC (lane 3), but not on fibroblasts (lane 4). The antibody, which can bind the extracellular portion of TrkA, revealed a TrkA variant at 68 kDa that was only present in endothelial cells. L : Western blot analysis of TrkB expression on total cell lysates. We found a weak band at 140 kDa for keratinocyte (the positive control, lane 1), for HDMEC (lane 2) and for HUVEC (lane 3) that correspond to the full length variant. For HUVEC and HDMEC (lane 2 and 3 respectively), the strongest staining correspond to the variant TrkB-T1 at 100 kDa. This variant could also be found in fibroblast lysate (lane 4). A band at 90 kDa corresponding to the variant TrkB-T-Shc was also strongly expressed endothelial cells and weakly expressed by fibroblasts. M: In order to assess whether TrkA cell receptors on endothelial cells could be activated, cells were stimulated for 5 minutes (lane 2) or 15

minutes (lane 3) with 100 ng/ml of NGF and the phosphorylation at Tyr490 and Tyr674/675 of the TrkA receptor was analyzed by western blot, showing phosphorylation of TrkA on both residues after 5 minutes.

Neurotrophic factors activate angiogenesis-related signaling pathways in endothelial cells

In order to test whether endothelial cells can be directly activated by NGF, BDNF, NT-3 and GDNF, we assay the phosphorylation status of intracellular effector following 15 min of stimulation with these neurotrophic factors. To establish a relative phosphorylation level (RPL), the stimulated HDMEC were compared to unstimulated HDMEC. A 19 % increase RPL of Focal adhesion kinase (FAK), a 12 % increase in the RPL of Hsp27 and a 61 % decrease in the RPL of PLC γ -1 were observed with NGF (Tableau 2-2). For BDNF, a 23 % increase in the RPL of Mek $\frac{1}{2}$ was detected. NT-3 induced an increase in the RPL of 26 % for p27, 21 % for p70s6 kinase and for Lck, 20 % for FAK and 18 % for Fgr, along with an 86 % decrease of the RPL of RSK 1/2/3. For GDNF, we detected a 12 % increase in the RPL of STAT-Y701 and a 15 % decrease of the RPL of Pyk2-Y402. In addition, we observed no significant difference in the RPL of proteins implicated in a pro-apoptotic response like p53 (Tableau 2-2).

Tableau 2-2. Relative phosphorylation level of intracellular protein in HDMEC stimulated with neurotrophic factors.

HDMEC were stimulated or not for 15 minutes with 10 ng/ml NGF, 0,1 ng/ml BDNF, 15 ng/ml NT-3 or 50 ng/ml GDNF and screened with a Human Phospho-Kinase Array of antibodies. The significant results are presented as the percentage of the relative variation in respect to the control. (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.02$; $n=3$).

Relative Phosphorylation							
NGF		BDNF		NT-3		GDNF	
FAK-Y397	1,19 ± 0,09 *	Mek 1/2-S218/	1,23 ± 0,06 **	p27-T198	1,26 ± 0,05 **	STAT-Y701	1,12 ± 0,03 **
Hsp27-S78/S82	1,12 ± 0,05 **	S222, S222/S226		p70s6kin-T421/S424	1,21 ± 0,1 *	Pyk2-Y402	0,85 ± 0,06 **
PLCγ1-Y783	0,39 ± 0,09 **			Lck-Y394	1,21 ± 0,09 **		
				FAK-Y397	1,20 ± 0,04 **		
				Fgr-Y412	1,18 ± 0,00 **		
				RSK1/2/3-S380	0,14 ± 0,06 **		

Discussion

Skin is known to be a sensory organ. It promotes sensory nerve fibers migration and maintenance at least in part through secretion of NGF by keratinocytes. We hypothesized that keratinocytes could secrete other neurotrophic factors, such as BDNF, NT-3 and GDNF, as well as fibroblasts and endothelial cells and that these factors could contribute to dermal angiogenesis as it was already known for NGF.

Our results confirm that NGF, BDNF, NT-3 and GDNF are expressed by the epidermis, as previously shown at the mRNA level [23]. In addition, we showed that BDNF and GDNF were released in greater amounts than NGF and NT-3 in the epidermis. Unlike the others cell types for which neurotrophins were easily detected in the conditioned medium, neurotrophins derived from keratinocytes were only detected in native lysed epidermis. Since keratinocytes naturally express high level of proteases notably during differentiation and wound healing, we highlight the possibility that proteases degraded neurotrophins in the conditioned medium [24, 25]. Other possibilities include the requirement for specific cell culture condition in vitro such as a proliferative cell population or the need for a missing signaling cue. BDNF and GDNF were not detected by fibroblasts, in contrast with NGF and NT-3. BDNF was expressed by HUVEC, but not by HDMEC in monolayer culture. BDNF secretion by endothelial cells has already been shown in the brain as a major guidance pathway for neural stem cell migration [26]. We assessed the secretion of neurotrophic factors by Schwann cells since they are known to be a major source of neurotrophic factors in the nerve regeneration context and since it was shown elsewhere that there are between 140 and 450 Schwann cells per mm² in the skin [27, 28]. However, because we found that Schwann cells secrete NGF, BDNF and GDNF at levels similar to the others cell types that we tested in the conditioned medium, we suggest they should not be considered as the major source of neurotrophic factors in the skin. There was no secretion of NT-3 by Schwann cells, as reported elsewhere [29]. As expected from the literature, sensory neurons don't produce neurotrophic factors.

The next step of this project was to investigate the potential impact of these neurotrophic factors release on the skin microvasculature. Indeed, the skin capillary network is assumed to be modulated by conventional angiogenic growth factors such as VEGF. However, neurotrophic factors may also participate to the control of skin angiogenesis, and may become in pathological situation such as psoriasis the main source of angiogenic factors in the skin. To better quantify the specific angiogenic potential of each neurotrophic factor, we investigated their effect on CLT formation in vitro using our well-characterized tissue-engineered model of angiogenesis [30-32]. We demonstrated a major increase in the number of CLT for all neurotrophic factors. Indeed, NGF, GDNF and NT-3 induced a 40 to 80% increase in the number of CLT. In addition, BDNF induced an 80% increase of CLT at a 100 to 500 fold lower concentration compared to the other three neurotrophins (0.1 ng/ml). Therefore, BDNF was the most potent angiogenic neurotrophic factors we tested. An angiogenic effect was also obtained with the angiogenesis model made of HDMEC, whereas the increased number of CLT was limited to 20%. This much lower difference is not specific to neurotrophic factors, and is due to the much lower number of CLT formed by HDMEC, justifying the use of HUVEC in a first step to better discriminate the angiogenic potential of compounds.

Since neurotrophic factors were not supposed to be major players in the angiogenic process, it was surprising to see their huge angiogenic potential compared with VEGF that was limited to a 20% increase in our angiogenesis model [31]. Our results suggest that neurotrophic factors induce tubulogenesis and migration of endothelial cells rather than their proliferation. Indeed, the proliferation was unchanged when assayed in classical proliferation assays and the ratio endothelial cells/fibroblasts was unchanged in the 3D model after treatment with neurotrophic factors. We measured the maximum depth of migration of CLT in the construct and we observed that all neurotrophic factors induced a deeper migration of CLT into the sponge. This result demonstrates that neurotrophic factors could probably modulate the organization of the capillary network through a chemoattractant effect.

Our results suggest a direct interaction between neurotrophic factors and endothelial cells. Indeed, the expression of TrkA, TrkB, p75, GFR α -1/c-Ret, the receptors for NGF, BDNF,

NT-3 and GDNF was shown on both HUVEC and HDMEC. A competitive inhibitor for all Trk receptors, K252a, abolished the angiogenic effect induced by NGF, BDNF and NT-3. Meanwhile, western blot analysis showed a phosphorylation on some critical kinase effectors of HDMEC following treatment with NGF. These results suggest that the angiogenic effect is mediated specifically through the Trk receptors.

To better analyze the signaling pathways they activated, we investigated the phosphorylation status of the kinase effectors in HDMEC after treatment with neurotrophic factors. First, stimulation by NGF induced the phosphorylation of FAK and Hsp27. FAK is known to promote endothelial cell migration [33] while hyperphosphorylation of Hsp27 might promote cell cycle arrest [34]. There was also a strong decrease of PLC γ -1 potentially linked to a mitogenic signal [35, 36]. For BDNF, an increase for Mek $\frac{1}{2}$, expressed downstream of the TrkB signaling pathway, was observed [2]. For NT-3, an increase of FAK phosphorylation was observed, as well as of Lck and Fgr, 2 members of the Src family required for the angiogenic process, possibly via the reorganization of the actin cytoskeleton affecting cell migration [37]. NT-3 induced an increase in phosphorylation of p27, shown to modulate cell migration [38], and p70-S6, reported to occur in mitogenic HUVEC [39]. Finally, GDNF promoted phosphorylation for Stat1, reported notably in proliferating endothelial cells [40]. Overall, the phosphorylation status of intracellular kinase following stimulation with each neurotrophic factors is coherent with a pro-angiogenic effect.

This study shows that neurotrophic factors might participate to the regulation of skin microvasculature through the release, mainly from epidermis, of NGF, BDNF, NT-3 and GDNF. These neurotrophic factors can promote angiogenesis by a direct effect on endothelial cells. In addition, this angiogenic potential may be highly potent in pathological situation where neurotrophic factors could be markedly overexpressed. Indeed, angiogenesis is thought to be a major contributor to the pathogenesis of psoriasis with a four-fold increase of capillaries compared to normal skin [41]. However, psoriasis-induced angiogenesis is not due to an increased expression of vascular endothelial growth factor,

the most powerful angiogenic molecule, since its expression remains unchanged in psoriatic lesions [42]. Since NGF expression is known to be markedly upregulated in psoriasis, it may contribute at least in part to angiogenesis. This hypothesis will be further investigated in psoriatic skin, as well as the expression of BDNF, NT-3 and GDNF in this pathology.

Acknowledgments

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR grant MOP-106429), the Canadian Foundation for Innovation and the Réseau de Thérapie cellulaire et tissulaire du Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS). Mathieu Blais is recipient from a Doctoral scholarship from FRQS.

The authors acknowledge Anne-Marie Moisan, Sébastien Larochelle and Myriam Grenier for expert technical assistance.

References

1. Levi-Montalcini, R., The nerve growth factor 35 years later. *Science*, 1987. 237(4819): p. 1154-62.
2. Patapoutian, A. and L.F. Reichardt, Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol*, 2001. 11(3): p. 272-80.
3. Skaper, S.D., The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol*, 2012. 846: p. 1-12.
4. Sariola, H. and M. Saarma, Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci*, 2003. 116(Pt 19): p. 3855-62.
5. Albers, K.M. and B.M. Davis, The skin as a neurotrophic organ. *Neuroscientist*, 2007. 13(4): p. 371-82.
6. Bothwell, M., Neurotrophin function in skin. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 1997. 2(1): p. 27-30.
7. Marconi, A., et al., Expression and function of neurotrophins and their receptors in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 2003. 121(6): p. 1515-21.
8. Calza, L., et al., Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenic and vasoactive factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(7): p. 4160-5.
9. Lazarovici, P., C. Marcinkiewicz, and P.I. Lelkes, Cross talk between the cardiovascular and nervous systems: neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenic effects of nerve growth factor (NGF)-implications in drug development. *Curr Pharm Des*, 2006. 12(21): p. 2609-22.
10. Kermani, P. and B. Hempstead, Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*, 2007. 17(4): p. 140-3.
11. Sun, C.Y., et al., Brain-derived neurotrophic factor inducing angiogenesis through modulation of matrix-degrading proteases. *Chin Med J (Engl)*, 2006. 119(7): p. 589-95.
12. Wagner, N., et al., Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1. *Genes Dev*, 2005. 19(21): p. 2631-42.
13. Germain, L., et al., Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns*, 1993. 19(2): p. 99-104.
14. L'Heureux, N., et al., A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *Faseb J*, 1998. 12(1): p. 47-56.
15. Richard, L., P. Velasco, and M. Detmar, A simple immunomagnetic protocol for the selective isolation and long-term culture of human dermal microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res*, 1998. 240(1): p. 1-6.
16. Black, A.F., et al., In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *Faseb J*, 1998. 12(13): p. 1331-40.

17. Blais, M., M. Grenier, and F. Berthod, Improvement of nerve regeneration in tissue-engineered skin enriched with schwann cells. *J Invest Dermatol*, 2009. 129(12): p. 2895-900.
18. Berthod, F., et al., Optimization of thickness, pore size and mechanical properties of a biomaterial designed for deep burn coverage. *Clin Mater*, 1994. 15(4): p. 259-65.
19. Mitra, G., Mutational analysis of conserved residues in the tyrosine kinase domain of the human trk oncogene. *Oncogene*, 1991. 6(12): p. 2237-41.
20. Chao, M.V., Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*, 2003. 4(4): p. 299-309.
21. Segal, R.A. and M.E. Greenberg, Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci*, 1996. 19: p. 463-89.
22. Luberg, K., et al., Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *J Neurochem*, 2010. 113(4): p. 952-64.
23. Peters, E.M., et al., Neurotrophins act as neuroendocrine regulators of skin homeostasis in health and disease. *Horm Metab Res*, 2007. 39(2): p. 110-24.
24. Ovaere, P., et al., The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends Biochem Sci*, 2009. 34(9): p. 453-63.
25. Zeeuwen, P.L., Epidermal differentiation: the role of proteases and their inhibitors. *Eur J Cell Biol*, 2004. 83(11-12): p. 761-73.
26. Snapyan, M., et al., Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci*, 2009. 29(13): p. 4172-88.
27. Reinisch, C.M. and E. Tschachler, The dimensions and characteristics of the subepidermal nerve plexus in human skin--terminal Schwann cells constitute a substantial cell population within the superficial dermis. *J Dermatol Sci*, 2012. 65(3): p. 162-9.
28. Tschachler, E., et al., Sheet preparations expose the dermal nerve plexus of human skin and render the dermal nerve end organ accessible to extensive analysis. *J Invest Dermatol*, 2004. 122(1): p. 177-82.
29. Zhang, Y.Q., et al., NT-3 gene modified Schwann cells promote TrkC gene modified mesenchymal stem cells to differentiate into neuron-like cells in vitro. *Anatomical Science International*, 2010. 85(2): p. 61-7.
30. Berthod, F., et al., Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. *J Cell Physiol*, 2006. 207(2): p. 491-8.
31. Tremblay, P.L., et al., In vitro evaluation of the angiostatic potential of drugs using an endothelialized tissue-engineered connective tissue. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. 315(2): p. 510-6.

32. Berthod, F., et al., Spontaneous fibroblast-derived pericyte recruitment in a human tissue-engineered angiogenesis model in vitro. *Journal of cellular physiology*, 2012. 227(5): p. 2130-7.
33. Tavora, B., et al., Endothelial FAK is required for tumour angiogenesis. *EMBO Mol Med*, 2010. 2(12): p. 516-28.
34. Trott, D., et al., Effect of phosphorylated hsp27 on proliferation of human endothelial and smooth muscle cells. *Proteomics*, 2009. 9(12): p. 3383-94.
35. Nguyen Tle, X. and J.Y. Ahn, Lipase inactive mutant of PLC-gamma1 regulates NGF-induced neurite outgrowth via enzymatic activity and regulation of cell cycle regulatory proteins. *J Biochem Mol Biol*, 2007. 40(6): p. 888-94.
36. Zapf-Colby, A., et al., Inhibition of PLC-gamma1 activity converts nerve growth factor from an anti-mitogenic to a mitogenic signal in CHO cells. *Oncogene*, 1999. 18(35): p. 4908-19.
37. Kilarski, W.W., N. Jura, and P. Gerwins, Inactivation of Src family kinases inhibits angiogenesis in vivo: implications for a mechanism involving organization of the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res*, 2003. 291(1): p. 70-82.
38. Besson, A., et al., p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev*, 2004. 18(8): p. 862-76.
39. Masri, B., et al., Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *Faseb J*, 2004. 18(15): p. 1909-11.
40. Gomez, D. and N.C. Reich, Stimulation of primary human endothelial cell proliferation by IFN. *J Immunol*, 2003. 170(11): p. 5373-81.
41. Creamer, D., et al., Localization of endothelial proliferation and microvascular expansion in active plaque psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 1997. 136(6): p. 859-65.
42. Liew, S.C., et al., Differential expression of the angiogenesis growth factors in psoriasis vulgaris. *BMC Res Notes*, 2012. 5(1): p. 201.

Supplemental material

Material and methods

Proliferation and flow cytometry analyses

For the proliferation assay, HUVEC and HDMEC on third passage were seeded for 3 days in 75 cm² culture flask coated with gelatin. Then, 75% confluent cells were trypsinized, seeded in multiwells plates coated with gelatin and kept in culture for 24 hours without neurotrophic factors in EGM-2 culture medium. A first count was performed after 24 hours to quantify the number of cells per well (n = 10). Then, the medium in the remaining wells was changed and 10 ng/ml NGF (Invitrogen), 0.1 ng/ml BDNF, 15 ng/ml NT-3 or 50 ng/ml GDNF (all from Cell science) were added in the corresponding wells in a fresh culture medium. A second count was performed after 24 hours, while the cells were still subconfluent. For the proliferation assay with a colorimetric method, the quick cell proliferation testing solution kit (Genscript, Piscataway, NJ) was used according to the manufacturer's protocol. For analysis of the proliferation of HUVEC in the angiogenesis model, the constructs cultured or not in 10 ng/ml NGF (Invitrogen), 0.1 ng/ml BDNF, 15 ng/ml NT-3 or 50 ng/ml GDNF were incubated for 1 h with 12 ml of 0.2 U/ml of liberase 4 (Roche Diagnostics) at 37°C for cell isolation from the sponge. Cells were stained with anti-von Willebrand factor antibodies (Dako Diagnostics) and a goat anti-mouse IgM phycoerythrin-conjugated (Jackson, BIO/CAN Scientific, Mississauga, Canada). Negative control mouse IgG₁ (Dako Diagnostics) were used. The relative level of the labeled cells were quantified by flow cytometry with log amplification using a fluorescence-activated cell sorter (FACScan, BD Biosciences, Oakville, CA).

Results

In order to assess whether the neurotrophic factors influence the proliferation of endothelial cells, HDMEC and HUVEC were cultured in presence of 10 ng/ml of NGF, 0.1 ng/ml of BDNF, 15 ng/ml of NT-3 and 50 ng/ml of GDNF, but no differences were observed in the number of cells in presence or absence of these neurotrophic factors for 24 hours in monolayer cultures (Supplemental figure 2-5 A). Moreover, this result was confirmed using a colorimetric method to assay the relative number of HDMEC over a 72 hour period of subconfluent culture (Supplemental figure 2-5 B). Finally, the proportion of HUVEC (over fibroblasts) cultured in the 3D construct with and without neurotrophic factors was quantified by flow cytometry after staining of endothelial cells with antibodies against von Willebrand Factor. NGF, BDNF, NT-3 and GDNF did not induce a significant change in the proportion of HUVEC present in the constructs (Supplemental figure 2-5 C).

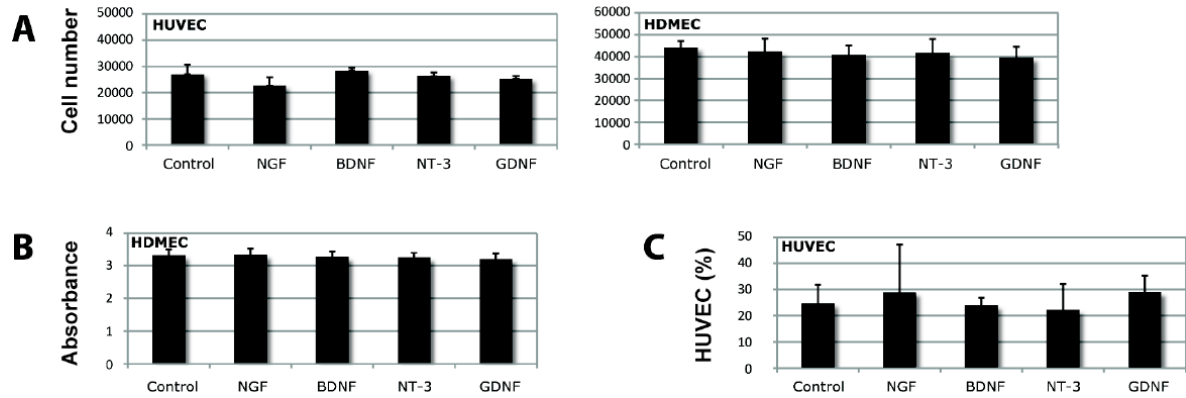


Figure 2-5. Neurotrophic factors did not promote endothelial cell proliferation. A: Ten ng of NGF, 0.1 ng of BDNF, 15 ng of NT-3 and 50 ng of for GDNF had no effect on the cell number of HUVEC and HDMEC cultured in monolayer over a 24 hour period. B : Quick cell counting solution test was performed over a 72 hours period on HDMEC cultured in monolayer confirming neurotrophic factors did not modulate proliferation. C : Neurotrophic factors did not change the proportion of HUVEC in the 3D angiogenesis model as measured by flow cytometry after enzymatic digestion of the tissue and staining of the endothelial cells with antibodies against von Willebrand Factor.

3 L'innervation cutanée sensorielle accélère la réépithélialisation par libération de substance P dans un modèle de peau reconstruit par génie tissulaire

Avant-propos

Ce chapitre fait l'objet d'un article intitulé : *Sensory neurons accelerate reepithelialization via Substance P in a new innervated and endothelialized tissue-engineered model of reconstructed wounded skin*, qui sera prochainement soumis en vue d'être publié.

J'ai réalisé la conception ainsi que 85 % des expériences de ce travail. J'ai également effectué la rédaction du manuscrit sous la direction du Dr François Berthod.

3.1 Résumé

Les kératinocytes sont responsables de la réépithélialisation et la restauration de la barrière épidermique lors de la réépithélialisation des plaies. L'influence des neurones sensoriels sur ce mécanisme n'est pas entièrement comprise. Nous avons testé si les neurones sensoriels peuvent influencer la fermeture des plaies par la sécrétion du neuropeptide substance P (SP) en utilisant un nouveau modèle de réépithélialisation reconstruit par génie tissulaire. Il consiste en une construction épidermique perforée, reconstituée avec des kératinocytes humains exprimant la GFP. Cette construction repose sur une construction dermique innervée ou non par des neurones sensoriels. Nous avons montré que les neurones sensoriels y sécrétaient de la SP et induisaient une fermeture plus rapide des plaies *in vitro*. Cet effet a été partiellement reproduit par l'addition de SP dans le modèle sans neurones, et complètement bloqué par un traitement avec un inhibiteur du récepteur NK1 pour la SP, qui est exprimé par les kératinocytes. Cependant, cet inhibiteur ne modifiait pas la fermeture de la plaie par rapport au contrôle. Des résultats similaires ont été obtenus lorsque le modèle avec ou sans neurones a été transplanté sur des souris CD1, mais la fermeture des plaies était plus rapide pour toutes les conditions. Nous concluons que les neurones sensoriels jouent un rôle important, mais non essentiel sur la réépithélialisation des plaies, même en l'absence du système immunitaire. Ce modèle est prometteur pour étudier l'influence du système nerveux sur la réépithélialisation dans des conditions normales et pathologiques.

3.2 Sensory neurons accelerate reepithelialization via Substance P in a new innervated and endothelialized tissue-engineered model of reconstructed wounded skin.

Mathieu Blais, Lorène Mottier, Sébastien Cadau, Marie-Anne Germain, Sabrina Bellenfant, François Berthod

Centre CMDGT/LOEX de l'Université Laval, Centre de recherche FRSQ du Centre hospitalier universitaire de Québec, and Département de Chirurgie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada

Keywords : nerve regeneration, skin, burns, Schwann cells, hair shafts, stem cells

Abstract

Keratinocytes are responsible for reepithelialization and restoration of the epidermal barrier during wound healing. The influence of sensory neurons on this mechanism is not fully understood. We tested whether sensory neurons influence wound closure via the secretion of the neuropeptide substance P (SP) with a new tissue-engineered wound healing model made of an upper perforated epidermal compartment reconstructed with human keratinocytes expressing GFP, stacked over a dermal compartment, innervated or not with sensory neurons. We showed that sensory neurons secreted SP in the construct and induced a 3 times faster wound closure *in vitro*. This effect was partially reproduced by addition of SP in the model without neurons, and completely blocked by a treatment with a specific inhibitor of the SP receptor NK1 expressed by keratinocytes. However, this inhibitor did not alter wound closure compared to the control. Similar results were obtained when the model with or without neurons was transplanted on CD1 mice, while wound closure occurred faster. We conclude that sensory neurons play an important, but not essential role in wound healing, even in absence of the immune system. This model is promising to study the influence of the nervous system on reepithelialization in normal and pathological conditions.

Introduction

The absence of cutaneous sensory innervation affects negatively all stages of wound healing [1]. The mediator of the positive influence of nerves on reepithelialization is unclear, but skin injuries are known to induce a neuronal release of neuropeptides such as substance P (SP) in the skin [2]. Substance P induces neurogenic inflammation by regulating blood flow and it modulates local immune function upon binding to its neurokinin-1 (NK1) cell receptor [3]. Thus, nerve fibers may enhance reepithelialization through the stimulation of inflammation, which is known to play a key role in wound healing [4, 5]. But they may also play a direct effect on keratinocytes since these cells express the NK1 receptor. Upon binding to SP, NK1 activates autocrine production of SP in keratinocytes and cell proliferation in mouse skin organ culture [6, 7]. Still, it's unclear whether direct paracrine neuronal to keratinocyte interactions contribute to reepithelialization independently of inflammatory cells in vivo [8]. However, Hsieh and al. demonstrated that in absence of skin injury, denervation alone in rat hind paw skin is sufficient to reduce keratinocytes proliferation and induce an epidermal thinning within 4 days [9].

It is difficult to discriminate between the role played by neuropeptides on inflammation versus a direct effect on keratinocytes while investigating their effect on wound healing in animal models. In addition, murine skin wound closure is mostly achieved by contraction of the wound margins, while human skin heals through reepithelialization. Our aim was to define precisely, using human keratinocytes, whether sensory neurons can directly promote reepithelialization independently of the immune system and if such modulation was mediated by the release of SP.

Tissue engineered reconstructed human skin offer the opportunity to study reepithelialization in absence of immune cells and we have previously established protocols to innervate these constructs [10-14]. In the present study, we developed a new innervated wound healing model. The model was innervated or not with sensory neurons and the keratinocytes were transduced to express the green fluorescent protein (GFP) to follow-up

accurately in real time the wound closure and answer long-standing questions concerning reepithelialization.

Material and methods

Cell isolation and amplification

Fibroblasts and keratinocytes were isolated and cultured from human skin biopsies after surgeries as previously described [15, 16]. The study was approved by the CHA research ethical committee DR-002-951. Briefly, human fibroblasts between the third and the sixth passages were grown in DMEc : DMEM (Invitrogen, Burlington, Canada) with 10% fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) and antibiotics: 100 U/ml penicillin G (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada), 25 µg/ml gentamicin (Shering, Pointe-Claire, Canada). Keratinocytes were cultured on a feeder layer of lethally irradiated 3T3 mouse fibroblasts in DHc: a 3/1 ratio of DMEM/Ham's (Invitrogen) supplemented with 5% HyClone FetalClone II (Thermo Fisher Scientific), 5 µg/ml insulin (Sigma-Aldrich Canada), 0.4 µg/ml hydrocortisone (Cedarlane, Burlington, ON, Canada), 10^{-10} M cholera toxin (ICN Biochemicals, Montréal, QC, Canada), 10 ng/ml human epidermal growth factor (Austral Biologicals, San Ramon, CA, USA), and antibiotics. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) were obtained as previously described [17] and were grown on collagen coated surface in EGM-2 : EGM-2MV bullet kit (Lonza). Sensory neurons were extracted from the dorsal root ganglia of mouse embryos (E13) and cultured as previously described [10].

Production of GFP lentiviral expression vector and transduction of keratinocytes

To produce lentivirus, 293FT cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as per manufacturer's instruction with 12 µg of an equimolar mixture of P1p1, P1p2, pVSVg packaging plasmids (gracious gift from Dr. Sylvain Guérin) and plenti6.3/V5/Gw/EmGFP expression vector (Invitrogen). Three days post-transfection, lentivirus-containing supernatant was collected and cleared through a 0.45 µM filter, titrated using human fibroblasts. The multiplicity of infection (MOI) was determined by flow cytometry with log amplification using a fluorescence-activated cell sorter (FACScan, BD Biosciences, Oakville, CA) for detection of GFP-expressing cells one week after

transduction. For the transduction of human keratinocytes, a primary extraction of newborn foreskin keratinocytes was cultured 3 days as previously described and then the medium was changed for a 2 ml solution per 75 cm² of DHc containing 10 µg/ml Polybrene (Sigma-Aldrich Canada) and 3 MOI of lentivirus. After 6 hour, 18 ml of DHc was added.

Preparation of the collagen/chitosan biopolymer

Thin collagen sponges were developed from a modified version of our previously published method [18]. Briefly, type I and III bovine collagen (Symatase, Chaponost, France) and chitosan (Kemestrie Inc., Sherbrooke, Canada) were dissolved but without chondroitins 4-6 sulphates in 0.1% acetic acid. Then, 1.3 ml/well (9.6 cm²) of the final solution was poured in 6-well plates (BD Biosciences, Mississauga, Canada), frozen at -80°C, and lyophilized in a vacuum lyophilizer (Dura-Stop™ Freeze-Dryer; FTS Systems inc., Stone Ridge, NY).

Preparation of iWHM and WHM

A schematic representation of the preparation of the iWHM is presented in supplemental figure 3-5. For the epidermal construct (sponge A), fibroblasts were seeded on the sponge (2.1 x 10⁵ cells/cm²) and the constructs were cultured in DMEc with 100 µg/ml ascorbic acid for 14 days. Then, keratinocytes were seeded (2.1 x 10⁵ cells/cm²) and the construct was cultured immersed in DHc with 100 µg/ml ascorbic acid for 7 days and then 14 days at the air/liquid interface in the same medium but without EGF.

For the dermal construct (sponge B), a 1:1 ratio suspension of fibroblasts and HUVEC or HDMEC (passage 5) was seeded on side A of the collagen sponge (2.1 x 10⁵ cell type/cm²). The constructs were cultured in a 1:1 ratio of EGM-2 : DMEc plus 75 µg/ml ascorbic acid (Sigma). Then after one week, sponges were flipped and the same procedure was repeated on side B with half the cell number. Constructs were cultured in the same medium for 3 additional days and then they were cultured in A/Lc: a 3:1 ratio of DMEM-Ham's F-12 medium supplemented with 10% FBS, 0.4 µg/ml hydrocortisone, 5 µg/ml bovine insulin, 100 µg/ml ascorbic acid and antibiotics. On day 14, mouse sensory neurons were seeded at 2.1 x 10⁵ cells/cm² on side B of the corresponding condition. The constructs were then

elevated to the air-liquid interface and cultured for 14 days with A/Lc plus 100 µg/ml ascorbic acid and 10 ng/ml NGF (nerve growth factor 2.5S (natural murine; Invitrogen).

For the creation of the wound, the epidermal construct was perforated from side to side with a biopsy punch (Acuderm inc., Fort Lauderdale, FL) of 8 mm of diameter for in vitro experiments or 6 mm of diameter for in vivo experiments. Then, the dermal construct was flipped upside down so the side B that was seeded with neurons was positioned in the bottom. Finally, the perforated epidermal construct was stacked on the upper dermal on side A and both constructs were held together using ligaclips (Ethicon Endo-Surgery). Constructs were subsequently cultured at the air liquid interface in DHc without EGF plus 100 µg/ml ascorbic acid.

Animals and surgical manipulations.

Adult male CD1 mice (44 days old) (Charles River Laboratories, LaSalle, QC, Canada) were used as surgical recipients as previously described [10]. Briefly, the mice were injected with ceftazidime (140 mg per mouse; Glaxo, Toronto, ON, Canada) 24 and 48 hours before surgery. Animals were anesthetized via inhalation of 3% isoflurane with 1.5 l /minute oxygen (lowered to 2% for surgery). A 2.5 cm² full thickness skin area was excised to the muscle, on the back of the mouse. A Fusenig chamber was installed to protect the iWHM after grafting. In order to assess the reepithelialization process, the mice were also anesthetized prior to imaging via inhalation of 2 % isoflurane with 1.5 l /minute oxygen. Mice were killed after the wounding for histological and immunohistochemical analysis of iWHM biopsies. All the manipulations of the animals were performed according to the rules established by the Canadian Council on Animal Care.

Treatment with agonist and antagonist

Agonist, antagonist and concentration used with the iWHM are: 10⁻⁷ M Substance P (Bachem, Torrance, CA) and 2 µM Spantide II (Enzo life Science, Ann Arbor, MI). They were diluted in the culture at every medium change during the wounding for in vitro

experiments or they were diluted in 30 % Pluronic® F - 127 (Anaspec, Fremont, CA) with a topical application of 50 µl on wounds every 2 days for in vivo experiments.

Indirect immunofluorescence

Indirect immunofluorescence assays were performed on paraformaldehyde (4%) fixed cultured cells or frozen tissue sections embedded in O.C.T compound (Sukura, Finetek U.S.A. Inc., Torrance, CA). A further step of permeabilization was performed with PBS containing 0.5 % (v/v) Triton X-100 (Bio-Rad, Hercules, CA). The primary antibodies used were sheep polyclonal anti-human PECAM-1 (R&D Systems); mouse monoclonal IgG anti-human K14 (Sigma), mouse monoclonal IgG1 anti-K10 (Cederlane), rabbit polyclonal anti-mouse Substance P (Immunostar, Hudson, WI), rabbit polyclonal anti-human NK1 (Millipore), Chicken polyclonal IgY anti-NFM (Millipore), rabbit polyclonal anti-TRPV1 (Novus biological, Oakville, Canada). The secondary antibodies used were: donkey anti-sheep IgG Alexa 488®, goat anti-mouse IgG biotin (Jakson), Alexa405-conjugated Streptavidin (Invitrogen), rabbit anti-chicken IgY rhodamine (chemicon). Cell nuclei were counterstained with either Hoechst reagent 33258 (Sigma aldrich) or DRAQ5 (Biostatus Limited, Shephed, UK). As a control, the primary antibody was omitted.

ELISA analysis

Supernatants were harvested, clarified by centrifugation and frozen at -80°C. For treatment with TRPV1 agonist, 0.01 ng/ml capsaicin (Cayman chemical, Ann Arbor, MI) dissolved in 1 mM DMSO or 1mM DMSO for controls were added in the medium for 30 min. The quantification of substance P was performed as described in the manufacturer protocol (Substance P Parameter Assay Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN).

Quantification of reepithelialization

The reepithelialization process was monitored in GFP fluorescence. Macroscopic pictures of the wounds were gathered using IVIS® 200 Imaging System (CaliperLS, Xenogen). Pictures were analysed using Living image 4.2 (CaliperLS), NIH imageJ 1.46 and Microsoft excel 2010. The percentage and rate of reepithelialization was calculated from the ratio and difference between the area of the reepithelialized surface compared to the

initial wound area for each treatment and measurements. Values are expressed as the means \pm SD. Differences were tested by bilateral Student's t-test. The probability level was regarded as significant at $p < 0.05$.

Results

Histological characterisation of the innervated wound healing model (iWHM)

In order to study reepithelialization in presence of sensory neurons but in absence of immune cells, we prepared the iWHM by stacking a perforated epidermal constructs on an endothelialized dermal construct that was innervated or not with mouse sensory neurons (Supplemental Figure 3-5). The histology showed that the keratinocytes formed a thick and well-differentiated epidermis (Figure 3-1 A-B). The fibroblasts colonized both sponges and they also synthesized extracellular matrix (in pale blue). Keratinocytes migrated from the wound margins over the dermal construct (Figure 3-1 A, C, D), forming an epidermal tongue partly differentiated up to the stratum corneum (Figure 3-1 A).

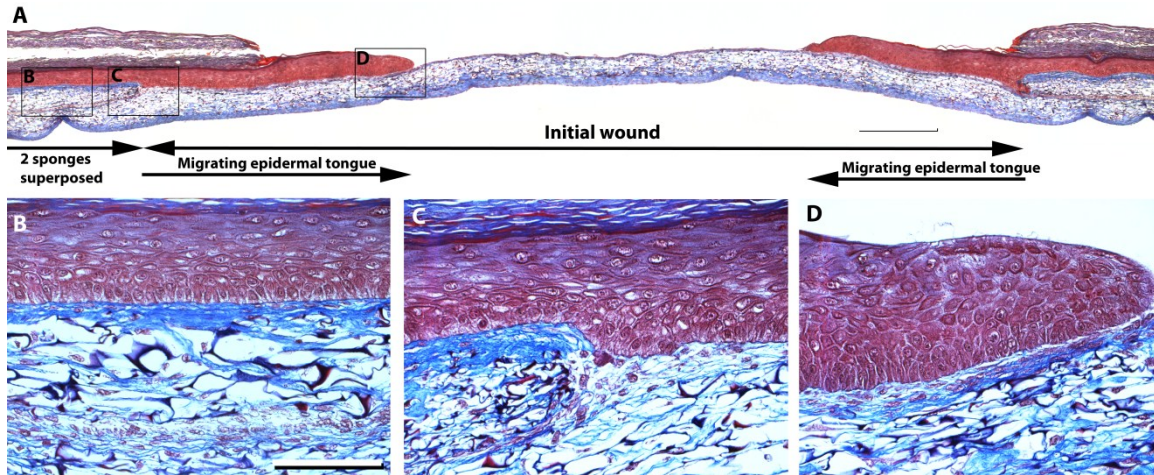


Figure 3-1. Histological aspect of the model.

The histology of the reconstructed skin graft was assessed by observation of 4 μm thick tissue cross sections stained with Masson's Trichrome. The reepithelialization process from side to side of the wound can be observed (A). The boxes in panel A are enlarged from B to D. They show an intact portion of two stacked sponges (B), a reepithelialized area with the keratinocytes from the epidermal upper compartment has migrated over the lower dermal compartment (C) and the front of the epidermal tongue of migration over the dermal construct (D). Scale bar A: 500 μm; B-D: 100 μm.

Characterization of nerve fibers, neuropeptides, capillary-like tubes and epidermis outgrowth in the wound healing model (WHM) and the iWHM

In order to verify that our new iWHM model displays all the components to study reepithelialization in presence of sensory neurons, we characterized it using confocal microscopy. The network of nerve fibers, stained with the 150 kDa neurofilament (NFM), was observed in the entire dermal construct in the iWHM in close proximity to the migrating epidermis (Figure 3-2 C-D). A staining for PECAM-1 (CD31), a cell-adhesion molecule expressed only by endothelial cells, was also performed in the iWHM and the WHM to show the network of capillaries (Figure 3-2 A-D) and the epidermis was stained for the intermediate filaments cytokeratin K14 (Figure 3-2 A-D). Keratinocytes behind the leading front edge of the migration tongue were more differentiated, expressing the differentiation marker K10 (Figure 3-2 E).

We validated the expression by nerves of substance P (SP), and by keratinocytes of the NK1 receptor in the iWHM by immunohistochemistry. The NK1 cell receptor for SP was expressed in the epidermis including in the epidermal migration tongue (Figure 3-2 E) and by fibroblasts both in the iWHM and when cultured in monolayer (Figure 3-2 E-F). SP was expressed in the neuronal cell body and nerve fibers of the sensory neurons in the iWHM (Figure 3-2 G-I).

In order to confirm the functionality of sensory neurons in the iWHM, we validated their potential to release SP after stimulation of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) with the agonist capsaicin. The activation of TRPV1 is known to induce nerve fibers to release neuropeptides through degranulation of the large dense-core vesicles [19]. The presence of SP was detected by ELISA analysis of the culture supernatant from dermal constructs with and without sensory neurons after 7 days of innervation. In absence of neurons, a low amount of SP secretion was observed, which could be expressed by fibroblasts since they were shown to produce SP [20]. However, there was 5 times more SP released in presence of neurons (Figure 3-2 M). Sensory neurons in the iWHM expressed TRPV1 (Figure 3-2 J-L). When the TRPV1 agonist capsaicin was added for 30 min in the medium, a 4 times increase of the amount of SP secretion was detected in presence of

neurons, while the concentration of SP remained unchanged without neurons (Figure 3-2 M).

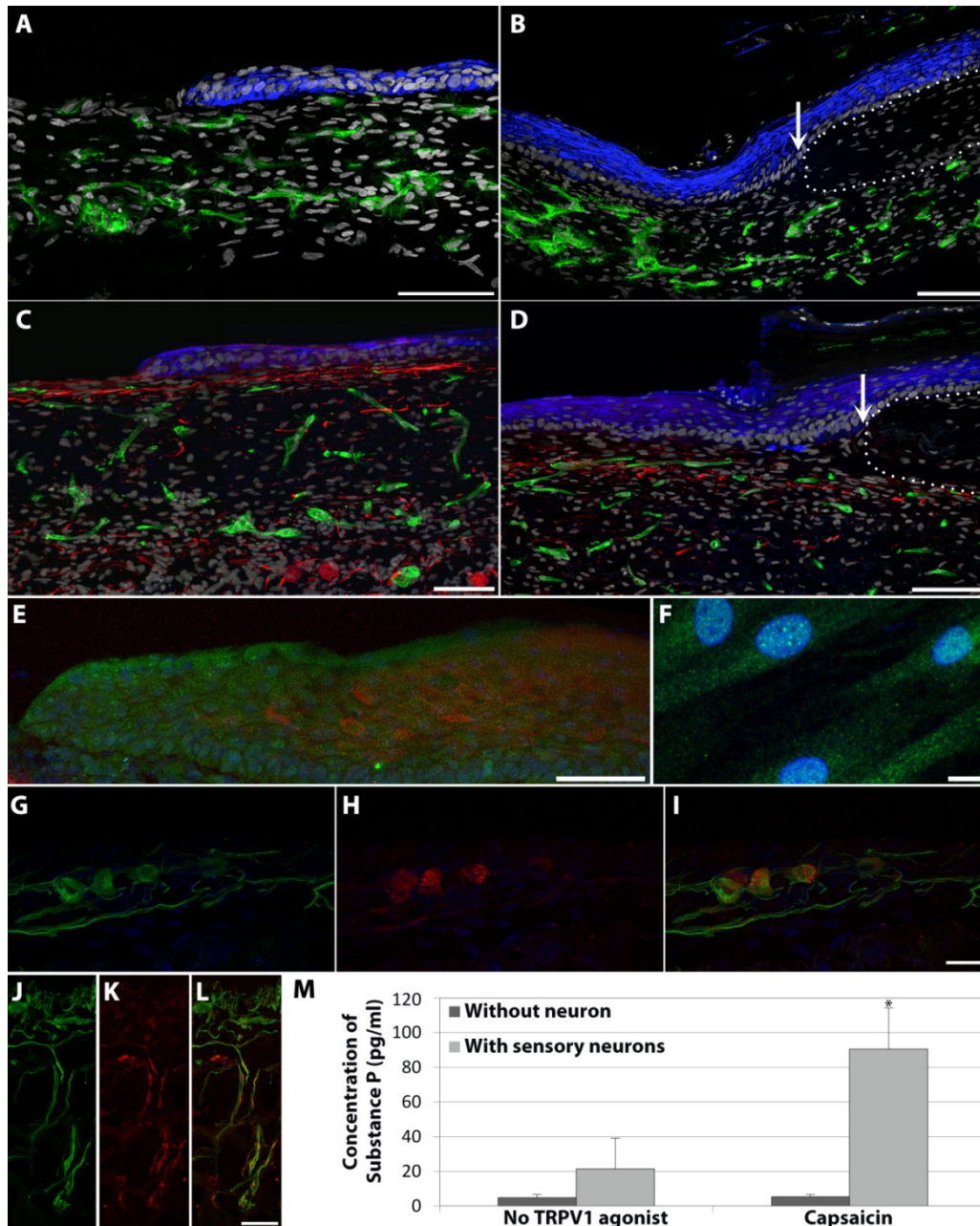


Figure 3-2. Neurite and capillary-like-tube outgrowth in the iWHM and WHM.

The epidermis (A-D; keratin 14 in blue), the networks of capillary-like tubes (A-D; PECAM-1 in green) and the nerve fibers in the condition with sensory neurons (C-D; NFM in red) were stained on 20 μm thick frozen cross sections of the samples by indirect immunofluorescence using a confocal microscope to show areas of the epidermal tongue of migration (A and C) and of the wound margin (B and D; arrows). The edge of the perforated epidermal sponge is delineated by a white dotted line and the locations of the cut are shown with arrows (B and D). Keratinocytes in the tongue of migration express the cell receptor for SP (E; NK1 in green) and the keratinocytes that follow in the upper layer express a marker of differentiation (E; K10 in red). Fibroblasts in the tridimensional model

(E; NK1 in green) as well as fibroblasts cultured in a 2 D fashion (F; NK1 in green) were also stained by the NK1 antibody. Nerve fibers in the model (G and I; NFM in green) express substance P (H and I; in red). Most nerve fibers in the model (J and L; NFM in green) express TRPV1 (K and L; in red). WHM and iWHM were stimulated or not with a TRPV1 agonist to induce the release of SP and it was quantified by ELISA in the supernatant (M). The graph is a representation of the mean results \pm SD obtained for each condition (* $p \leq 0.002$; $n=3$). Scale bar A-D: 100 μm ; E: 50 μm ; F: 10 μm ; G-I: 20 μm J-L: 20 μm .

Influence of sensory neurons, SP and the NK1 antagonist Spantide II on wound closure in vitro

In order to accurately assess the reepithelialization process, we transduced human keratinocytes with GFP and analyzed wound closure using the IVIS Lumina imaging system. The transduction efficiency of the keratinocytes was 35% (Data not shown), and was sufficient to perform an accurate follow up of the wound closure (Figure 3-3 A).

The percentage of wound closure was analysed by assessing the percentage of wounded area over time (Figure 3-3 B). The total radiant efficiency in the initial wound area, which is proportional to the number of GFP-positive keratinocytes, was also analysed over time (Supplemental Figure 3-6 A). Three days after wounding, the percentage of wound closure was 2.2 times higher and the radiant efficiency was 1.6 times higher in presence of sensory neurons (iWHM versus WHM). Based on the percentage of wound closure, the speed of reepithelialization from day 0 to day 3 was 3 time higher with neurons, and complete wound closure was reached after 4 days in the iWHM, versus 9 days in the WHM (Supplemental Figure 3-6 B).

To assay whether SP can promote reepithelialization independently of the immune systems, it was added in the culture medium every two days during the reepithelialization process. Three days after wounding, the percentage of wound closure was 1.5 times higher and the radiant efficiency was 2.1 times higher with SP in the WHM. To determine whether the enhanced reepithelialization induced by neurons in the iWHM was due to SP, we added Spantide II, an antagonist for the NK1 receptor of SP [21]. In presence of Spantide II, neurons failed to enhance wound closure, and there was no significant difference between the WHM and the iWHM, but Spantide II did not significantly inhibit reepithelialization in the WHM (Figure 3-3 B).

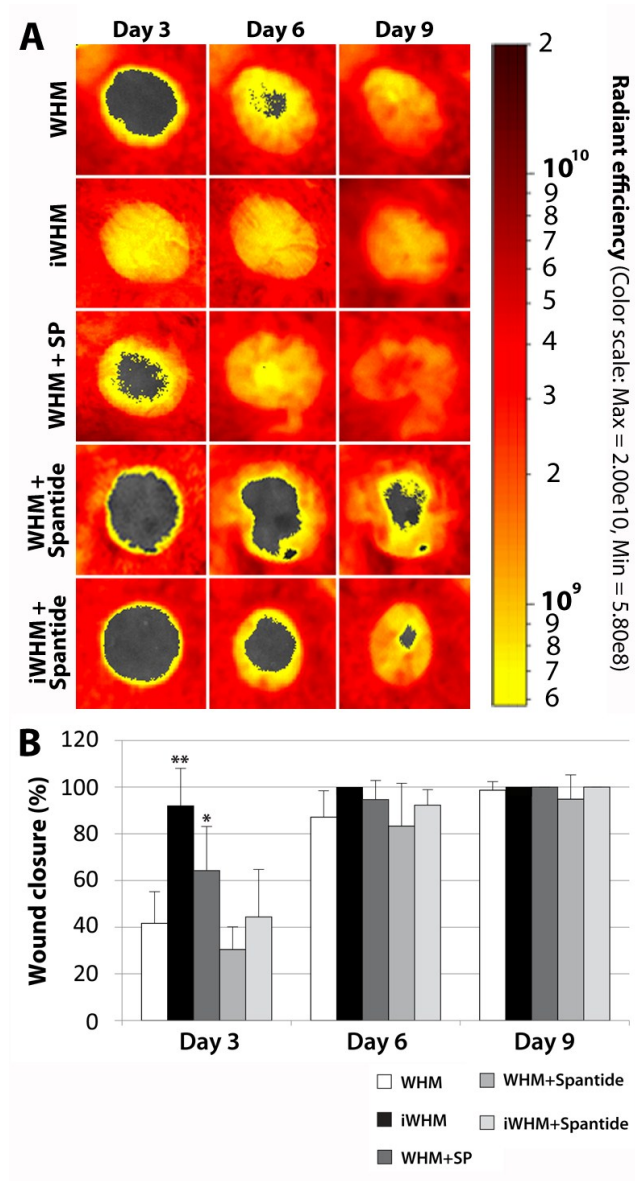


Figure 3-3. Influence of sensory neurons, SP and the NK1 antagonist Spantide II on the reepithelialisation process in vitro.

Representative pictures of the keratinocytes-GFP radiant efficiency in the wound area showing the progress in the reepithelialisation process over time within the different conditions (A). The wound areas appear in gray color. The GFP radiant efficiency is depicted as dark red for highest values of illumination to yellow for lower values. The percentage of wound closure for the different condition over time has been quantified (B). The graph is a representation of the mean results \pm SD obtained for each condition (* $P \leq 0.0002$; ** $P \leq 0.05$; $n=4$).

Influence of sensory neurons, SP and NK1 antagonist Spantide II on reepithelialization in vivo

In order to assess whether the presence of sensory nerve fibers influences reepithelialization in vivo, iWHM or WHM were grafted on the back of immunocompetent CD1 mice as previously described [10]. The transplantation of iWHM and WHM on mice enabled the analysis of the human keratinocyte reepithelialization in presence of the immune system, but with or without innervation, since we previously showed it takes more than 30 days for our reconstructed skin to be reinnervated from the wound bed in mice [11, 14, 22]. The presence of nerve fibers significantly improved the percentage of reepithelialization by 1.5 times and the radiant efficiency in the initial wound area by 1.8 times after 34 hours (Figure 3-4 A-B and supplemental figure 3-7). All the wounds were closed at day 2. Spantide II completely abrogated the enhancing effect on wound closure mediated by neurons of the iWHM, but did not alter reepithelialization in the WHM. In contrast, the addition of SP in the WHM increased the percentage of reepithelialization by 1.4 times and the radiant efficiency in the initial wound area by 1.8 times (Figure 3-4 B).

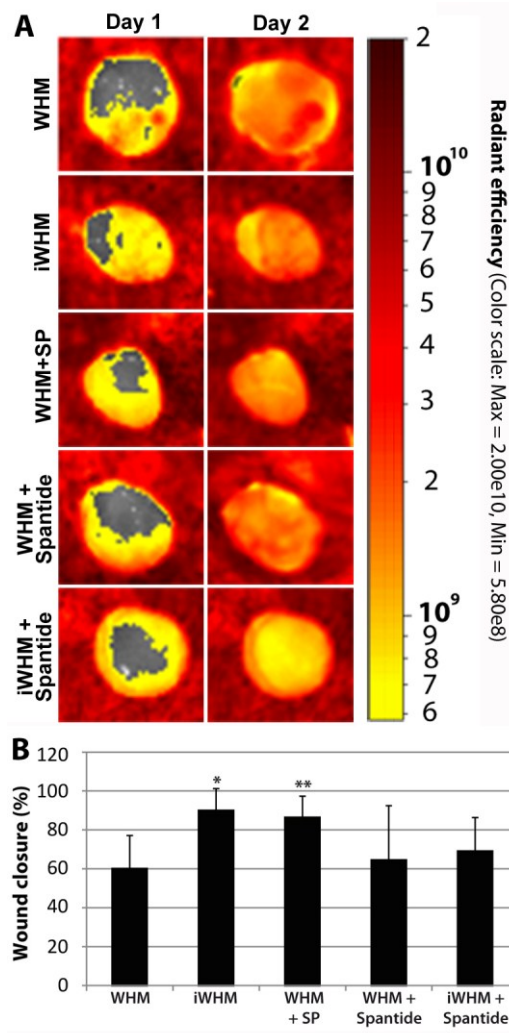


Figure 3-4. Influence of sensory neurons, SP and NK1 antagonist Spantide II on the reepithelialisation process in vivo.

Representative pictures of the radiant efficiency for keratinocytes-GFP radiant efficiency in the wound area showing the progress in the reepithelialisation process over time within the different conditions (A). The wound areas appear in gray color. The GFP radiant efficiency is depicted as dark red for highest values of illumination to yellow for lower values. The percentage of wound closure for the different condition over time has been quantified (B). The graph is a representation of the mean results \pm SD obtained for each condition (* $P \leq 0.00001$, $n = 8$; ** $P \leq 0.0001$, $n = 4$).

Discussion

Sensory nerves play a major role in the wound healing process. However, their influence has mostly been described for the recruitment of immune cells through the induction of neurogenic inflammation. Only few studies were performed on the direct modulation of nerves on reepithelialization, and were limited by the challenge of removing both nerve fibers and immune cells from the wound area. In addition, existing data rely mostly on mouse and rat models that heal their wounds primarily by contraction, as opposed to human skin that heals mostly through reepithelialization (keratinocytes migration).

In order to investigate the human keratinocyte reepithelialization process *in vitro* and *in vivo* in carefully monitored conditions, we developed a tissue-engineered human reconstructed skin model made of two compartments. The lower compartment features the dermis that combines a capillary network with or without a nerve network. The capillary network will be essential to promote a rapid connection of the graft to the host blood circulation after transplantation on mice, and subsequently, recruitment of inflammatory cells [23]. The upper compartment features a thin dermis over which an epidermis is reconstructed. The rationale of preparing two compartments is to enable wounding using a punch biopsy only on the upper part that contains the epidermis, but not on the lower part that will serve as a wound bed on which keratinocytes will migrate.

This model is highly customizable to prepare a WHM or an iWHM. The expression of GFP in the epidermis allowed for a non-invasive and very accurate imaging of the wound closure in real time. The major question to be addressed concerned the ability of sensory neurons to promote reepithelialization independently of their neuroinflammatory effect and to identify a potential nerve-derived mediator.

Using our unique iWHM model, we showed that sensory neurons induced *in vitro* the complete reepithelialization of the innervated wound after only 4 days instead of 9 days with the WHM. This effect was confirmed *in vivo* after graft of the iWHM on CD1 mice. The main advantage of transplanting the iWHM and the WHM on immunocompetent mice is to assess the effect of inflammation in presence or absence of innervation while using human keratinocytes to analyze wound healing. Indeed, we previously showed that nerve

regeneration from the mouse wound bed necessitates at least one month to occur, which preclude any innervation of the WHM in the first 48h after graft [11, 14, 22]. Reepithelialization was shown to be 1.4 time higher and the radiant efficiency 1.8 time higher in the iWHM compared to the WHM after 34 hours. In addition, wound closure was faster in vivo than in vitro. Although the immune system may greatly contribute to the whole wound healing process and that neurogenic inflammation promote its recruitment, our results show that sensory neurons directly influence reepithelialization, regardless the presence of immune cells.

The second step was to investigate how the sensory innervation promotes reepithelialization. Since the main paracrine secretion from sensory neurons correspond to neuropeptides released from large dense-core vesicles, and because SP was already known to promote keratinocyte proliferation [7], this molecule was the most likely candidate. We showed SP was secreted by neurons in the iWHM and its NK1 receptor was expressed by keratinocytes. Other groups previously report lower concentration of SP in denervated skin [24-29]. We showed that the addition of SP in the culture media (in vitro) or on the wound (in vivo) in the WHM promoted a faster wound closure. When a specific antagonist of the SP receptor NK1 was added to the iWHM, the increase of the wound closure induced by neurons was completely abolished. However, this inhibitor did not significantly decrease reepithelialization in the WHM. It was reported in organ culture of rabbit cornea that reepithelialization is accelerated by exogenous application of SP with epidermal growth factor [30] and wound healing is slowed by SP depletion in aged rats [31]. We showed for the first time direct evidence that nerve-derived SP can specifically increase the reepithelialization process even in total absence of the immune system.

We suggest that improvement of axonal migration in wounds could promote both healing and tactile perception. We previously aimed to improve the nerve regeneration of our reconstructed skin to improve the tactile perception and prevent the development of chronic pain commonly seen in severe burns [10, 11, 22]. In addition, these results suggest that administration of SP, or inhibitors of the neutral endopeptidase, which is known to degrade

SP in the skin [32], could be a promising therapeutic option to enhance wound healing, especially in denervated wounds such as in diabetic patients. The iWHM should also be a useful model to study in vitro the healing of skin wounds in pathological conditions such as diabetes or aging.

References

1. Barker, A.R., G.D. Rosson, and A.L. Dellon, Wound healing in denervated tissue. *Ann Plast Surg*, 2006. 57(3): p. 339-42.
2. Pernow, B., Substance P. *Pharmacol Rev*, 1983. 35(2): p. 85-141.
3. Brain, S.D., Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology*, 1997. 37(2-3): p. 133-52.
4. Koh, T.J. and L.A. DiPietro, Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*, 2011. 13: p. e23.
5. Oberyzyzn, T.M., Inflammation and wound healing. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 2007. 12: p. 2993-9.
6. Bae, S., et al., Autocrine induction of substance P mRNA and peptide in cultured normal human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 263(2): p. 327-33.
7. Paus, R., et al., Substance P stimulates murine epidermal keratinocyte proliferation and dermal mast cell degranulation in situ. *Arch Dermatol Res*, 1995. 287(5): p. 500-2.
8. Richards, A.M., et al., Cellular changes in denervated tissue during wound healing in a rat model. *Br J Dermatol*, 1999. 140(6): p. 1093-9.
9. Hsieh, S.T. and W.M. Lin, Modulation of keratinocyte proliferation by skin innervation. *J Invest Dermatol*, 1999. 113(4): p. 579-86.
10. Blais, M., M. Grenier, and F. Berthod, Improvement of nerve regeneration in tissue-engineered skin enriched with schwann cells. *J Invest Dermatol*, 2009. 129(12): p. 2895-900.
11. Caissie, R., et al., In vivo enhancement of sensory perception recovery in a tissue-engineered skin enriched with laminin. *Biomaterials*, 2006. 27(15): p. 2988-93.
12. Gingras, M., et al., In vitro study of axonal migration and myelination of motor neurons in a three-dimensional tissue-engineered model. *Glia*, 2008. 56(3): p. 354-64.
13. Gingras, M., et al., In vitro development of a tissue-engineered model of peripheral nerve regeneration to study neurite growth. *Faseb J*, 2003. 17(14): p. 2124-6.
14. Gingras, M., I. Paradis, and F. Berthod, Nerve regeneration in a collagen-chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice. *Biomaterials*, 2003. 24(9): p. 1653-61.
15. Germain, L., et al., Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns*, 1993. 19(2): p. 99-104.

16. Auger, F.A., et al., Skin equivalent produced with human collagen. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1995. 31(6): p. 432-9.
17. Berthod, F., et al., Spontaneous fibroblast-derived pericyte recruitment in a human tissue-engineered angiogenesis model in vitro. *J Cell Physiol*, 2012. 227(5): p. 2130-7.
18. Berthod, F., et al., Optimization of thickness, pore size and mechanical properties of a biomaterial designed for deep burn coverage. *Clin Mater*, 1994. 15(4): p. 259-65.
19. Purkiss, J., et al., Capsaicin-stimulated release of substance P from cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of two distinct mechanisms. *Biochem Pharmacol*, 2000. 59(11): p. 1403-6.
20. Killough, S.A., F.T. Lundy, and C.R. Irwin, Substance P expression by human dental pulp fibroblasts: a potential role in neurogenic inflammation. *J Endod*, 2009. 35(1): p. 73-7.
21. Folkers, K., et al., Spantide II, an effective tachykinin antagonist having high potency and negligible neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(12): p. 4833-5.
22. Gagnon, V., et al., Hair follicles guide nerve migration in vitro and in vivo in tissue-engineered skin. *J Invest Dermatol*, 2011. 131(6): p. 1375-8.
23. Tremblay, P.L., et al., Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am J Transplant*, 2005. 5(5): p. 1002-10.
24. Chiang, H.Y., et al., Skin denervation, neuropathology, and neuropathic pain in a laser-induced focal neuropathy. *Neurobiol Dis*, 2005. 18(1): p. 40-53.
25. Fitzgerald, M., Capsaicin and sensory neurones--a review. *Pain*, 1983. 15(2): p. 109-30.
26. Luo, Y., et al., Morphological analysis of skin in senescence-accelerated mouse P10. *Med Electron Microsc*, 2002. 35(1): p. 31-45.
27. Miller, M.S., et al., Regulation of substance P by nerve growth factor: disruption by capsaicin. *Brain Res*, 1982. 250(1): p. 193-6.
28. Senapati, A., et al., Depletion of neuropeptides during wound healing in rat skin. *Neurosci Lett*, 1986. 71(1): p. 101-5.
29. Smith, P.G. and M. Liu, Impaired cutaneous wound healing after sensory denervation in developing rats: effects on cell proliferation and apoptosis. *Cell Tissue Res*, 2002. 307(3): p. 281-91.
30. Nakamura, M., et al., Synergistic effect of substance P with epidermal growth factor on epithelial migration in rabbit cornea. *Exp Eye Res*, 1997. 65(3): p. 321-9.

31. Khalil, Z. and R. Helme, Sensory peptides as neuromodulators of wound healing in aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 1996. 51(5): p. B354-61.
32. Scholzen, T.E. and T.A. Luger, Neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme -- key enzymes terminating the action of neuroendocrine mediators. *Exp Dermatol*, 2004. 13 Suppl 4: p. 22-6.

Supplemental material

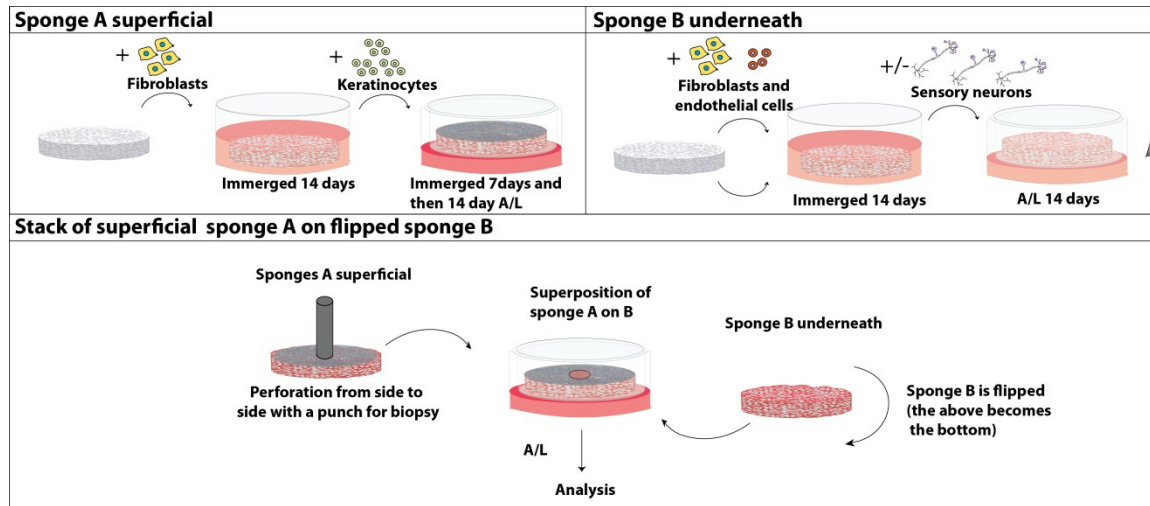


Figure 3-5. Schematic representation of the preparation of the WHM and iWHM.

The WHM and iWHM are prepared from 2 superposed constructs. The epidermal construct was made from the culture of fibroblasts onto collagen-chitosan sponges A and from the subsequent seeding of keratinocytes to form a stratified epidermis. The epidermal construct was perforated from side to side just before to stack it on the dermal construct (sponge B). The construct B can be used as a substrate by the migrating keratinocytes to close the wound. This dermal portion is reconstructed from the co-culture on both side of human fibroblasts and endothelial cells. In the corresponding condition, sensory neurons were seeded. The dermal construct was flipped upside down prior to the stacking in order to have the neuronal cell bodies in the bottom of the iWHM and the epidermis on the top. The stacking was done after a total of 35 days of culture.

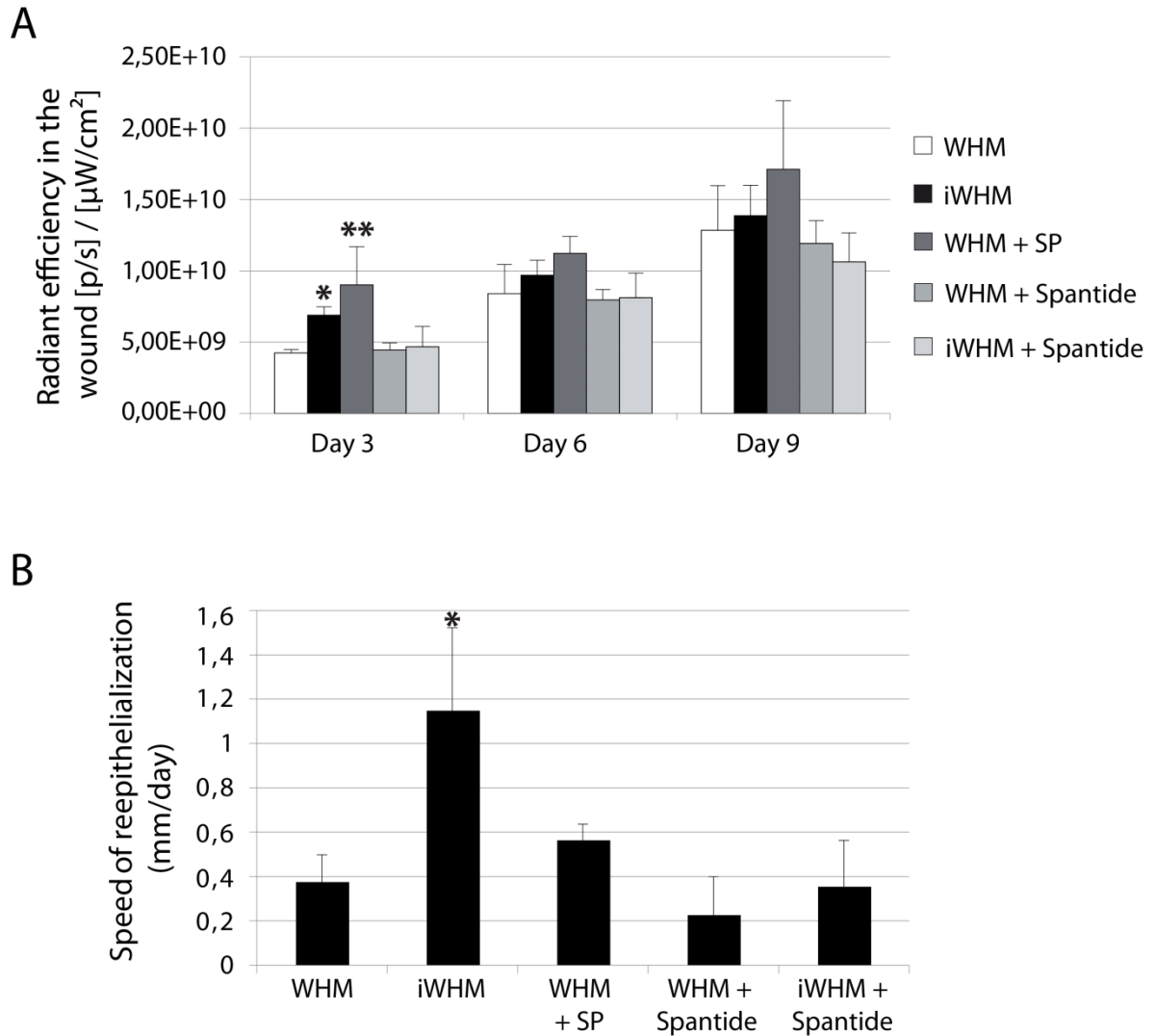


Figure 3-6. Influence of sensory neurons, SP and NK1 antagonist Spantide II on the rate of the reepithelialization process and radiant efficiency in the wound area in vitro. The radiant efficiency in the initial wound area was evaluated over time in vitro for each condition (A). The average speed of reepithelialization was evaluated during the first three days in vitro for the different conditions (B). The graphs are a representation of the mean results \pm SD obtained for each condition. (* $P \leq 0.02$; ** $P \leq 0.000005$, $n = 4$).

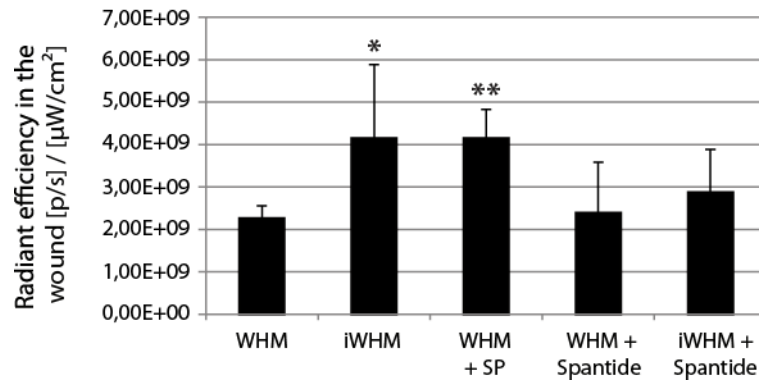


Figure 3-7. Influence of sensory neurons and antagonist of NK1 on the rate and radiant efficiency of the reepithelialization process in vivo.

The radiant efficiency in the initial wound area was evaluated over time in vivo for each condition. The graphs are a representation of the mean results \pm SD obtained for each condition. (* $P \leq 0.000005$, $n = 8$; ** $P \leq 0.0001$, $n = 4$).

4 Discussion générale

4.1 Contextualisation aux communications paracrines cutanées

Les cellules cutanées influencent leur microenvironnement et contribuent à l'homéostasie du tissu par différents moyens, notamment en libérant des signaux instructifs diffusibles. La production de FN, qui attirent à distances les fibres nerveuses, illustre cela. Il y a aussi l'exemple de la vasodilatation des vaisseaux sanguins induite par les neuropeptides libérés par les fibres nerveuses. Nous avons décrit ici d'autres communications paracrines, soit depuis les cellules cutanées vers les cellules endothéliales via les facteurs neurotrophiques ainsi qu'entre les fibres nerveuses sensorielles et l'épiderme via la Substance P (Fig. 4-1). En perspectives et comme cela sera discuté plus loin, d'autres ont démontré ailleurs qu'il y a un lien entre la relâche de Substance P et la sécrétion de certains facteurs neurotrophiques dans la peau. L'altération de ces voies de communication paracrine pourrait perturber profondément l'homéostasie cutanée.

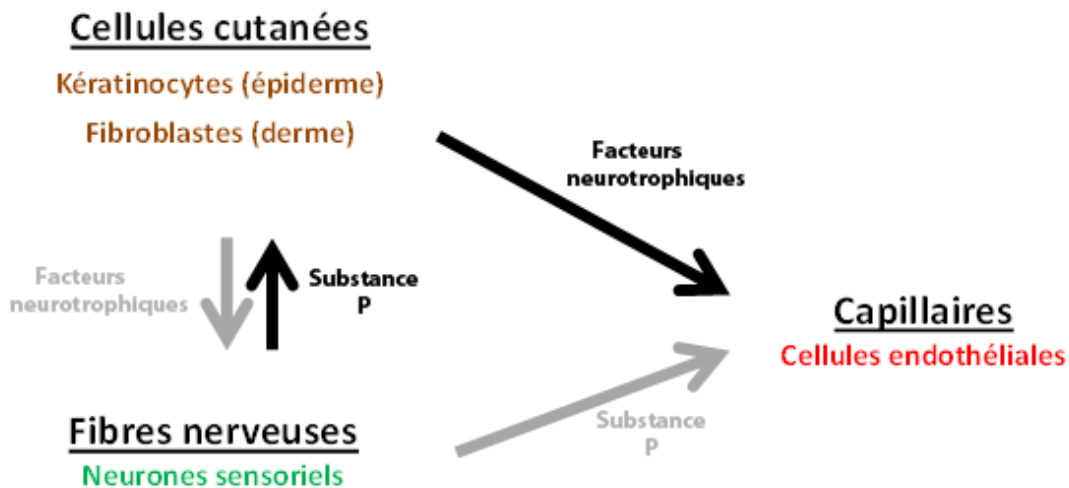


Figure 4-1. Communications paracrines entre les fibres sensorielles, les cellules cutanées et les capillaires.

Les flèches foncées indiquent 2 voies étudiées dans cette thèse et les flèches pâles indiquent d'autres voies rapportées ailleurs.

4.1.1 Les facteurs neurotrophiques NGF, BDNF, NT-3 et GDNF sont produits dans la peau et ils induisent l'angiogenèse in vitro.

Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si les FN influencent le réseau vasculaire. Nous avons préalablement vérifié par immunofluorescence et par analyse ELISA la production de NGF, BDNF, NT-3 et GDNF par les types cellulaires majeurs de la peau. Cela n'avait jamais été fait par ce type d'analyse et de façon à pouvoir comparer au niveau protéique l'expression des différents FN entre eux. De façon générale, les résultats sont cohérents avec les données disponibles ailleurs. Pour le BDNF, une étude récente de Palazzo et coll., qui rapporte que les fibroblastes produisent du BDNF, nous amène à nuancer nos résultats [829]. Nous n'avons pas détecté de BDNF dans le milieu conditionné de fibroblastes et en conséquence nous n'écartons pas la possibilité que les niveaux de BDNF fussent trop bas pour être détectés dans nos surnageants. Une hypothèse est que cette neurotrophine ait été plus sensible à la dégradation dans nos conditions de culture et une première façon d'améliorer la possibilité d'en détecter serait d'ajouter des inhibiteurs de protéases immédiatement après avoir recueilli les surnageants. Alternativement, un inhibiteur de sécrétion comme le brefeldin A [830] pourrait être ajouté au milieu 12 à 24 heures avant de lyser les cellules pour doser le contenu en BDNF.

Les FN que nous avons ajoutés dans le modèle ont eu un effet angiogénique majeur, jusqu'à 80% d'augmentation du nombre de tubules. Étant donné l'hétérogénéité des cellules endothéliales [831], nous avons jugé que l'utilisation d'HUVEC seulement aurait été limitante. Ces cellules endothéliales sont essentiellement d'origine fœtale et leur comportement peut diverger des autres types de cellules endothéliales [832-834]. Tous les FN ont eu un effet angiogénique avec les HUVEC et les HDMEC. Cependant, l'augmentation des tubules pour les HDMEC était de 20% au lieu de 80%. Les HDMEC font moins de tubules que les HUVEC, ce qui pourrait contribuer à expliquer l'augmentation moindre du nombre de tubules et cela justifie par ailleurs l'utilisation d'HUVEC.

L'effet positif des FN sur l'angiogenèse était attendu pour le NGF et le BDNF. D'abord, pour le NGF, on compte déjà plus d'une vingtaine de publications rapportant un tel effet

dans différents modèles d'étude (Tableau 1-3). Nous suggérons que le NGF agit directement sur les cellules endothéliales pour induire cet effet, sans exclure un effet indirect. Nous avons vérifié la spécificité de notre immunofluorescence indirecte sur les CE contre le récepteur TrkA par immunobuvardage. Nous avons ainsi détecté la présence d'au moins un des deux variants longs du récepteur TrkA sur les CE. Les récepteurs TrkA sont formés suite à l'épissage alternatif de 9 exons et ce processus entraîne la formation des variants longs TrkA I et TrkA II [500]. Ils diffèrent de 6 acides aminés dans la portion extracellulaire du récepteur. Ces acides aminés permettent la liaison au NT-3 [500]. Notre anticorps, qui était dirigé contre la portion extracellulaire du récepteur, a détecté une bande à 68 kDa pour les deux types de cellules endothéliales. L'origine de cette bande est incertaine. Le récepteur TrkA a été détecté sur moins de 5 % des fibroblastes en culture bidimensionnelle (non montré) d'après nos observations par immunofluorescence, et n'a pas été détecté par immunobuvardage. L'expression de TrkA par seulement une faible minorité de fibroblastes soutient notre hypothèse d'un effet angiogénique direct du NGF sur les CE, sans pour autant exclure un effet indirect. D'autres ont d'ailleurs rapporté que les fibroblastes peuvent devenir contractiles et plus mobiles par exposition au NGF [829, 835, 836]. Autre possibilité d'un effet indirect : nous n'avons pas vérifié si l'exposition de fibroblastes au NGF induisait la libération de facteurs angiogéniques comme le VEGF, ce qui pourrait contribuer de façon indirecte à l'augmentation du nombre de tubules que nous avons observée. Soutenant notre hypothèse que les FN agissent directement sur les CE, la stimulation de CE par le NGF en culture monocouche a induit la phosphorylation du récepteur TrkA sur les résidus tyrosine 490 (Tyr 490) et tyrosines 674/675 (Tyr 674/675). La phosphorylation de TrkA sur Tyr 490 est requise pour le recrutement de la protéine adaptatrice SHC, qui recrutera d'autres protéines et activera la cascade de phosphorylation intracellulaire Ras-Map kinase. Cette cascade soutient la différenciation et la survie cellulaire [837]. La phosphorylation de TrkA sur les résidus tyrosines 674/675, dans le domaine catalytique du récepteur, reflète quant à elle l'augmentation de son activité kinase [838].

Ensuite, la stimulation de CE en culture monocouche a induit dans nos cultures une phosphorylation de FAK et Hsp27 et une diminution de la phosphorylation de PLC α -1. La phosphorylation de FAK joue un rôle très important dans la migration des cellules endothéliales [839]. FAK est notamment impliqué dans la réorganisation des points focaux d'adhésion. Ces derniers sont composés d'intégrines permettant l'attachement de la cellule à la MEC et ils font simultanément le lien avec le cytosquelette d'actine. La phosphorylation de HSP27 joue un rôle dans la polymérisation de l'actine. Lorsque la protéine HSP27 est sous forme monomérique non phosphorylée, elle est localisée à l'extrémité des filaments d'actine et bloquer l'ajout de monomère d'actine. Le changement de conformation de HSP27 suite à sa phosphorylation entraîne son détachement de l'actine [839]. Par ailleurs, une étude rapporte que la phosphorylation de HSP27 favoriserait l'arrêt du cycle cellulaire [840]. La diminution de la phosphorylation de PLC α -1 était, quant à elle, inattendue. En effet, lorsque le récepteur TrkA est activé par la liaison de son ligand, il s'autophosphoryle sur plusieurs résidus tyrosine, dont le résidu Tyr 785, ce qui engendre le recrutement et la phosphorylation de PLC α -1. Une étude de Lecht et coll. a fait la cinétique de la phosphorylation de PLC α -1 avec une lignée de cellules endothéliales de cerveau suivant une stimulation au NGF. Ils rapportent une phosphorylation progressive de PLC α -1 engendrant un maximum de protéines phosphorylées 10 minutes suivant la stimulation avec le NGF. Ensuite, le niveau de phosphorylation de PLC α -1 descendait sous son niveau de phosphorylation de départ, atteignant jusqu'à 50 % de celui-ci après 30 minutes [841]. Comme le résultat de phosphorylation de PLC α -1 que nous avons obtenu l'a été suivant 15 minutes de stimulation au NGF, il n'est pas impossible que la phosphorylation moindre que nous avons observée cache une phosphorylation accrue à un temps antérieur, comme ce fut le cas pour Lecht et coll.

La sécrétion de BDNF par les cellules endothéliales et l'augmentation du nombre de tubules en présence de BDNF ne fut pas si surprenante non plus. D'abord, les CE sécrètent du BDNF et son expression est modulée par le niveau intracellulaire d'AMP cyclique et par les flux de cisaillement [842]. Ensuite, le groupe du Dre Hempstead rapportait l'expression du récepteur TrkB par les CE et un effet angiogénique dans le tissu cardiaque [560]. Le BDNF modulerait notamment l'angiogenèse via la sécrétion de protéines dégradant la MEC depuis les HUVEC, sans nécessairement influencer la prolifération cellulaire [559]. Dans

notre modèle, le BDNF était le plus puissant des FN testés pour induire la formation de tubules. Son effet était maximal à 0,1 ng/ml, soit 100 fois plus dilué que pour l'effet maximal du NGF. Cette concentration de BDNF a induit une augmentation significative du nombre de tubules de 20 % lorsque les dermes endothélialisés étaient constitués de HDMEC ainsi qu'une augmentation de la profondeur de migration de 68 % pour les HUVEC et de 15 % pour les HDMEC. L'effet moindre pour les HDMEC pourrait être en partie attribuable au fait que ces derniers font moins de tubules que les HUVEC. Sans exclure un effet indirect du BDNF via une modulation d'autres types cellulaires, nos résultats suggèrent que le BDNF peut agir de façon directe. Nous avons détecté le variant TrkB pleine longueur, comprenant le domaine kinase, pour les HUVEC et il était faiblement présent pour les HDMEC. Le variant TrkB-T1 était le plus fortement exprimé pour les CE mais il était aussi présent pour les fibroblastes. Ce variant peut induire de la signalisation intracellulaire par l'intermédiaire de l'inositol-1,4,5-triphosphate et certains ont suggéré que, malgré l'absence du domaine kinase, la dimérisation de TrkB-T1 avec lui-même ou avec TrkB pleine longueur crée un complexe d'activation de signalisation intracellulaire [510, 843]. Une bande qui pourrait possiblement correspondre à TrkB-Tshc était aussi présente pour les CE et était faiblement présente pour les fibroblastes. Nous n'avons pas vérifié que la bande correspondait effectivement à ce variant. Ce dernier est par ailleurs peu décrit dans la littérature, il pourrait possiblement être un inhibiteur du récepteur de pleine longueur en prévenant la phosphorylation de ce dernier [844, 845]. Enfin, soutenant notre hypothèse d'un effet angiogénique direct du BDNF sur les CE, nous avons observé une augmentation de la phosphorylation de Mek $\frac{1}{2}$ suivant la stimulation de CE en monocouche. Ce dernier est une cible dans le sentier d'activation de TrkB [846].

Les différentes concentrations de NT-3 ajoutées ont induit une augmentation des tubules allant jusqu'à 75 % avec 15 ng/ml de NT-3. Cette concentration a induit une augmentation significative de 23 % du nombre de tubules pour les HDMEC. La profondeur de migration a augmenté de façon significative de 60 % pour les HUVEC et de 24 % pour les HDMEC. Nous suggérons que le NT-3 est un facteur angiogénique qui peut agir directement sur les CE. La stimulation de CE avec 15 ng/ml de NT-3 a notamment induit la phosphorylation de

plusieurs effecteurs intracellulaires, démontrant un effet direct : FAK; Lck et Fgr, qui sont 2 membres de la famille Src requis pour le processus d'angiogenèse; p27, qui favoriserait la migration; p70-S6, dont la phosphorylation serait augmentée chez les HUVEC en prolifération [847-849]. Il fut rapporté ailleurs que les mutants murins NT-3 (-/-) souffrent de malformations cardiaques, de poumons hémorragiques, de même qu'une diminution de l'épaisseur de la couche de cellules musculaires lisses vasculaires des veines pulmonaires une fois sur deux [850]. Le NT-3 pourrait produire cet effet dans le système vasculaire en interagissant avec un autre récepteur que son récepteur classique TrkC [578]. Cristofaro et coll. ont récemment démontré l'effet angiogénique du NT-3 pour les cellules endothéliales du muscle cardiaque, un tissu où les CE expriment TrkC, contrairement aux HDMEC et aux HUVEC. Ils ont transfecté TrkC sur des CE d'autres tissus pour tester si cela favoriserait l'angiogenèse. Nous suggérons que l'effet du NT-3 dans notre modèle ne dépend pas de TrkC, dont nous n'avons pas détecté l'expression, mais plutôt de TrkA et TrkB. Il fut montré auparavant que TrkA pouvait lier NT-3, de même que TrkB [500, 851].

L'ajout de GDNF a entraîné une augmentation significative de 80 % du nombre de tubules pour les HUVEC et de 15 % par les HDMEC pour la concentration de 50 ng/ml. Une augmentation significative de la profondeur maximale de migration de 58 % pour les HUVEC et de 26 % pour les HDMEC a été constatée grâce aux analyses en immunofluorescences de PECAM. Ces résultats sont intéressants, car aucune étude documentant un tel effet n'existe pour les HUVEC et les HDMEC. Cela fut rapporté comme un effet indirect dans un modèle de cultures de reins en explants [852]. Il fut alors suggéré que cet effet angiogénique était indirect. Mais, l'expression de GFR α -1 sur des cellules endothéliales de cerveau de porc et de rats de même que sur les cellules endothéliales de la barrière sang-testicule chez le rat fut démontrée ailleurs [593-595, 853]. Et plus récemment, la présence de l'ARNm de Grf α -1 fut observée pour des HDMEC [854]. D'après les résultats que nous avons obtenus dans notre modèle, le GDNF peut moduler la formation de tubules par des HUVEC et des HDMEC. Il reste maintenant à mieux caractériser les mécanismes moléculaires qu'emprunte le GDNF sur les cellules endothéliales. Nous avons pour notre part observé une augmentation de la phosphorylation de STAT1 suivant l'exposition au GDNF de HDMEC. Une phosphorylation de ce résidu fut rapportée ailleurs, pour des CE en prolifération [855]. Puisqu'il fut montré ailleurs que

GFR α -1 pouvait engendrer une réponse cellulaire en absence de c-ret [856], il serait intéressant de vérifier si l'activation des cellules endothéliales par le GDNF est ou n'est pas dépendante de c-ret.

4.1.2 Les fibres sensorielles influencent la réépithélialisation par leur production de Substance P

L'influence positive des fibres sensorielles sur le processus de réépithélialisation que nous avons constaté dans notre nouveau modèle n'est pas si étonnante. Les nerfs sensoriels ont un rôle majeur dans le processus de guérison des plaies [600]. Or, leur influence a souvent été décrite pour le recrutement du système immunitaire via l'inflammation neurogène, et non pas pour une modulation directe de la réépithélialisation. Il n'y a pas de démonstration directe de l'influence de fibres sensorielles spécifiquement sur la réépithélialisation, par opposition à leur influence sur la guérison des plaies dans son ensemble ou sur d'autres processus pouvant influencer indirectement la réépithélialisation. Ainsi, la principale question à laquelle nous tentions de répondre concernait la capacité des neurones sensoriels à promouvoir la réépithélialisation en l'absence de cellules immunitaires et l'identification d'un médiateur dérivé des fibres nerveuses.

Nous avons montré que les neurones sensoriels induisent *in vitro* la réépithélialisation complète de plaies innervées après seulement 4 jours en moyenne alors qu'il fallait attendre jusqu'à 9 jours sans neurone. *In vivo*, la réépithélialisation a aussi été plus rapide avec les neurones, mais dans une moindre mesure. Cette différence plus faible peut être due à plusieurs éléments. Cette différence moindre mais tout de même significative, pourrait s'expliquer d'une part par le fait que toutes les plaies *in vivo* étaient fermées le deuxième jour. En effet, la vitesse de fermeture était plus rapide, nous laissant une fenêtre d'observation plus étroite. Deuxièmement, les plaies avaient été faites plus petites – 6 mm de diamètre *in vivo* plutôt que 8 mm *in vitro* – ce qui explique au moins en partie que la réépithélialisation ait été plus rapide *in vivo*. Troisièmement, il est possible qu'en plus du système immunitaire, d'autres éléments pouvant influencer la réépithélialisation soient absents *in vitro*. Enfin, la SP a été ajoutée directement sur les plaies, dans un gel 30 %

d'acide pluronique pour le maintenir en place. Il fut montré ailleurs que l'ajout d'un gel d'acide pluronique seul est suffisant pour accélérer la réépithélialisation [857].

Bien que la réépithélialisation ait été très rapide *in vivo*, au point de contrôle de 34 heures, la réépithélialisation était de 1,4 fois plus élevée et l'efficacité de radiance 1,8 fois plus élevée avec neurones. Il est plausible que le système immunitaire ait contribué à la réépithélialisation via l'inflammation neurogène, mais nos résultats sont cohérents avec l'idée que les neurones sensoriels influencent directement la réépithélialisation, indépendamment de la présence de cellules immunitaires. Une expérience complémentaire pourrait cependant être réalisée. La réépithélialisation pourrait être quantifiée sur notre modèle avec et sans neurones greffés sur des souris *cd1* immunodéprimées par ajout d'un immunosuppresseur pharmacologique pour vérifier qu'une inhibition immunitaire partielle ne diminue pas la vitesse de réépithélialisation en présence de neurones.

Ensuite nous avons recherché un intermédiaire dérivé des fibres sensorielles qui favorise la réépithélialisation. Les études précédentes nous incitaient à suivre la piste de la SP, et nous avons d'ailleurs montré que la SP est sécrétée par les neurones dans notre modèle. Nous avons aussi détecté son récepteur NK1 sur les kératinocytes. D'autres ont rapporté ailleurs une faible concentration de SP dans la peau si elle est dénervée [614-619]. Lorsque, plutôt que d'ajouter des neurones sensoriels, nous ajoutions de la SP dans les milieux de culture ou sur les plaies, la réépithélialisation était tout de même plus rapide que le contrôle. Lorsqu'un antagoniste spécifique des récepteurs NK1, le spantide II, fut ajouté, la réépithélialisation revenait au même niveau que le contrôle malgré la présence de neurones. Il fut rapporté ailleurs qu'en culture *ex vivo* de cornée de lapin, la réépithélialisation était accélérée par l'application exogène de SP plus EGF [827 28] et que la réépithélialisation suivant une plaie thermique était ralentie par l'épuisement de la SP chez les rats âgés [828 27]. Nous avons montré que la SP dérivée des nerfs augmente spécifiquement le processus de réépithélialisation, grâce à l'expression de GFP par les kératinocytes, même en l'absence totale de système immunitaire, et cela est un concept qui n'a jamais été directement démontré.

4.2 Implications et perspectives

4.2.1 Modèles issus du génie tissulaire comme modèle d'étude

Les modèles issus du génie tissulaire de derme endothélialisé et de réépithélialisation ont pu être utilisés à titre de modèle d'étude dans cette thèse. D'abord, plusieurs types de modèles d'essai pour l'étude de l'angiogenèse étaient disponibles. Les modèles de coculture in vitro en trois dimensions offraient plusieurs avantages face aux modèles in vivo : plus simples et versatiles, ils sont tout de même relativement physiologiques en permettant le développement de tubules endothéliales dans un environnement tridimensionnel. De plus, leur grande force est de permettre d'inclure uniquement les types cellulaires désirés. Pour l'étude de l'angiogenèse, l'approche du génie tissulaire a été validée dans le passé avec le modèle que j'ai utilisé: il fut ainsi montré précédemment à mes résultats que les modèles de derme endothérialisés permettent d'étudier le processus d'angiogenèse [753, 755]. Mes résultats valident eux aussi ce modèle, car il était attendu que le NGF favoriserait l'angiogenèse et cela fut effectivement le cas. Les modèles issus du génie tissulaire constituent ainsi d'excellents modèles d'étude. Les perspectives sont intéressantes pour d'autres études avec ce modèle, par exemple par ajout d'un troisième type cellulaire.

Ensuite, nous avons mis au point le premier modèle in vitro de peau reconstruite innervée et endothérialisée qui permet d'étudier en trois dimensions l'influence du système nerveux sensoriel sur la réépithélialisation. Nous avons résolu le problème du manque de contraste entre le derme et l'épiderme, qui rendait souvent impossible la visualisation du front de migration des kératinocytes dans le modèle, en utilisant des kératinocytes exprimant la GFP. Cela présentait un double avantage. D'une part, nous pouvions être sûrs de bien visualiser le front de migration des kératinocytes plutôt qu'un repli ou un artefact dans le tissu. En effet avant cette méthode, nous perdions souvent près de la moitié des échantillons dû au manque de certitude sur la valeur des résultats de la quantification. L'autre avantage est qu'il est possible de valider les résultats d'analyse de pourcentage de fermeture par l'analyse de l'efficacité de radiance dans la plaie. Celle-ci doit être en effet plus élevée dans

la zone de la plaie lorsque cette dernière est plus réépithélialisée. Notre modèle a ainsi permis d'évaluer précisément l'effet direct des fibres nerveuses sensorielles sur la migration des kératinocytes. Il est probable qu'il permettra dans le futur d'autres études.

Un avantage de ce nouveau modèle est qu'il permet de moduler à volonté la quantité de fibres nerveuses présentes dans le tissu, contrairement aux modèles *in vivo*. Il a en effet été montré que même après une section du nerf sciatique, l'innervation cutanée chez le rat n'était réduite que de 70%, et les 30% de fibres restantes suffisaient à influencer la réépithélialisation de l'épiderme [858]. La difficulté de notre étude était d'enlever à la fois les fibres nerveuses et les cellules immunitaires de la plaie. La peau reconstruite était donc une approche idéale, car un réseau nerf sensitif peut être ajouté ou non dans l'absence totale de système immunitaire. Notre modèle nous assure une totale absence de fibres nerveuses, et nous pourrions ainsi tester différentes proportions de cellules nerveuses dans le modèle pour évaluer le nombre minimal de fibres nerveuses nécessaires pour influencer la réépithélialisation. Ce modèle pourra également être utilisé pour modéliser d'autres contextes, comme le vieillissement ou le psoriasis, tel que cela sera discuté.

4.2.2 Lien entre les neuropeptides et les facteurs neurotrophiques

Plusieurs indices soutiennent l'hypothèse d'une boucle de rétroaction positive entre l'expression des facteurs neurotrophiques et celle des neuropeptides dans la peau. D'une part, lorsque le NGF est produit en plus grande quantité dans la peau, il favorise une plus grande innervation [859] et il induit aussi une augmentation de la sécrétion de SP [860, 861]. D'autre part, la SP accroît la sécrétion de NGF par les kératinocytes [862-864] et le NGF stimule la prolifération des kératinocytes [533, 865, 866]. Toute autre source de facteurs neurotrophiques dans la peau, par exemple les fibroblastes (NGF, NT-3) et les cellules endothéliales (BDNF) pourrait possiblement contribuer à de l'activation cette boucle.

Ainsi, il apparaît plausible que les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les neurones puissent collaborer de façon paracrine via les neuropeptides et les facteurs neurotrophiques pour initier un processus de remodelage, de régénération ou de réparation tissulaire. Sur la base de cette hypothèse, un certain nombre de questions peuvent ensuite

être soulevées : quel serait l'effet d'une activation anormale d'une boucle de rétroaction positive neurotrophine-neuropeptides; quels sont les mécanismes permettant de rétablir l'équilibre lorsqu'il y a plus de neurotrophines et de neuropeptides; est-ce qu'une expression anormalement haute de NGF est rapportée dans certaines pathologies. Mes résultats ne répondent pas à ces questions. Elles les soulevent comme perspective d'études futures et elles renforcent l'idée que les communications paracrines impliquant les neurotrophines et les neuropeptides sont importantes pour l'homéostasie cutanée. Certains exemples de changement au niveau de la quantité de neurotrophines et neuropeptides ont été documentés ailleurs.

Au moins un exemple de pathologie cutanée où certains neuropeptides et facteurs neurotrophiques sont présent en plus grande quantité est documenté, soit le psoriasis. Dans la peau psoriasique lésionnelle, caractérisée par une hyperprolifération des kératinocytes, il y a une concentration élevée en NGF [865, 867]. Certains avancent que cela pourrait induire l'innervation accrue observée dans la peau psoriasique [868-871]. En outre, les récepteurs TrkA et p75^{NTR} ne sont normalement exprimés que dans la couche basale de l'épiderme, mais ils sont détectés dans toutes les couches de l'épiderme psoriasique [872]. De plus, il y a plus de fibres nerveuses positives pour la SP et pour d'autres neuropeptides et il y a une augmentation de la libération de ces neuropeptides dans les tissus psoriasiques lésionnels [632, 659, 868, 873, 874]. Enfin, il y a dans le psoriasis une augmentation marquée du nombre de capillaires dans le derme lésionnel [875]. Certaines études ne montraient pas d'augmentation de la quantité de VEGF détectée dans la peau psoriasique, contrairement au NGF [876]. À l'opposé du psoriasis, au moins un exemple est décrit où l'on retrouve une concentration moindre de certaines neurotrophines et certains neuropeptides dans la peau. Lors du processus normal de vieillissement, une concentration moindre de NGF est retrouvée dans la peau [877]. Certains suggèrent que les variations à la hausse et à la baisse de NGF dans la peau puissent influencer le vieillissement [878]. Ces exemples illustrent la pertinence de mieux comprendre le rôle des facteurs neurotrophiques et des neuropeptides comme la SP dans la peau.

4.3 Conclusion générale

Dans cette thèse nous avons montré que les facteurs neurotrophiques NGF, BDNF, NT-3 ainsi que GDNF ont un effet angiogénique pour les HUVEC et les HDMEC. Ces propriétés n'étaient pas connues pour le NT-3 et le GDNF. Ensuite, nous avons observé que les fibres nerveuses influencent la réépithélialisation des plaies par leur libération du neuropeptide substance P. L'effet direct des fibres nerveuses sur la réépithélialisation n'avait jamais pu être montré aussi directement, faute de modèle. Ces résultats s'ajoutent aux connaissances actuelles en neurobiologie cutanée et elles s'intègrent notamment dans un contexte où un lien fut établi ailleurs entre l'expression de certains neuropeptides et celle de certains facteurs neurotrophiques dans la peau. Ainsi, les différentes composantes cellulaires de la peau, incluant les terminaisons nerveuses, collaborent pour assurer l'homéostasie cutanée.

5 Bibliographie

1. Marieb, E.N., ed. Anatomie et physiologie humaines. 5th edition ed. Le système tégumentaire. 2005, E.R.P.I.: Saint-Laurent, Québec, Canada.
2. Winslow, T., Skin Anatomy. 2008, National Cancer institute. p. Skin anatomy; drawing shows layers of the epidermis, dermis, and subcutaneous tissue including hair shafts and follicles, oil glands, lymph vessels, nerves, fatty tissue, veins, arteries, and a sweat gland. Anatomy of the skin, showing the epidermis, dermis, and subcutaneous tissue.
3. Holbrook K.A., W., K., The structure and development of skin, in Dermatology in General Medicine, T.B. Fitzpatrick, Eisen, A.Z., Wolff, K., Freedberg, I.M. and Austen, K.F., Editor. 1987, McGraw-Hill,: New-York. p. 93-131.
4. Odland, G.F., Histology and fine structure of the epidermis, in The skin by 30 authors, E.B. Helwig, and Mostofi, F.K., Editor. 1971, Williams & Wilkins: Baltimore. p. 28-46.
5. van der Flier, A. and A. Sonnenberg, Function and interactions of integrins. Cell Tissue Res, 2001. 305(3): p. 285-98.
6. Watt, F.M., The stem cell compartment in human interfollicular epidermis. J Dermatol Sci, 2002. 28(3): p. 173-80.
7. Carter, W.G., et al., The role of integrins alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells. J Cell Biol, 1990. 110(4): p. 1387-404.
8. Guo, L., et al., Gene targeting of BPAG1: abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration. Cell, 1995. 81(2): p. 233-43.
9. Tsuruta, D., et al., Laminin-332-integrin interaction: a target for cancer therapy? Curr Med Chem, 2008. 15(20): p. 1968-75.
10. Stepp, M.A., et al., Alpha 6 beta 4 integrin heterodimer is a component of hemidesmosomes. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(22): p. 8970-4.
11. Niessen, C.M., D. Leckband, and A.S. Yap, Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. Physiol Rev, 2011. 91(2): p. 691-731.

12. Vogel, K.G., Effects of hyaluronidase, trypsin, and EDTA on surface composition and topography during detachment of cells in culture. *Exp Cell Res*, 1978. 113(2): p. 345-57.
13. Nagata, S., et al., Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ*, 2003. 10(1): p. 108-16.
14. Moles, J.P. and F.M. Watt, The epidermal stem cell compartment: variation in expression levels of E-cadherin and catenins within the basal layer of human epidermis. *J Histochem Cytochem*, 1997. 45(6): p. 867-74.
15. Kowalczyk, A.P., et al., Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. *Int Rev Cytol*, 1999. 185: p. 237-302.
16. Kljuic, A., et al., Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell*, 2003. 113(2): p. 249-60.
17. Crickx, B., Comprendre la peau. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 2005. 132(11 part 2): p. 3-102.
18. Green, K.J. and C.A. Gaudry, Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. 1(3): p. 208-16.
19. Hatzfeld, M., et al., Band 6 protein, a major constituent of desmosomes from stratified epithelia, is a novel member of the armadillo multigene family. *J Cell Sci*, 1994. 107 (Pt 8): p. 2259-70.
20. Vasioukhin, V. and E. Fuchs, Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Curr Opin Cell Biol*, 2001. 13(1): p. 76-84.
21. Koch, P.J. and W.W. Franke, Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*, 1994. 6(5): p. 682-7.
22. Jamora, C. and E. Fuchs, Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol*, 2002. 4(4): p. E101-8.
23. Fuchs, E. and H. Green, Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*, 1980. 19(4): p. 1033-42.
24. Byrne, C., M. Tainsky, and E. Fuchs, Programming gene expression in developing epidermis. *Development*, 1994. 120(9): p. 2369-83.
25. Potten, C.S. and R.J. Morris, Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci Suppl*, 1988. 10: p. 45-62.
26. Michel, M., 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*, 1996. 109 (Pt 5): p. 1017-28.

27. Lavker, R.M. and T.T. Sun, Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. *Science*, 1982. 215(4537): p. 1239-41.

28. Lowell, S., et al., Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Curr Biol*, 2000. 10(9): p. 491-500.

29. Jones, P.H. and F.M. Watt, Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*, 1993. 73(4): p. 713-24.

30. Webb, A., A. Li, and P. Kaur, Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation*, 2004. 72(8): p. 387-95.

31. Tumber, T., et al., Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science*, 2004. 303(5656): p. 359-63.

32. Taylor, G., et al., Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*, 2000. 102(4): p. 451-61.

33. Oshima, H., et al., Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*, 2001. 104(2): p. 233-45.

34. Morris, R.J., et al., Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol*, 2004. 22(4): p. 411-7.

35. Cotsarelis, G., T.T. Sun, and R.M. Lavker, Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell*, 1990. 61(7): p. 1329-37.

36. Blanpain, C., et al., Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*, 2004. 118(5): p. 635-48.

37. Akiyama, M., et al., Characterization of hair follicle bulge in human fetal skin: the human fetal bulge is a pool of undifferentiated keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 1995. 105(6): p. 844-50.

38. Gibbs, S., et al., Melanosome capping of keratinocytes in pigmented reconstructed epidermis--effect of ultraviolet radiation and 3-isobutyl-1-methyl-xanthine on melanogenesis. *Pigment Cell Res*, 2000. 13(6): p. 458-66.

39. Hunt, G., et al., Eumelanin and pheomelanin contents of human epidermis and cultured melanocytes. *Pigment Cell Res*, 1995. 8(4): p. 202-8.

40. Eisinger, M. and O. Marko, Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. 79(6): p. 2018-22.
41. Tsatmali, M., J. Ancans, and A.J. Thody, Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J Histochem Cytochem*, 2002. 50(2): p. 125-33.
42. Eckert, R.L., et al., The epidermis: genes on - genes off. *J Invest Dermatol*, 1997. 109(4): p. 501-9.
43. Hohl, D., Cornified cell envelope. *Dermatologica*, 1990. 180(4): p. 201-11.
44. Zamansky, G.B., U. Nguyen, and I.N. Chou, An immunofluorescence study of the calcium-induced coordinated reorganization of microfilaments, keratin intermediate filaments, and microtubules in cultured human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 1991. 97(6): p. 985-94.
45. Menon, G.K., S. Grayson, and P.M. Elias, Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol*, 1985. 84(6): p. 508-12.
46. Yuspa, S.H., et al., Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol*, 1989. 109(3): p. 1207-17.
47. Wu, H., J.R. Stanley, and G. Cotsarelis, Desmoglein isotype expression in the hair follicle and its cysts correlates with type of keratinization and degree of differentiation. *J Invest Dermatol*, 2003. 120(6): p. 1052-7.
48. Michel, S. and M. Demarchez, Localization and in vivo activity of epidermal transglutaminase. *J Invest Dermatol*, 1988. 90(4): p. 472-4.
49. Efimova, T., et al., Regulation of human involucrin promoter activity by a protein kinase C, Ras, MEKK1, MEK3, p38/RK, AP1 signal transduction pathway. *J Biol Chem*, 1998. 273(38): p. 24387-95.
50. Crish, J.F., et al., The human involucrin gene contains spatially distinct regulatory elements that regulate expression during early versus late epidermal differentiation. *Oncogene*, 2002. 21(5): p. 738-47.
51. Kalinin, A., L.N. Marekov, and P.M. Steinert, Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J Cell Sci*, 2001. 114(Pt 17): p. 3069-70.
52. Karashima, T. and F.M. Watt, Interaction of periplakin and envoplakin with intermediate filaments. *J Cell Sci*, 2002. 115(Pt 24): p. 5027-37.
53. Steinert, P.M. and L.N. Marekov, The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked

components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem*, 1995. 270(30): p. 17702-11.

54. Candi, E., R. Schmidt, and G. Melino, The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. 6(4): p. 328-40.

55. Brandner, J.M., Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009. 72(2): p. 289-94.

56. Furuse, M., et al., Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*, 2002. 156(6): p. 1099-111.

57. Budtz, P.E., Is endogenous Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-dependent endonuclease activity involved in epidermal terminal differentiation? *J Invest Dermatol*, 1992. 98(6): p. 945.

58. Lippens, S., et al., Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ*, 2000. 7(12): p. 1218-24.

59. Lippens, S., et al., Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ*, 2005. 12 Suppl 2: p. 1497-508.

60. Gandarillas, A., Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways? *Exp Gerontol*, 2000. 35(1): p. 53-62.

61. Lockshin, R.A. and Z. Zakeri, Caspase-independent cell death? *Oncogene*, 2004. 23(16): p. 2766-73.

62. Lockshin, R.A. and Z. Zakeri, Caspase-independent cell deaths. *Curr Opin Cell Biol*, 2002. 14(6): p. 727-33.

63. Ishida-Yamamoto, A., et al., Epidermal lamellar granules transport different cargoes as distinct aggregates. *J Invest Dermatol*, 2004. 122(5): p. 1137-44.

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

65. Potts, R.O. and M.L. Francoeur, The influence of stratum corneum morphology on water permeability. *J Invest Dermatol*, 1991. 96(4): p. 495-9.

66. Elias, P.M., Epidermal lipids, membranes, and keratinization. *Int J Dermatol*, 1981. 20(1): p. 1-19.

67. Barry, B.W., Breaching the skin's barrier to drugs. *Nat Biotechnol*, 2004. 22(2): p. 165-7.

68. Mitragotri, S., Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *J Control Release*, 2003. 86(1): p. 69-92.
69. Poet, T.S. and J.N. McDougal, Skin absorption and human risk assessment. *Chem Biol Interact*, 2002. 140(1): p. 19-34.
70. Wysocki, A.B., Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *Nurs Clin North Am*, 1999. 34(4): p. 777-97, v.
71. Szabowski, A., et al., c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell*, 2000. 103(5): p. 745-55.
72. van der Rest, M. and R. Garrone, Collagen family of proteins. *FASEB J*, 1991. 5(13): p. 2814-23.
73. Ricard-Blum, S. and F. Ruggiero, The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol (Paris)*, 2005. 53(7): p. 430-42.
74. Uitto, J., D.R. Olsen, and M.J. Fazio, Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress. *J Invest Dermatol*, 1989. 92(4 Suppl): p. 61S-77S.
75. Keene, D.R., M.P. Marinkovich, and L.Y. Sakai, Immunodissection of the connective tissue matrix in human skin. *Microsc Res Tech*, 1997. 38(4): p. 394-406.
76. Hay, E.D., Extracellular matrix. *J Cell Biol*, 1981. 91(3 Pt 2): p. 205s-223s.
77. Rosenbloom, J., W.R. Abrams, and R. Mecham, Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J*, 1993. 7(13): p. 1208-18.
78. Kielty, C.M., M.J. Sherratt, and C.A. Shuttleworth, Elastic fibres. *J Cell Sci*, 2002. 115(Pt 14): p. 2817-28.
79. Comper, W.D. and T.C. Laurent, Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol Rev*, 1978. 58(1): p. 255-315.
80. Marinkovich, M.P., G.P. Lunstrum, and R.E. Burgeson, The anchoring filament protein kalinin is synthesized and secreted as a high molecular weight precursor. *J Biol Chem*, 1992. 267(25): p. 17900-6.
81. Groffen, A.J., et al., Recent insights into the structure and functions of heparan sulfate proteoglycans in the human glomerular basement membrane. *Nephrol Dial Transplant*, 1999. 14(9): p. 2119-29.
82. Leigh, I.M., et al., Type VII collagen is a normal component of epidermal basement membrane, which shows altered expression in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 1988. 90(5): p. 639-42.
83. Eady, R.A., The basement membrane. Interface between the epithelium and the dermis: structural features. *Arch Dermatol*, 1988. 124(5): p. 709-12.

84. Fitzpatrick, T.B. and K. Wolff, Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 7th ed. 2008, New York: McGraw-Hill Medical.
85. Baxter, C.R. and J.F. Waeckerle, Emergency treatment of burn injury. *Ann Emerg Med*, 1988. 17(12): p. 1305-15.
86. Demling, R.H. and C. LaLonde, Identification and modifications of the pulmonary and systemic inflammatory and biochemical changes caused by a skin burn. *J Trauma*, 1990. 30(12 Suppl): p. S57-62.
87. Barrientos, S., et al., Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*, 2008. 16(5): p. 585-601.
88. Hu, Y., et al., The role of interleukin-1 in wound biology. Part II: In vivo and human translational studies. *Anesth Analg*, 2010. 111(6): p. 1534-42.
89. Gurtner, G.C., et al., Wound repair and regeneration. *Nature*, 2008. 453(7193): p. 314-21.
90. Arnoux, V., et al., Cutaneous Wound Reepithelialization, in *Rise and Fall of Epithelial Phenotype*. 2005. p. 111-134.
91. Opalenik, S.R. and J.M. Davidson, Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair. *FASEB J*, 2005. 19(11): p. 1561-3.
92. Werner, S., T. Krieg, and H. Smola, Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol*, 2007. 127(5): p. 998-1008.
93. Lovvorn, H.N., 3rd, et al., Relative distribution and crosslinking of collagen distinguish fetal from adult sheep wound repair. *J Pediatr Surg*, 1999. 34(1): p. 218-23.
94. Raja, et al., Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci*, 2007. 12: p. 2849-68.
95. Komine, M., et al., Interleukin-1 induces transcription of keratin K6 in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 2001. 116(2): p. 330-8.
96. Freedberg, I.M., et al., Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J Invest Dermatol*, 2001. 116(5): p. 633-40.
97. Mansbridge, J.N. and A.M. Knapp, Changes in keratinocyte maturation during wound healing. *J Invest Dermatol*, 1987. 89(3): p. 253-63.
98. Breuss, J.M., et al., Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J Cell Sci*, 1995. 108 (Pt 6): p. 2241-51.

99. Haapasalmi, K., et al., Keratinocytes in human wounds express alpha v beta 6 integrin. *J Invest Dermatol*, 1996. 106(1): p. 42-8.
100. Adams, J.C. and F.M. Watt, Expression of beta 1, beta 3, beta 4, and beta 5 integrins by human epidermal keratinocytes and non-differentiating keratinocytes. *J Cell Biol*, 1991. 115(3): p. 829-41.
101. Stepp, M.A. and L. Zhu, Upregulation of alpha 9 integrin and tenascin during epithelial regeneration after debridement in the cornea. *J Histochem Cytochem*, 1997. 45(2): p. 189-201.
102. Stepp, M.A., et al., Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. *J Cell Sci*, 2002. 115(Pt 23): p. 4517-31.
103. Martin, P., Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 1997. 276(5309): p. 75-81.
104. Garrod, D.R., et al., Hyper-adhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. *J Cell Sci*, 2005. 118(Pt 24): p. 5743-54.
105. Wallis, S., et al., The alpha isoform of protein kinase C is involved in signaling the response of desmosomes to wounding in cultured epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 2000. 11(3): p. 1077-92.
106. Hintermann, E. and V. Quaranta, Epithelial cell motility on laminin-5: regulation by matrix assembly, proteolysis, integrins and erbB receptors. *Matrix Biol*, 2004. 23(2): p. 75-85.
107. Nguyen, B.P., et al., Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, 2000. 12(5): p. 554-62.
108. Goldfinger, L.E., et al., The alpha3 laminin subunit, alpha6beta4 and alpha3beta1 integrin coordinately regulate wound healing in cultured epithelial cells and in the skin. *J Cell Sci*, 1999. 112 (Pt 16): p. 2615-29.
109. Pollard, T.D. and G.G. Borisy, Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 2003. 112(4): p. 453-65.
110. Pilcher, B.K., et al., The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol*, 1997. 137(6): p. 1445-57.
111. Sudbeck, B.D., et al., Induction and repression of collagenase-1 by keratinocytes is controlled by distinct components of different extracellular matrix compartments. *J Biol Chem*, 1997. 272(35): p. 22103-10.
112. Bugge, T.H., et al., Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency. *Cell*, 1996. 87(4): p. 709-19.

113. Gallucci, R.M., et al., Interleukin 6 indirectly induces keratinocyte migration. *J Invest Dermatol*, 2004. 122(3): p. 764-72.
114. Klingbeil, C.K., L.B. Cesar, and J.C. Fiddes, Basic fibroblast growth factor accelerates tissue repair in models of impaired wound healing. *Prog Clin Biol Res*, 1991. 365: p. 443-58.
115. Hebda, P.A., et al., Basic fibroblast growth factor stimulation of epidermal wound healing in pigs. *J Invest Dermatol*, 1990. 95(6): p. 626-31.
116. Niu, J., et al., Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7-regulated cell migration and invasion through activation of NF-kappaB transcription factors. *J Biol Chem*, 2007. 282(9): p. 6001-11.
117. Werner, S., et al., Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(15): p. 6896-900.
118. Braun, S., et al., Fibroblast growth factors in epithelial repair and cytoprotection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2004. 359(1445): p. 753-7.
119. Radek, K.A., K.R. Taylor, and R.L. Gallo, FGF-10 and specific structural elements of dermatan sulfate size and sulfation promote maximal keratinocyte migration and cellular proliferation. *Wound Repair Regen*, 2009. 17(1): p. 118-26.
120. Igarashi, M., P.W. Finch, and S.A. Aaronson, Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF)-10 reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *J Biol Chem*, 1998. 273(21): p. 13230-5.
121. Beer, H.D., et al., The fibroblast growth factor binding protein is a novel interaction partner of FGF-7, FGF-10 and FGF-22 and regulates FGF activity: implications for epithelial repair. *Oncogene*, 2005. 24(34): p. 5269-77.
122. Chmielowiec, J., et al., c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol*, 2007. 177(1): p. 151-62.
123. Hudson, L.G. and L.J. McCawley, Contributions of the epidermal growth factor receptor to keratinocyte motility. *Microsc Res Tech*, 1998. 43(5): p. 444-55.
124. Rheinwald, J.G. and H. Green, Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature*, 1977. 265(5593): p. 421-4.
125. Jiang, C.K., et al., Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha specifically induce the activation- and hyperproliferation-associated keratins 6 and 16. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(14): p. 6786-90.

126. Barrandon, Y. and H. Green, Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell*, 1987. 50(7): p. 1131-7.
127. Amendt, C., et al., Expression of a dominant negative type II TGF-beta receptor in mouse skin results in an increase in carcinoma incidence and an acceleration of carcinoma development. *Oncogene*, 1998. 17(1): p. 25-34.
128. Sellheyer, K., et al., Inhibition of skin development by overexpression of transforming growth factor beta 1 in the epidermis of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(11): p. 5237-41.
129. Mazzieri, R., et al., Expression of truncated latent TGF-beta-binding protein modulates TGF-beta signaling. *J Cell Sci*, 2005. 118(Pt 10): p. 2177-87.
130. Bottinger, E.P., J.J. Letterio, and A.B. Roberts, Biology of TGF-beta in knockout and transgenic mouse models. *Kidney Int*, 1997. 51(5): p. 1355-60.
131. Zambruno, G., et al., Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. *J Cell Biol*, 1995. 129(3): p. 853-65.
132. Li, Y., et al., Transforming growth factor-alpha: a major human serum factor that promotes human keratinocyte migration. *J Invest Dermatol*, 2006. 126(9): p. 2096-105.
133. Pries, A.R., T.W. Secomb, and P. Gaetgens, The endothelial surface layer. *Pflugers Arch*, 2000. 440(5): p. 653-66.
134. Cleaver, O. and D.A. Melton, Endothelial signaling during development. *Nat Med*, 2003. 9(6): p. 661-8.
135. Braverman, I.M., The cutaneous microcirculation. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 2000. 5(1): p. 3-9.
136. Braverman, I.M., Ultrastructure and organization of the cutaneous microvasculature in normal and pathologic states. *J Invest Dermatol*, 1989. 93(2 Suppl): p. 2S-9S.
137. Braverman, I.M., et al., Topographic mapping of the cutaneous microcirculation using two outputs of laser-Doppler flowmetry: flux and the concentration of moving blood cells. *Microvasc Res*, 1992. 44(1): p. 33-48.
138. Braverman, I.M. and J.S. Schechner, Contour mapping of the cutaneous microvasculature by computerized laser Doppler velocimetry. *J Invest Dermatol*, 1991. 97(6): p. 1013-8.
139. Yen, A. and I.M. Braverman, Ultrastructure of the human dermal microcirculation: the horizontal plexus of the papillary dermis. *J Invest Dermatol*, 1976. 66(3): p. 131-42.

140. Zovein, A.C., et al., Beta1 integrin establishes endothelial cell polarity and arteriolar lumen formation via a Par3-dependent mechanism. *Dev Cell*, 2010. 18(1): p. 39-51.
141. Nikolova, G. and E. Lammert, Interdependent development of blood vessels and organs. *Cell Tissue Res*, 2003. 314(1): p. 33-42.
142. McDonald, D.M., Endothelial gaps and permeability of venules in rat tracheas exposed to inflammatory stimuli. *Am J Physiol*, 1994. 266(1 Pt 1): p. L61-83.
143. Coomber, B.L., et al., Quantitative morphology of human glioblastoma multiforme microvessels: structural basis of blood-brain barrier defect. *J Neurooncol*, 1987. 5(4): p. 299-307.
144. Milici, A.J., M.B. Furie, and W.W. Carley, The formation of fenestrations and channels by capillary endothelium in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(18): p. 6181-5.
145. Niemela, H., et al., Molecular identification of PAL-E, a widely used endothelial-cell marker. *Blood*, 2005. 106(10): p. 3405-9.
146. Petzelbauer, P., et al., Heterogeneity of dermal microvascular endothelial cell antigen expression and cytokine responsiveness in situ and in cell culture. *J Immunol*, 1993. 151(9): p. 5062-72.
147. Higgins, J.C. and R.A. Eady, Human dermal microvasculature: II. Enzyme histochemical and cytochemical study. *Br J Dermatol*, 1981. 104(5): p. 521-9.
148. Abbott, N.J., L. Ronnback, and E. Hansson, Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 2006. 7(1): p. 41-53.
149. Baumer, S., et al., Vascular endothelial cell-specific phosphotyrosine phosphatase (VE-PTP) activity is required for blood vessel development. *Blood*, 2006. 107(12): p. 4754-62.
150. Vittet, D., et al., Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(12): p. 6273-8.
151. Matsumura, T., K. Wolff, and P. Petzelbauer, Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin. *J Immunol*, 1997. 158(7): p. 3408-16.
152. Harris, E.S. and W.J. Nelson, VE-cadherin: at the front, center, and sides of endothelial cell organization and function. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. 22(5): p. 651-8.

153. Johnson, T.L. and R.M. Nerem, Endothelial connexin 37, connexin 40, and connexin 43 respond uniquely to substrate and shear stress. *Endothelium*, 2007. 14(4-5): p. 215-26.
154. Hynes, R.O., Cell-matrix adhesion in vascular development. *J Thromb Haemost*, 2007. 5 Suppl 1: p. 32-40.
155. Miyamoto, S., et al., Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol*, 1995. 131(3): p. 791-805.
156. O'Reilly, M.S., et al., Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997. 88(2): p. 277-85.
157. Grant, D.S., et al., Interaction of endothelial cells with a laminin A chain peptide (SIKVAV) in vitro and induction of angiogenic behavior in vivo. *J Cell Physiol*, 1992. 153(3): p. 614-25.
158. Detmar, M., Tumor angiogenesis. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 2000. 5(1): p. 20-3.
159. Hellstrom, M., et al., Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol*, 2001. 153(3): p. 543-53.
160. Egginton, S., et al., The role of pericytes in controlling angiogenesis in vivo. *Adv Exp Med Biol*, 2000. 476: p. 81-99.
161. Larson, D.M., M.P. Carson, and C.C. Haudenschild, Junctional transfer of small molecules in cultured bovine brain microvascular endothelial cells and pericytes. *Microvasc Res*, 1987. 34(2): p. 184-99.
162. Armulik, A., A. Abramsson, and C. Betsholtz, Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*, 2005. 97(6): p. 512-23.
163. Benzakour, O., et al., Evidence for cultured human vascular smooth muscle cell heterogeneity: isolation of clonal cells and study of their growth characteristics. *Thromb Haemost*, 1996. 75(5): p. 854-8.
164. Bochaton-Piallat, M.L., et al., Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones. Implications for the development of experimental intimal thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. 16(6): p. 815-20.
165. Frid, M.G., et al., Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities. *Circ Res*, 1997. 81(6): p. 940-52.
166. Hao, H., et al., Heterogeneity of smooth muscle cell populations cultured from pig coronary artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22(7): p. 1093-9.

167. Cohen, M.P., R.N. Frank, and A.A. Khalifa, Collagen production by cultured retinal capillary pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1980. 19(1): p. 90-4.
168. Mandarino, L.J., et al., Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp Eye Res*, 1993. 57(5): p. 609-21.
169. Kalluri, R., Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(6): p. 422-33.
170. Arnaoutova, I., et al., The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis*, 2009. 12(3): p. 267-74.
171. Choi, K., et al., A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, 1998. 125(4): p. 725-32.
172. Fehling, H.J., et al., Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development*, 2003. 130(17): p. 4217-27.
173. Yamashita, J., et al., Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, 2000. 408(6808): p. 92-6.
174. Ema, M., et al., Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev*, 2003. 17(3): p. 380-93.
175. Cormier, F., P. de Paz, and F. Dieterlen-Lievre, In vitro detection of cells with monocytic potentiality in the wall of the chick embryo aorta. *Dev Biol*, 1986. 118(1): p. 167-75.
176. Olah, I., J. Medgyes, and B. Glick, Origin of aortic cell clusters in the chicken embryo. *Anat Rec*, 1988. 222(1): p. 60-8.
177. Coffin, J.D. and T.J. Poole, Embryonic vascular development: immunohistochemical identification of the origin and subsequent morphogenesis of the major vessel primordia in quail embryos. *Development*, 1988. 102(4): p. 735-48.
178. Poole, T.J. and J.D. Coffin, Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J Exp Zool*, 1989. 251(2): p. 224-31.
179. Noden, D.M., Embryonic origins and assembly of blood vessels. *Am Rev Respir Dis*, 1989. 140(4): p. 1097-103.
180. Noden, D.M., Cell movements and control of patterned tissue assembly during craniofacial development. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 1991. 11(4): p. 192-213.

181. Dieterlen-Lievre, F., On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J Embryol Exp Morphol*, 1975. 33(3): p. 607-19.
182. Dieterlen-Lievre, F., et al., Early haemopoietic stem cells in the avian embryo. *J Cell Sci Suppl*, 1988. 10: p. 29-44.
183. Muller, A.M., et al., Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity*, 1994. 1(4): p. 291-301.
184. Flamme, I. and W. Risau, Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*, 1992. 116(2): p. 435-9.
185. Flamme, I., G. Breier, and W. Risau, Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev Biol*, 1995. 169(2): p. 699-712.
186. Faloon, P., et al., Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development*, 2000. 127(9): p. 1931-41.
187. Iraha, F., et al., Common and distinct signals specify the distribution of blood and vascular cell lineages in *Xenopus laevis* embryos. *Dev Growth Differ*, 2002. 44(5): p. 395-407.
188. Kumano, G. and W.C. Smith, FGF signaling restricts the primary blood islands to ventral mesoderm. *Dev Biol*, 2000. 228(2): p. 304-14.
189. Kappel, A., et al., Role of SCL/Tal-1, GATA, and ets transcription factor binding sites for the regulation of flk-1 expression during murine vascular development. *Blood*, 2000. 96(9): p. 3078-85.
190. Patterson, L.J. and R. Patient, The "Ets" factor: vessel formation in zebrafish--the missing link? *PLoS Biol*, 2006. 4(1): p. e24.
191. Dale, L. and C.M. Jones, BMP signalling in early *Xenopus* development. *Bioessays*, 1999. 21(9): p. 751-60.
192. Schmid, B., et al., Equivalent genetic roles for *bmp7/snailhouse* and *bmp2b/swirl* in dorsoventral pattern formation. *Development*, 2000. 127(5): p. 957-67.
193. Winnier, G., et al., Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev*, 1995. 9(17): p. 2105-16.
194. Park, C., et al., A hierarchical order of factors in the generation of FLK1- and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells. *Development*, 2004. 131(11): p. 2749-62.

195. Park, C., et al., Bone morphogenetic protein receptor 1A signaling is dispensable for hematopoietic development but essential for vessel and atrioventricular endocardial cushion formation. *Development*, 2006. 133(17): p. 3473-84.
196. Moser, M., et al., BMPER, a novel endothelial cell precursor-derived protein, antagonizes bone morphogenetic protein signaling and endothelial cell differentiation. *Mol Cell Biol*, 2003. 23(16): p. 5664-79.
197. Lindsley, R.C., et al., Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. *Development*, 2006. 133(19): p. 3787-96.
198. Wang, H., et al., Gene expression profile signatures indicate a role for Wnt signaling in endothelial commitment from embryonic stem cells. *Circ Res*, 2006. 98(10): p. 1331-9.
199. Wang, H., et al., Wnt2 coordinates the commitment of mesoderm to hematopoietic, endothelial, and cardiac lineages in embryoid bodies. *J Biol Chem*, 2007. 282(1): p. 782-91.
200. Larsen, W.J., *Essentials of human embryology*. 1998, New York: Churchill Livingstone. xii, 394 p.
201. Taviani, M., et al., Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood*, 1996. 87(1): p. 67-72.
202. Risau, W., Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 1997. 386(6626): p. 671-4.
203. Iruela-Arispe, M.L. and G.E. Davis, Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Dev Cell*, 2009. 16(2): p. 222-31.
204. Benest, A.V. and H.G. Augustin, Tension in the vasculature. *Nat Med*, 2009. 15(6): p. 608-10.
205. Gerhardt, H., et al., VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*, 2003. 161(6): p. 1163-77.
206. Isogai, S., et al., Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk. *Development*, 2003. 130(21): p. 5281-90.
207. Noguera-Troise, I., et al., Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Novartis Found Symp*, 2007. 283: p. 106-20; discussion 121-5, 238-41.
208. Hellstrom, M., et al., Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*, 2007. 445(7129): p. 776-80.

209. Suchting, S., et al., The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(9): p. 3225-30.
210. De Smet, F., et al., Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. 29(5): p. 639-49.
211. Carmeliet, P., Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 2003. 9(6): p. 653-60.
212. Koh, W., R.D. Mahan, and G.E. Davis, Cdc42- and Rac1-mediated endothelial lumen formation requires Pak2, Pak4 and Par3, and PKC-dependent signaling. *J Cell Sci*, 2008. 121(Pt 7): p. 989-1001.
213. Caduff, J.H., L.C. Fischer, and P.H. Burri, Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat Rec*, 1986. 216(2): p. 154-64.
214. Ribatti, D. and V. Djonov, Intussusceptive microvascular growth in tumors. *Cancer Lett*, 2012. 316(2): p. 126-31.
215. Gale, N.W. and G.D. Yancopoulos, Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev*, 1999. 13(9): p. 1055-66.
216. Folkman, J. and M. Klagsbrun, Angiogenic factors. *Science*, 1987. 235(4787): p. 442-7.
217. Haas, T.L. and J.A. Madri, Extracellular matrix-driven matrix metalloproteinase production in endothelial cells: implications for angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*, 1999. 9(3-4): p. 70-7.
218. Mignatti, P., R. Mazzieri, and D.B. Rifkin, Expression of the urokinase receptor in vascular endothelial cells is stimulated by basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol*, 1991. 113(5): p. 1193-201.
219. Brooks, P.C., Cell adhesion molecules in angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*, 1996. 15(2): p. 187-94.
220. Newman, P.J., The biology of PECAM-1. *J Clin Invest*, 1997. 100(11 Suppl): p. S25-9.
221. Iivanainen, E., et al., Endothelial cell-matrix interactions. *Microsc Res Tech*, 2003. 60(1): p. 13-22.
222. Stupack, D.G. and D.A. Cheresh, Integrins and angiogenesis. *Curr Top Dev Biol*, 2004. 64: p. 207-38.

223. Diaz-Flores, L., R. Gutierrez, and H. Varela, Behavior of postcapillary venule pericytes during postnatal angiogenesis. *J Morphol*, 1992. 213(1): p. 33-45.
224. Egginton, S., et al., In vivo pericyte-endothelial cell interaction during angiogenesis in adult cardiac and skeletal muscle. *Microvasc Res*, 1996. 51(2): p. 213-28.
225. Zeeb, M., B. Strilic, and E. Lammert, Resolving cell-cell junctions: lumen formation in blood vessels. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. 22(5): p. 626-32.
226. Kesavan, G., et al., Cdc42-mediated tubulogenesis controls cell specification. *Cell*, 2009. 139(4): p. 791-801.
227. Lampugnani, M.G., et al., CCM1 regulates vascular-lumen organization by inducing endothelial polarity. *J Cell Sci*, 2010. 123(Pt 7): p. 1073-80.
228. Strilic, B., et al., The molecular basis of vascular lumen formation in the developing mouse aorta. *Dev Cell*, 2009. 17(4): p. 505-15.
229. Kiel, M.J., et al., SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, 2005. 121(7): p. 1109-21.
230. Ribatti, D., et al., The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia*, 2007. 21(1): p. 44-52.
231. Mescher, A.L. and L.C.U.a.B.h. Junqueira, Junqueira's basic histology : text and atlas. 12th ed. ed. 2010, New York ; London: McGraw-Hill Medical. xi, 467 p.
232. Lauria, G., et al., Tubule and neurofilament immunoreactivity in human hairy skin: markers for intraepidermal nerve fibers. *Muscle Nerve*, 2004. 30(3): p. 310-6.
233. Thompson, R.J., et al., PGP 9.5--a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res*, 1983. 278(1-2): p. 224-8.
234. Birklein, F. and T. Schlereth, Autonomic Effects on the Skin, in *Neuroimmunology of the Skin*. 2009. p. 23-32.
235. Reznik, M., [Structure and functions of the cutaneous nervous system]. *Pathol Biol (Paris)*, 1996. 44(10): p. 831-7.
236. Malinovsky, L., Sensory nerve formations in the skin and their classification. *Microsc Res Tech*, 1996. 34(4): p. 283-301.
237. Zylka, M.J., F.L. Rice, and D.J. Anderson, Topographically distinct epidermal nociceptive circuits revealed by axonal tracers targeted to Mrgprd. *Neuron*, 2005. 45(1): p. 17-25.

238. Hilliges, M., L. Wang, and O. Johansson, Ultrastructural evidence for nerve fibers within all vital layers of the human epidermis. *J Invest Dermatol*, 1995. 104(1): p. 134-7.
239. Umaphathi, T., et al., Determinants of epidermal nerve fiber density in normal individuals. *Muscle Nerve*, 2006. 33(6): p. 742-6.
240. Johansson, O., et al., Intraepidermal nerves in human skin: PGP 9.5 immunohistochemistry with special reference to the nerve density in skin from different body regions. *J Peripher Nerv Syst*, 1999. 4(1): p. 43-52.
241. Kawakami, T., M. Ishihara, and M. Mihara, Distribution density of intraepidermal nerve fibers in normal human skin. *J Dermatol*, 2001. 28(2): p. 63-70.
242. Goransson, L.G., et al., The effect of age and gender on epidermal nerve fiber density. *Neurology*, 2004. 62(5): p. 774-7.
243. Lauria, G., et al., Morphometry of dermal nerve fibers in human skin. *Neurology*, 2011. 77(3): p. 242-9.
244. Ruocco, I., et al., Skin blood vessels are simultaneously innervated by sensory, sympathetic, and parasympathetic fibers. *J Comp Neurol*, 2002. 448(4): p. 323-36.
245. Knott, A.B., et al., Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, 2008. 9(7): p. 505-18.
246. Purves, D., *Neuroscience*. 4th ed. 2008, Sunderland, Mass.: Sinauer. xvii, 857, G-16, IC-7, I-29 p.
247. Lumpkin, E.A. and M.J. Caterina, Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature*, 2007. 445(7130): p. 858-65.
248. Goldstein, M.E., S.B. House, and H. Gainer, NF-L and peripherin immunoreactivities define distinct classes of rat sensory ganglion cells. *J Neurosci Res*, 1991. 30(1): p. 92-104.
249. Lawson, S.N., et al., A monoclonal antibody against neurofilament protein specifically labels a subpopulation of rat sensory neurones. *J Comp Neurol*, 1984. 228(2): p. 263-72.
250. Lawson, S.N., Neuropeptides in morphologically and functionally identified primary afferent neurons in dorsal root ganglia: substance P, CGRP and somatostatin. *Prog Brain Res*, 1995. 104: p. 161-73.
251. New, H.V. and A.W. Mudge, Distribution and ontogeny of SP, CGRP, SOM, and VIP in chick sensory and sympathetic ganglia. *Dev Biol*, 1986. 116(2): p. 337-46.
252. Montano, J.A., et al., Development and neuronal dependence of cutaneous sensory nerve formations: Lessons from neurotrophins. *Microsc Res Tech*, 2010. 73(5): p. 513-29.

253. Hanani, M., Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005. 48(3): p. 457-76.
254. Kandel ER, S.J., Jessel TM, Principles of Neural Science. Muscle Nerve. 2000, NewYork McGraw-Hill Medical.
255. Roosterman, D., et al., Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev*, 2006. 86(4): p. 1309-79.
256. Simone, D.A., et al., Intradermal injection of capsaicin in humans produces degeneration and subsequent reinnervation of epidermal nerve fibers: correlation with sensory function. *J Neurosci*, 1998. 18(21): p. 8947-59.
257. Moller, K., et al., Pituitary adenylate cyclase activating peptide is a sensory neuropeptide: immunocytochemical and immunochemical evidence. *Neuroscience*, 1993. 57(3): p. 725-32.
258. Bloom, S.R. and J.M. Polak, Somatostatin. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1987. 295(6593): p. 288-90.
259. Hokfelt, T., T. Bartfai, and F. Bloom, Neuropeptides: opportunities for drug discovery. *Lancet Neurol*, 2003. 2(8): p. 463-72.
260. Lundy, F.T. and G.J. Linden, Neuropeptides and Neurogenic Mechanisms in Oral and Periodontal Inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2004. 15(2): p. 82-98.
261. Scholzen, T.E. and T.A. Luger, Neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme -- key enzymes terminating the action of neuroendocrine mediators. *Exp Dermatol*, 2004. 13 Suppl 4: p. 22-6.
262. Johnson, K.O., The roles and functions of cutaneous mechanoreceptors. *Curr Opin Neurobiol*, 2001. 11(4): p. 455-61.
263. Goodwin, A.W. and H.E. Wheat, Sensory signals in neural populations underlying tactile perception and manipulation. *Annu Rev Neurosci*, 2004. 27: p. 53-77.
264. Pasterkamp, E., Mechanoreceptors in the glabrous skin of the human hand. *Arch Physiol Biochem*, 1999. 107(4): p. 338-41.
265. Johnson, K.O., T. Yoshioka, and F. Vega-Bermudez, Tactile functions of mechanoreceptive afferents innervating the hand. *J Clin Neurophysiol*, 2000. 17(6): p. 539-58.
266. Noback, C.R., The human nervous system : structure and function. 6th ed. 2005, Totowa, N.J.: Humana Press. xiii, 477 p.

267. Moll, I., Merkel cell distribution in human hair follicles of the fetal and adult scalp. *Cell Tissue Res*, 1994. 277(1): p. 131-8.
268. Halata, Z., M. Grim, and K.I. Baumann, [The Merkel cell: morphology, developmental origin, function]. *Cas Lek Cesk*, 2003. 142(1): p. 4-9.
269. Fradette, J., et al., Localization of Merkel cells at hairless and hairy human skin sites using keratin 18. *Biochem Cell Biol*, 1995. 73(9-10): p. 635-9.
270. Tachibana, T. and T. Nawa, Recent progress in studies on Merkel cell biology. *Anat Sci Int*, 2002. 77(1): p. 26-33.
271. Munger, B.L. and C. Ide, The structure and function of cutaneous sensory receptors. *Arch Histol Cytol*, 1988. 51(1): p. 1-34.
272. Woodbury, C.J., A.M. Ritter, and H.R. Koerber, Central anatomy of individual rapidly adapting low-threshold mechanoreceptors innervating the "hairy" skin of newborn mice: early maturation of hair follicle afferents. *J Comp Neurol*, 2001. 436(3): p. 304-23.
273. Brown, A.G. and A. Iggo, A quantitative study of cutaneous receptors and afferent fibres in the cat and rabbit. *J Physiol*, 1967. 193(3): p. 707-33.
274. Olausson, H., et al., The neurophysiology of unmyelinated tactile afferents. *Neurosci Biobehav Rev*, 2010. 34(2): p. 185-91.
275. Spray, D.C., Cutaneous temperature receptors. *Annu Rev Physiol*, 1986. 48: p. 625-38.
276. Darian-Smith, I. and K.O. Johnson, Thermal sensibility and thermoreceptors. *J Invest Dermatol*, 1977. 69(1): p. 146-53.
277. Greenspan, J.D., Nociceptors and the peripheral nervous system's role in pain. *J Hand Ther*, 1997. 10(2): p. 78-85.
278. Snider, W.D. and S.B. McMahon, Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron*, 1998. 20(4): p. 629-32.
279. Lawson, S.N., Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Delta- or Aalpha/beta-fibres. *Exp Physiol*, 2002. 87(2): p. 239-44.
280. Byrne, J.H. and J.L. Roberts, From molecules to networks : an introduction to cellular and molecular neuroscience. 2nd ed. 2009, Amsterdam ; Boston: Academic Press/Elsevier. x, 643 p.
281. Salzer, J.L., P.J. Brophy, and E. Peles, Molecular domains of myelinated axons in the peripheral nervous system. *Glia*, 2008. 56(14): p. 1532-40.

282. Bolin, L.M. and E.M. Shooter, Characterization of a Schwann cell neurite-promoting activity that directs motoneuron axon outgrowth. *J Neurosci Res*, 1994. 37(1): p. 23-35.
283. Dhaka, A., V. Viswanath, and A. Patapoutian, Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci*, 2006. 29: p. 135-61.
284. Caterina, M.J. and D. Julius, The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci*, 2001. 24: p. 487-517.
285. McKemy, D.D., W.M. Neuhausser, and D. Julius, Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 2002. 416(6876): p. 52-8.
286. Peier, A.M., et al., A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, 2002. 108(5): p. 705-15.
287. Nave, K.A. and B.D. Trapp, Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci*, 2008. 31: p. 535-61.
288. Mudge, A.W., Schwann cells induce morphological transformation of sensory neurones in vitro. *Nature*, 1984. 309(5966): p. 367-9.
289. Shy, M.E., Biology of peripheral inherited neuropathies: Schwann cell axonal interactions. *Adv Exp Med Biol*, 2009. 652: p. 171-81.
290. Morrissey, T.K., N. Kleitman, and R.P. Bunge, Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. *J Neurosci*, 1991. 11(8): p. 2433-42.
291. Murinson, B.B., et al., Degeneration of myelinated efferent fibers prompts mitosis in Remak Schwann cells of uninjured C-fiber afferents. *J Neurosci*, 2005. 25(5): p. 1179-87.
292. Ebenezer, G.J., et al., Denervation of skin in neuropathies: the sequence of axonal and Schwann cell changes in skin biopsies. *Brain*, 2007. 130(Pt 10): p. 2703-14.
293. Voas, M.G., et al., Schwann cells inhibit ectopic clustering of axonal sodium channels. *J Neurosci*, 2009. 29(46): p. 14408-14.
294. Verkhratsky, A.N. and A. Butt, *Glial neurobiology : a textbook*. 2007, Chichester, England a; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. xiv, 215 p.
295. Wade, A., P. Jacobs, and A.J. Morton, Atrophy and degeneration in sciatic nerve of presymptomatic mice carrying the Huntington's disease mutation. *Brain Res*, 2008. 1188: p. 61-8.

296. Ey, B., et al., Visualization of degenerating axons in a dysmyelinating mouse mutant with axonal loss. *Mol Cell Neurosci*, 2007. 35(1): p. 153-60.
297. Son, Y.J., J.T. Trachtenberg, and W.J. Thompson, Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends Neurosci*, 1996. 19(7): p. 280-5.
298. Kopp, D.M., J.T. Trachtenberg, and W.J. Thompson, Glial growth factor rescues Schwann cells of mechanoreceptors from denervation-induced apoptosis. *J Neurosci*, 1997. 17(17): p. 6697-706.
299. Takahashi-Iwanaga, H., Calcium signaling in terminal Schwann cells associated with lanceolate sensory endings in rat vibrissae. *Ital J Anat Embryol*, 2005. 110(2 Suppl 1): p. 19-24.
300. Tschachler, E., et al., Sheet preparations expose the dermal nerve plexus of human skin and render the dermal nerve end organ accessible to extensive analysis. *J Invest Dermatol*, 2004. 122(1): p. 177-82.
301. Bunge, M.B., A.K. Williams, and P.M. Wood, Neuron-Schwann cell interaction in basal lamina formation. *Dev Biol*, 1982. 92(2): p. 449-60.
302. Podratz, J.L., E. Rodriguez, and A.J. Windebank, Role of the extracellular matrix in myelination of peripheral nerve. *Glia*, 2001. 35(1): p. 35-40.
303. Uziyel, Y., S. Hall, and J. Cohen, Influence of laminin-2 on Schwann cell-axon interactions. *Glia*, 2000. 32(2): p. 109-21.
304. Eldridge, C.F., M.B. Bunge, and R.P. Bunge, Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro: II. Control of myelin formation by basal lamina. *J Neurosci*, 1989. 9(2): p. 625-38.
305. Rasi, K., et al., Lack of collagen XV impairs peripheral nerve maturation and, when combined with laminin-411 deficiency, leads to basement membrane abnormalities and sensorimotor dysfunction. *J Neurosci*, 2010. 30(43): p. 14490-501.
306. Cornbrooks, C.J., et al., In vivo and in vitro observations on laminin production by Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. 80(12): p. 3850-4.
307. Carey, D.J., et al., Biosynthesis of type IV collagen by cultured rat Schwann cells. *J Cell Biol*, 1983. 97(2): p. 473-9.
308. Dziadek, M., et al., Basement membrane proteins produced by Schwann cells and in neurofibromatosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1986. 486: p. 248-59.
309. Court, F.A., L. Wrabetz, and M.L. Feltri, Basal lamina: Schwann cells wrap to the rhythm of space-time. *Curr Opin Neurobiol*, 2006. 16(5): p. 501-7.

310. Chernousov, M.A., et al., Alpha7beta1 integrin is a receptor for laminin-2 on Schwann cells. *Glia*, 2007. 55(11): p. 1134-44.
311. Previtali, S.C., et al., Expression of laminin receptors in schwann cell differentiation: evidence for distinct roles. *J Neurosci*, 2003. 23(13): p. 5520-30.
312. Lefcort, F., et al., Regulation of expression of fibronectin and its receptor, alpha 5 beta 1, during development and regeneration of peripheral nerve. *Development*, 1992. 116(3): p. 767-82.
313. Hu, Q., E.J. Moerman, and S. Goldstein, Altered expression and regulation of the alpha 5beta1 integrin-fibronectin receptor lead to reduced amounts of functional alpha5beta1 heterodimer on the plasma membrane of senescent human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res*, 1996. 224(2): p. 251-63.
314. Milner, R., et al., Division of labor of Schwann cell integrins during migration on peripheral nerve extracellular matrix ligands. *Dev Biol*, 1997. 185(2): p. 215-28.
315. Chernousov, M.A. and D.J. Carey, alphaVbeta8 integrin is a Schwann cell receptor for fibrin. *Exp Cell Res*, 2003. 291(2): p. 514-24.
316. Chernousov, M.A., et al., Glypican-1 and alpha4(V) collagen are required for Schwann cell myelination. *J Neurosci*, 2006. 26(2): p. 508-17.
317. Friede, R.L. and R. Bischhausen, How are sheath dimensions affected by axon caliber and internode length? *Brain Res*, 1982. 235(2): p. 335-50.
318. Friede, R.L., Relation between myelin sheath thickness, internode geometry, and sheath resistance. *Exp Neurol*, 1986. 92(1): p. 234-47.
319. Friede, R.L. and W. Beuche, A new approach toward analyzing peripheral nerve fiber populations. I. Variance in sheath thickness corresponds to different geometric proportions of the internodes. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1985. 44(1): p. 60-72.
320. Lemke, G. and R. Axel, Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin. *Cell*, 1985. 40(3): p. 501-8.
321. Heath, J.W., et al., Distribution of P0 protein and the myelin-associated glycoprotein in peripheral nerves from Trembler mice. *J Neurocytol*, 1991. 20(6): p. 439-49.
322. Giese, K.P., et al., Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell*, 1992. 71(4): p. 565-76.

323. Yin, X., et al., Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci*, 1998. 18(6): p. 1953-62.
324. Garbay, B., et al., Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol*, 2000. 61(3): p. 267-304.
325. Haney, C.A., et al., Heterophilic binding of L1 on unmyelinated sensory axons mediates Schwann cell adhesion and is required for axonal survival. *J Cell Biol*, 1999. 146(5): p. 1173-84.
326. Martini, R. and M. Schachner, Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J Cell Biol*, 1988. 106(5): p. 1735-46.
327. Wood, P.M., M. Schachner, and R.P. Bunge, Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. *J Neurosci*, 1990. 10(11): p. 3635-45.
328. Spiegel, I., et al., A central role for Necl4 (SynCAM4) in Schwann cell-axon interaction and myelination. *Nat Neurosci*, 2007. 10(7): p. 861-9.
329. Taveggia, C., et al., Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron*, 2005. 47(5): p. 681-94.
330. Michailov, G.V., et al., Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science*, 2004. 304(5671): p. 700-3.
331. Kao, S.C., et al., Calcineurin/NFAT signaling is required for neuregulin-regulated Schwann cell differentiation. *Science*, 2009. 323(5914): p. 651-4.
332. He, Y., et al., Yy1 as a molecular link between neuregulin and transcriptional modulation of peripheral myelination. *Nat Neurosci*, 2010. 13(12): p. 1472-80.
333. Topilko, P., et al., Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature*, 1994. 371(6500): p. 796-9.
334. Jaegle, M., et al., The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development. *Genes Dev*, 2003. 17(11): p. 1380-91.
335. Grove, M., et al., FAK is required for axonal sorting by Schwann cells. *J Cell Biol*, 2007. 176(3): p. 277-82.
336. Benninger, Y., et al., Essential and distinct roles for cdc42 and rac1 in the regulation of Schwann cell biology during peripheral nervous system development. *J Cell Biol*, 2007. 177(6): p. 1051-61.
337. Novak, N., et al., N-WASP is required for membrane wrapping and myelination by Schwann cells. *J Cell Biol*, 2011. 192(2): p. 243-50.

338. Jin, F., et al., N-WASp is required for Schwann cell cytoskeletal dynamics, normal myelin gene expression and peripheral nerve myelination. *Development*, 2011. 138(7): p. 1329-37.
339. Chan, J.R., et al., The polarity protein Par-3 directly interacts with p75NTR to regulate myelination. *Science*, 2006. 314(5800): p. 832-6.
340. Bolis, A., et al., Dlg1, Sec8, and Mtmr2 regulate membrane homeostasis in Schwann cell myelination. *J Neurosci*, 2009. 29(27): p. 8858-70.
341. Amacher, S.L. and C.B. Kimmel, Promoting notochord fate and repressing muscle development in zebrafish axial mesoderm. *Development*, 1998. 125(8): p. 1397-406.
342. Fekany, K., et al., The zebrafish bozozok locus encodes Dharma, a homeodomain protein essential for induction of gastrula organizer and dorsoanterior embryonic structures. *Development*, 1999. 126(7): p. 1427-38.
343. Solnica-Krezel, L., et al., Mutations affecting cell fates and cellular rearrangements during gastrulation in zebrafish. *Development*, 1996. 123: p. 67-80.
344. Talbot, W.S., et al., A homeobox gene essential for zebrafish notochord development. *Nature*, 1995. 378(6553): p. 150-7.
345. Sanes, D.H., T.A. Reh, and W.A. Harris, *Development of the nervous system*. 2nd ed. 2006, Amsterdam ; Boston: Elsevier. xiii, 373 p.
346. Delaune, E., P. Lemaire, and L. Kodjabachian, Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development*, 2005. 132(2): p. 299-310.
347. Kuroda, H., O. Wessely, and E.M. De Robertis, Neural induction in *Xenopus*: requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin, beta-Catenin, and Cerberus. *PLoS Biol*, 2004. 2(5): p. E92.
348. Streit, A., et al., Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature*, 2000. 406(6791): p. 74-8.
349. Wilson, S.I., et al., An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. *Curr Biol*, 2000. 10(8): p. 421-9.
350. Tam, P.P. and K.A. Steiner, Anterior patterning by synergistic activity of the early gastrula organizer and the anterior germ layer tissues of the mouse embryo. *Development*, 1999. 126(22): p. 5171-9.

351. Glavic, A., et al., Interplay between Notch signaling and the homeoprotein Xiro1 is required for neural crest induction in *Xenopus* embryos. *Development*, 2004. 131(2): p. 347-59.
352. Marchant, L., et al., The inductive properties of mesoderm suggest that the neural crest cells are specified by a BMP gradient. *Dev Biol*, 1998. 198(2): p. 319-29.
353. Mayor, R., R. Morgan, and M.G. Sargent, Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development*, 1995. 121(3): p. 767-77.
354. Neave, B., N. Holder, and R. Patient, A graded response to BMP-4 spatially coordinates patterning of the mesoderm and ectoderm in the zebrafish. *Mech Dev*, 1997. 62(2): p. 183-95.
355. Wilson, P.A., et al., Concentration-dependent patterning of the *Xenopus* ectoderm by BMP4 and its signal transducer Smad1. *Development*, 1997. 124(16): p. 3177-84.
356. Wilson, P.A. and A. Hemmati-Brivanlou, Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature*, 1995. 376(6538): p. 331-3.
357. Mizuseki, K., et al., *Xenopus* Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. *Development*, 1998. 125(4): p. 579-87.
358. Bainter, J.J., A. Boos, and K.L. Kroll, Neural induction takes a transcriptional twist. *Dev Dyn*, 2001. 222(3): p. 315-27.
359. Launay, C., et al., A truncated FGF receptor blocks neural induction by endogenous *Xenopus* inducers. *Development*, 1996. 122(3): p. 869-80.
360. Pera, E.M., et al., Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes Dev*, 2003. 17(24): p. 3023-8.
361. Lobjois, V., et al., Specific regulation of cyclins D1 and D2 by FGF and Shh signaling coordinates cell cycle progression, patterning, and differentiation during early steps of spinal cord development. *Dev Biol*, 2004. 273(2): p. 195-209.
362. Baker, J.C., R.S. Beddington, and R.M. Harland, Wnt signaling in *Xenopus* embryos inhibits bmp4 expression and activates neural development. *Genes Dev*, 1999. 13(23): p. 3149-59.
363. Wilson, S.I., et al., The status of Wnt signalling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo. *Nature*, 2001. 411(6835): p. 325-30.
364. Wilson, S.I. and T. Edlund, Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat Neurosci*, 2001. 4 Suppl: p. 1161-8.

365. Bang, A.G., et al., Expression of Pax-3 is initiated in the early neural plate by posteriorizing signals produced by the organizer and by posterior non-axial mesoderm. *Development*, 1997. 124(10): p. 2075-85.
366. Bonstein, L., S. Elias, and D. Frank, Paraxial-fated mesoderm is required for neural crest induction in *Xenopus* embryos. *Dev Biol*, 1998. 193(2): p. 156-68.
367. Mancilla, A. and R. Mayor, Neural crest formation in *Xenopus laevis*: mechanisms of Xslug induction. *Dev Biol*, 1996. 177(2): p. 580-9.
368. Moury, J.D. and A.G. Jacobson, The origins of neural crest cells in the axolotl. *Dev Biol*, 1990. 141(2): p. 243-53.
369. Selleck, M.A. and M. Bronner-Fraser, Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Development*, 1995. 121(2): p. 525-38.
370. Woo, K. and S.E. Fraser, Specification of the hindbrain fate in the zebrafish. *Dev Biol*, 1998. 197(2): p. 283-96.
371. Cheung, M., et al., The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Dev Cell*, 2005. 8(2): p. 179-92.
372. Stewart, R.A., et al., Zebrafish *foxd3* is selectively required for neural crest specification, migration and survival. *Dev Biol*, 2006. 292(1): p. 174-88.
373. Liu, Y. and Q. Ma, Generation of somatic sensory neuron diversity and implications on sensory coding. *Curr Opin Neurobiol*, 2011. 21(1): p. 52-60.
374. Ma, Q., et al., Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev*, 1999. 13(13): p. 1717-28.
375. Kramer, I., et al., A role for Runx transcription factor signaling in dorsal root ganglion sensory neuron diversification. *Neuron*, 2006. 49(3): p. 379-93.
376. Chen, C.L., et al., Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. *Neuron*, 2006. 49(3): p. 365-77.
377. Chen, A.I., J.C. de Nooij, and T.M. Jessell, Graded activity of transcription factor Runx3 specifies the laminar termination pattern of sensory axons in the developing spinal cord. *Neuron*, 2006. 49(3): p. 395-408.
378. Fang, X., et al., *trkA* is expressed in nociceptive neurons and influences electrophysiological properties via Nav1.8 expression in rapidly conducting nociceptors. *J Neurosci*, 2005. 25(19): p. 4868-78.

379. Southard-Smith, E.M., L. Kos, and W.J. Pavan, Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat Genet*, 1998. 18(1): p. 60-4.
380. Sonnenberg-Riethmacher, E., et al., Development and degeneration of dorsal root ganglia in the absence of the HMG-domain transcription factor Sox10. *Mech Dev*, 2001. 109(2): p. 253-65.
381. Paratore, C., et al., Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Development*, 2001. 128(20): p. 3949-61.
382. Kuhlbrodt, K., et al., Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci*, 1998. 18(1): p. 237-50.
383. Britsch, S., et al., The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev*, 2001. 15(1): p. 66-78.
384. Woodhoo, A. and L. Sommer, Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. *Glia*, 2008. 56(14): p. 1481-90.
385. Shah, N.M. and D.J. Anderson, Integration of multiple instructive cues by neural crest stem cells reveals cell-intrinsic biases in relative growth factor responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(21): p. 11369-74.
386. Garratt, A.N., S. Britsch, and C. Birchmeier, Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays*, 2000. 22(11): p. 987-96.
387. Jessen, K.R., et al., The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. *Neuron*, 1994. 12(3): p. 509-27.
388. Dong, Z., et al., Schwann cell development in embryonic mouse nerves. *J Neurosci Res*, 1999. 56(4): p. 334-48.
389. Dong, Z., et al., Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron*, 1995. 15(3): p. 585-96.
390. Woodhoo, A., et al., Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nat Neurosci*, 2009. 12(7): p. 839-47.
391. Morrison, S.J., Neuronal potential and lineage determination by neural stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, 2001. 13(6): p. 666-72.
392. Wakamatsu, Y., T.M. Maynard, and J.A. Weston, Fate determination of neural crest cells by NOTCH-mediated lateral inhibition and asymmetrical cell division during gangliogenesis. *Development*, 2000. 127(13): p. 2811-21.

393. Kubu, C.J., et al., Developmental changes in Notch1 and numb expression mediated by local cell-cell interactions underlie progressively increasing delta sensitivity in neural crest stem cells. *Dev Biol*, 2002. 244(1): p. 199-214.
394. Dickson, B.J., Molecular mechanisms of axon guidance. *Science*, 2002. 298(5600): p. 1959-64.
395. Yuan, X.B., et al., Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nat Cell Biol*, 2003. 5(1): p. 38-45.
396. Williamson, T., et al., Microtubule reorganization is obligatory for growth cone turning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(26): p. 15221-6.
397. Brown, A., T. Slaughter, and M.M. Black, Newly assembled microtubules are concentrated in the proximal and distal regions of growing axons. *J Cell Biol*, 1992. 119(4): p. 867-82.
398. Tessier-Lavigne, M. and C.S. Goodman, The molecular biology of axon guidance. *Science*, 1996. 274(5290): p. 1123-33.
399. Terenghi, G., Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat*, 1999. 194 (Pt 1): p. 1-14.
400. Perry, V.H., M.C. Brown, and S. Gordon, The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. *J Exp Med*, 1987. 165(4): p. 1218-23.
401. Bendszus, M. and G. Stoll, Caught in the act: in vivo mapping of macrophage infiltration in nerve injury by magnetic resonance imaging. *J Neurosci*, 2003. 23(34): p. 10892-6.
402. Salzer, J.L. and R.P. Bunge, Studies of Schwann cell proliferation. I. An analysis in tissue culture of proliferation during development, Wallerian degeneration, and direct injury. *J Cell Biol*, 1980. 84(3): p. 739-52.
403. Stoll, G. and H.W. Muller, Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol*, 1999. 9(2): p. 313-25.
404. Salzer, J.L., et al., Studies of Schwann cell proliferation. II. Characterization of the stimulation and specificity of the response to a neurite membrane fraction. *J Cell Biol*, 1980. 84(3): p. 753-66.
405. Beuche, W. and R.L. Friede, The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J Neurocytol*, 1984. 13(5): p. 767-96.

406. Sendtner, M., K.A. Stockli, and H. Thoenen, Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. *J Cell Biol*, 1992. 118(1): p. 139-48.
407. Heumann, R., et al., Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol*, 1987. 104(6): p. 1623-31.
408. Hall, S.M., The effect of inhibiting Schwann cell mitosis on the re-innervation of acellular autografts in the peripheral nervous system of the mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1986. 12(4): p. 401-14.
409. Acheson, A., et al., Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF. *Neuron*, 1991. 7(2): p. 265-75.
410. Reynolds, M.L. and C.J. Woolf, Reciprocal Schwann cell-axon interactions. *Curr Opin Neurobiol*, 1993. 3(5): p. 683-93.
411. Son, Y.J. and W.J. Thompson, Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron*, 1995. 14(1): p. 125-32.
412. Nguyen, Q.T., J.R. Sanes, and J.W. Lichtman, Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nat Neurosci*, 2002. 5(9): p. 861-7.
413. Romero, M.I., et al., Functional regeneration of chronically injured sensory afferents into adult spinal cord after neurotrophin gene therapy. *J Neurosci*, 2001. 21(21): p. 8408-16.
414. Maki, Y., Specificity in peripheral nerve regeneration: a discussion of the issues and the research. *J Orthop Sci*, 2002. 7(5): p. 594-600.
415. Kolosova, L.I., et al., Activity of foot skin mechanoreceptors and afferent nerve fibres in the adult rat sciatic nerve are altered after central axotomy of sensory neurons. *Neuroscience*, 2000. 96(1): p. 215-9.
416. Koerber, H.R., et al., Ultrastructural analysis of ectopic synaptic boutons arising from peripherally regenerated primary afferent fibers. *J Neurophysiol*, 1999. 81(4): p. 1636-44.
417. Dobkin, B.H., Neurobiology of rehabilitation. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. 1038: p. 148-70.
418. Reyes, O., I. Sosa, and D.P. Kuffler, Promoting neurological recovery following a traumatic peripheral nerve injury. *P R Health Sci J*, 2005. 24(3): p. 215-23.
419. Navarro, X., et al., Immunohistochemical study of skin reinnervation by regenerative axons. *J Comp Neurol*, 1997. 380(2): p. 164-74.

420. Hermanson, A., C.E. Jonsson, and U. Lindblom, Sensibility after burn injury. *Clin Physiol*, 1986. 6(6): p. 507-21.
421. Ward, R.S. and R.P. Tuckett, Quantitative threshold changes in cutaneous sensation of patients with burns. *J Burn Care Rehabil*, 1991. 12(6): p. 569-75.
422. Ward RS, S.J., Schnebly WA, Hayes-Lundy C, Reddy R., Sensory loss over grafted areas in patients with burns. *J Burn Care Rehabil*, 1989. 10(6): p. 536-8.
423. Malenfant, A., et al., Prevalence and characteristics of chronic sensory problems in burn patients. *Pain*, 1996. 67(2-3): p. 493-500.
424. Malenfant, A., et al., Tactile, thermal and pain sensibility in burned patients with and without chronic pain and paresthesia problems. *Pain*, 1998. 77(3): p. 241-51.
425. Altun, V., et al., Nerve outgrowth and neuropeptide expression during the remodeling of human burn wound scars. A 7-month follow-up study of 22 patients. *Burns*, 2001. 27(7): p. 717-22.
426. Stella, M., et al., Sensory endings in skin grafts and scars after extensive burns. *Burns*, 1994. 20(6): p. 491-5.
427. Ward, R.S., et al., Substance P axons and sensory threshold increase in burn-graft human skin. *J Surg Res*, 2004. 118(2): p. 154-60.
428. Nedelec, B., et al., Sensory perception and neuroanatomical structures in normal and grafted skin of burn survivors. *Burns*, 2005. 31(7): p. 817-30.
429. Coderre, T.J. and R. Melzack, Increased pain sensitivity following heat injury involves a central mechanism. *Behav Brain Res*, 1985. 15(3): p. 259-62.
430. Coderre, T.J. and R. Melzack, Cutaneous hyperalgesia: contributions of the peripheral and central nervous systems to the increase in pain sensitivity after injury. *Brain Res*, 1987. 404(1-2): p. 95-106.
431. Sang, C.N., et al., Capsaicin-evoked mechanical allodynia and hyperalgesia cross nerve territories. Evidence for a central mechanism. *Anesthesiology*, 1996. 85(3): p. 491-6.
432. Mukoyama, Y.S., et al., Peripheral nerve-derived VEGF promotes arterial differentiation via neuropilin 1-mediated positive feedback. *Development*, 2005. 132(5): p. 941-52.
433. Mukoyama, Y.S., et al., Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell*, 2002. 109(6): p. 693-705.

434. Martin, P. and J. Lewis, Origins of the neurovascular bundle: interactions between developing nerves and blood vessels in embryonic chick skin. *Int J Dev Biol*, 1989. 33(3): p. 379-87.
435. Bates, D., et al., Neurovascular congruence results from a shared patterning mechanism that utilizes Semaphorin3A and Neuropilin-1. *Dev Biol*, 2003. 255(1): p. 77-98.
436. Higgins, J.C. and R.A. Eady, Human dermal microvasculature: I. Its segmental differentiation. Light and electron microscopic study. *Br J Dermatol*, 1981. 104(2): p. 117-29.
437. Breier, G., M. Clauss, and W. Risau, Coordinate expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1) and its ligand suggests a paracrine regulation of murine vascular development. *Dev Dyn*, 1995. 204(3): p. 228-39.
438. Dumont, D.J., et al., Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn*, 1995. 203(1): p. 80-92.
439. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 2003. 9(6): p. 669-76.
440. Houck, K.A., et al., The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*, 1991. 5(12): p. 1806-14.
441. Tischer, E., et al., The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*, 1991. 266(18): p. 11947-54.
442. Lei, J., A. Jiang, and D. Pei, Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth factor: VEGF183. *Biochim Biophys Acta*, 1998. 1443(3): p. 400-6.
443. Ruhrberg, C., Growing and shaping the vascular tree: multiple roles for VEGF. *Bioessays*, 2003. 25(11): p. 1052-60.
444. Wilgus, T.A., et al., Novel function for vascular endothelial growth factor receptor-1 on epidermal keratinocytes. *Am J Pathol*, 2005. 167(5): p. 1257-66.
445. Frank, S., et al., Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*, 1995. 270(21): p. 12607-13.
446. Trompezinski, S., et al., Comparative expression of vascular endothelial growth factor family members, VEGF-B, -C and -D, by normal human keratinocytes and fibroblasts. *Exp Dermatol*, 2004. 13(2): p. 98-105.

447. Detmar, M., et al., Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. *J Invest Dermatol*, 1998. 111(1): p. 1-6.
448. Detmar, M., The role of VEGF and thrombospondins in skin angiogenesis. *J Dermatol Sci*, 2000. 24 Suppl 1: p. S78-84.
449. Kutcher, M.E., M. Klagsbrun, and R. Mamluk, VEGF is required for the maintenance of dorsal root ganglia blood vessels but not neurons during development. *Faseb J*, 2004. 18(15): p. 1952-4.
450. Dhondt, J., et al., Neuronal FLT1 receptor and its selective ligand VEGF-B protect against retrograde degeneration of sensory neurons. *FASEB J*, 2011. 25(5): p. 1461-73.
451. Olsson, A.K., et al., VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(5): p. 359-71.
452. Staton, C., et al., Neuropilins in physiological and pathological angiogenesis. *J Pathol*, 2007. 212(3): p. 237-48.
453. Dontchev, V.D. and P.C. Letourneau, Nerve growth factor and semaphorin 3A signaling pathways interact in regulating sensory neuronal growth cone motility. *J Neurosci*, 2002. 22(15): p. 6659-69.
454. Chen, H., et al., Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron*, 1997. 19(3): p. 547-59.
455. Haupt, C., et al., Semaphorin 3A-Neuropilin-1 signaling regulates peripheral axon fasciculation and pathfinding but not developmental cell death patterns. *Eur J Neurosci*, 2010. 31(7): p. 1164-72.
456. Yuan, L., et al., Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development*, 2002. 129(20): p. 4797-806.
457. Fuh, G., K.C. Garcia, and A.M. de Vos, The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J Biol Chem*, 2000. 275(35): p. 26690-5.
458. Soker, S., et al., Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 1998. 92(6): p. 735-45.
459. Miao, H.Q., et al., Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165. *J Cell Biol*, 1999. 146(1): p. 233-42.

460. Autiero, M., et al., Role of neural guidance signals in blood vessel navigation. *Cardiovasc Res*, 2005. 65(3): p. 629-38.
461. Klagsbrun, M. and A. Eichmann, A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005. 16(4-5): p. 535-48.
462. Acevedo, L.M., et al., Semaphorin 3A suppresses VEGF-mediated angiogenesis yet acts as a vascular permeability factor. *Blood*, 2008. 111(5): p. 2674-80.
463. Serini, G., et al., Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature*, 2003. 424(6947): p. 391-7.
464. Childs, S., et al., Patterning of angiogenesis in the zebrafish embryo. *Development*, 2002. 129(4): p. 973-82.
465. Gitler, A.D., M.M. Lu, and J.A. Epstein, PlexinD1 and semaphorin signaling are required in endothelial cells for cardiovascular development. *Dev Cell*, 2004. 7(1): p. 107-16.
466. Gu, C., et al., Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins. *Science*, 2005. 307(5707): p. 265-8.
467. Conrotto, P., et al., Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1. *Blood*, 2005. 105(11): p. 4321-9.
468. Basile, J.R., et al., Class IV semaphorins promote angiogenesis by stimulating Rho-initiated pathways through plexin-B. *Cancer Res*, 2004. 64(15): p. 5212-24.
469. Luo, Y., D. Raible, and J.A. Raper, Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell*, 1993. 75(2): p. 217-27.
470. Erskine, L., et al., VEGF Signaling through Neuropilin 1 Guides Commissural Axon Crossing at the Optic Chiasm. *Neuron*, 2011. 70(5): p. 951-65.
471. Schwarz, Q., et al., Neuropilin-mediated neural crest cell guidance is essential to organise sensory neurons into segmented dorsal root ganglia. *Development*, 2009. 136(11): p. 1785-9.
472. Shepherd, I., et al., The distribution of collapsin-1 mRNA in the developing chick nervous system. *Dev Biol*, 1996. 173(1): p. 185-99.
473. Fukamachi, S., et al., Modulation of semaphorin 3A expression by calcium concentration and histamine in human keratinocytes and fibroblasts. *J Dermatol Sci*, 2011. 61(2): p. 118-23.
474. Taniguchi, M., et al., Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron*, 1997. 19(3): p. 519-30.

475. Vieira, J.M., Q. Schwarz, and C. Ruhrberg, Selective requirements for NRP1 ligands during neurovascular patterning. *Development*, 2007. 134(10): p. 1833-43.
476. Miao, H., et al., Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway. *Nat Cell Biol*, 2001. 3(5): p. 527-30.
477. Murai, K.K. and E.B. Pasquale, New exchanges in eph-dependent growth cone dynamics. *Neuron*, 2005. 46(2): p. 161-3.
478. Holder, N. and R. Klein, Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development*, 1999. 126(10): p. 2033-44.
479. Klein, R., Bidirectional signals establish boundaries. *Curr Biol*, 1999. 9(18): p. R691-4.
480. Zhou, R., Regulation of topographic projection by the Eph family receptor Bsk (EphA5) and its ligands. *Cell Tissue Res*, 1997. 290(2): p. 251-9.
481. Ogawa, K., et al., The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization. *Oncogene*, 2000. 19(52): p. 6043-52.
482. Shima, D.T. and C. Mailhos, Vascular developmental biology: getting nervous. *Curr Opin Genet Dev*, 2000. 10(5): p. 536-42.
483. Shin, D., et al., Expression of ephrinB2 identifies a stable genetic difference between arterial and venous vascular smooth muscle as well as endothelial cells, and marks subsets of microvessels at sites of adult neovascularization. *Dev Biol*, 2001. 230(2): p. 139-50.
484. Adams, R.H., et al., Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev*, 1999. 13(3): p. 295-306.
485. Fuller, T., et al., Forward EphB4 signaling in endothelial cells controls cellular repulsion and segregation from ephrinB2 positive cells. *J Cell Sci*, 2003. 116(Pt 12): p. 2461-70.
486. Ishii, N., et al., UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron*, 1992. 9(5): p. 873-81.
487. Serafini, T., et al., The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell*, 1994. 78(3): p. 409-24.
488. Leconte, E.L.a.L., Netrins and their receptors in normal and pathological angiogenesis, in *Adhesion and guidance receptors in angiogenesis*, J. Gavard, Editor. 2010: Sisène. p. 119-138.

489. Tessier-Lavigne, M., et al., Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature*, 1988. 336(6201): p. 775-8.
490. Lu, X., et al., The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature*, 2004. 432(7014): p. 179-86.
491. Lejmi, E., et al., Netrin-4 inhibits angiogenesis via binding to neogenin and recruitment of Unc5B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(34): p. 12491-6.
492. Park, K.W., et al., The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(46): p. 16210-5.
493. Wilson, B.D., et al., Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis. *Science*, 2006. 313(5787): p. 640-4.
494. Nguyen, A. and H. Cai, Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC-dependent ERK1/2-eNOS feed-forward mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(17): p. 6530-5.
495. Larrieu-Lahargue, F., et al., Netrin-4 induces lymphangiogenesis in vivo. *Blood*, 2010. 115(26): p. 5418-26.
496. Larrieu-Lahargue, F., et al., Netrin-4 activates endothelial integrin $\alpha_6\beta_1$. *Circ Res*, 2011. 109(7): p. 770-4.
497. Berg, D.K., New neuronal growth factors. *Annu Rev Neurosci*, 1984. 7: p. 149-70.
498. Barbacid, M., Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 1995. 7(2): p. 148-55.
499. Stephens, R.M., et al., Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron*, 1994. 12(3): p. 691-705.
500. Barker, P.A., et al., Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J Biol Chem*, 1993. 268(20): p. 15150-7.
501. Clary, D.O. and L.F. Reichardt, An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(23): p. 11133-7.
502. Tacconelli, A., et al., TrkAIII expression in the thymus. *J Neuroimmunol*, 2007. 183(1-2): p. 151-61.
503. Tacconelli, A., et al., TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell*, 2004. 6(4): p. 347-60.

504. Tacconelli, A., et al., Alternative TrkAIII splicing: a potential regulated tumor-promoting switch and therapeutic target in neuroblastoma. *Future Oncol*, 2005. 1(5): p. 689-98.
505. Tacconelli, A., et al., TrkAIII. A novel hypoxia-regulated alternative TrkA splice variant of potential physiological and pathological importance. *Cell Cycle*, 2005. 4(1): p. 8-9.
506. Stoilov, P., E. Castren, and S. Stamm, Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 290(3): p. 1054-65.
507. Armanini, M.P., et al., Truncated and catalytic isoforms of trkB are co-expressed in neurons of rat and mouse CNS. *Eur J Neurosci*, 1995. 7(6): p. 1403-9.
508. Gestwa, G., et al., Differential expression of trkB.T1 and trkB.T2, truncated trkC, and p75(NGFR) in the cochlea prior to hearing function. *J Comp Neurol*, 1999. 414(1): p. 33-49.
509. Light, K.E., Y. Ge, and S.M. Belcher, Early postnatal ethanol exposure selectively decreases BDNF and truncated TrkB-T2 receptor mRNA expression in the rat cerebellum. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001. 93(1): p. 46-55.
510. Rose, C.R., et al., Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature*, 2003. 426(6962): p. 74-8.
511. Ohira, K., et al., A truncated tropomyosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1. *J Neurosci*, 2005. 25(6): p. 1343-53.
512. Shelton, D.L., et al., Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci*, 1995. 15(1 Pt 2): p. 477-91.
513. McGregor, L.M., et al., Molecular cloning of the cDNA for human TrkC (NTRK3), chromosomal assignment, and evidence for a splice variant. *Genomics*, 1994. 22(2): p. 267-72.
514. Meakin, S.O., E.A. Gryz, and J.I. MacDonald, A kinase insert isoform of rat TrkA supports nerve growth factor-dependent cell survival but not neurite outgrowth. *J Neurochem*, 1997. 69(3): p. 954-67.
515. Guiton, M., et al., Naturally occurring tyrosine kinase inserts block high affinity binding of phospholipase C gamma and Shc to TrkC and neurotrophin-3 signaling. *J Biol Chem*, 1995. 270(35): p. 20384-90.

516. Garner, A.S. and T.H. Large, Isoforms of the avian TrkC receptor: a novel kinase insertion dissociates transformation and process outgrowth from survival. *Neuron*, 1994. 13(2): p. 457-72.
517. Esteban, P.F., et al., A kinase-deficient TrkC receptor isoform activates Arf6-Rac1 signaling through the scaffold protein tamalin. *J Cell Biol*, 2006. 173(2): p. 291-9.
518. Hapner, S.J., et al., Neural differentiation promoted by truncated trkC receptors in collaboration with p75(NTR). *Dev Biol*, 1998. 201(1): p. 90-100.
519. Sutter, A., et al., Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J Biol Chem*, 1979. 254(13): p. 5972-82.
520. Meakin, S.O. and E.M. Shooter, The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci*, 1992. 15(9): p. 323-31.
521. Chapman, B.S., A region of the 75 kDa neurotrophin receptor homologous to the death domains of TNFR-I and Fas. *FEBS Lett*, 1995. 374(2): p. 216-20.
522. Atwal, J.K., et al., The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron*, 2000. 27(2): p. 265-77.
523. Chao, M.V., Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*, 2003. 4(4): p. 299-309.
524. Lachance, C., D.J. Belliveau, and P.A. Barker, Blocking nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor on sympathetic neurons transiently reduces trkA activation but does not affect neuronal survival. *Neuroscience*, 1997. 81(3): p. 861-71.
525. Ryden, M., B. Hempstead, and C.F. Ibanez, Differential modulation of neuron survival during development by nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem*, 1997. 272(26): p. 16322-8.
526. Esposito, D., et al., The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem*, 2001. 276(35): p. 32687-95.
527. Curtis, R., et al., Differential role of the low affinity neurotrophin receptor (p75) in retrograde axonal transport of the neurotrophins. *Neuron*, 1995. 14(6): p. 1201-11.
528. Hamburger, V. and R. Levi-Montalcini, Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool*, 1949. 111(3): p. 457-501.
529. Levi-Montalcini, R., The nerve growth factor 35 years later. *Science*, 1987. 237(4819): p. 1154-62.

530. Lindholm, D., et al., Interleukin 1 increases stability and transcription of mRNA encoding nerve growth factor in cultured rat fibroblasts. *J Biol Chem*, 1988. 263(31): p. 16348-51.
531. Lindholm, D., et al., Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature*, 1987. 330(6149): p. 658-9.
532. Murase, K., et al., Human fibroblast cells synthesize and secrete nerve growth factor in culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. 184(1): p. 373-9.
533. Di Marco, E., et al., Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop. *J Biol Chem*, 1993. 268(30): p. 22838-46.
534. Pincelli, C., et al., Expression and function of nerve growth factor and nerve growth factor receptor on cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 1994. 103(1): p. 13-8.
535. Yaar, M., et al., Evidence for nerve growth factor-mediated paracrine effects in human epidermis. *J Cell Biol*, 1991. 115(3): p. 821-8.
536. Di Marco, E., et al., Growth-regulated synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor by human keratinocytes. *J Biol Chem*, 1991. 266(32): p. 21718-22.
537. Ueyama, T., et al., Release of nerve growth factor from cultured aortic smooth-muscle cells. *Blood Vessels*, 1991. 28(6): p. 532-6.
538. Kraemer, R., et al., NGF activates similar intracellular signaling pathways in vascular smooth muscle cells as PDGF-BB but elicits different biological responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(4): p. 1041-50.
539. Tanner, R., et al., The production of nerve growth factor by human bladder smooth muscle cells in vivo and in vitro. *BJU Int*, 2000. 85(9): p. 1115-9.
540. Yu, G. and M. Fahnstock, Differential expression of nerve growth factor transcripts in glia and neurons and their regulation by transforming growth factor-beta1. *Brain Res Mol Brain Res*, 2002. 105(1-2): p. 115-25.
541. Tanaka, A., et al., An autocrine function of nerve growth factor for cell cycle regulation of vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 313(4): p. 1009-14.
542. Cantarella, G., et al., Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *Faseb J*, 2002. 16(10): p. 1307-9.
543. Gibran, N.S., et al., Human dermal microvascular endothelial cells produce nerve growth factor: implications for wound repair. *Shock*, 2003. 19(2): p. 127-30.

544. Davies, A.M., et al., Timing and site of nerve growth factor synthesis in developing skin in relation to innervation and expression of the receptor. *Nature*, 1987. 326(6111): p. 353-8.
545. Crowley, C., et al., Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell*, 1994. 76(6): p. 1001-11.
546. Silos-Santiago, I., et al., Non-TrkA-expressing small DRG neurons are lost in TrkA deficient mice. *J Neurosci*, 1995. 15(9): p. 5929-42.
547. Dethleffsen, K., K. Morl, and M. Meyer, Control of local NGF mRNA synthesis by preformed factors rapidly released from peripheral nerves. *Mol Cell Neurosci*, 2002. 20(3): p. 503-14.
548. Heerssen, H.M. and R.A. Segal, Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction. *Trends Neurosci*, 2002. 25(3): p. 160-5.
549. Ueyama, T., et al., Production of nerve growth factor by cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *J Hypertens*, 1993. 11(10): p. 1061-5.
550. Donovan, M.J., et al., Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol*, 1995. 147(2): p. 309-24.
551. Khan, K.M., D.J. Falcone, and R. Kraemer, Nerve growth factor activation of Erk-1 and Erk-2 induces matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 2002. 277(3): p. 2353-9.
552. Samii, A., J. Unger, and W. Lange, Vascular endothelial growth factor expression in peripheral nerves and dorsal root ganglia in diabetic neuropathy in rats. *Neurosci Lett*, 1999. 262(3): p. 159-62.
553. Calza, L., et al., Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenic and vasoactive factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(7): p. 4160-5.
554. Buchman, V.L. and A.M. Davies, Different neurotrophins are expressed and act in a developmental sequence to promote the survival of embryonic sensory neurons. *Development*, 1993. 118(3): p. 989-1001.
555. Jones, K.R., et al., Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell*, 1994. 76(6): p. 989-99.
556. LeMaster, A.M., et al., Overexpression of brain-derived neurotrophic factor enhances sensory innervation and selectively increases neuron number. *J Neurosci*, 1999. 19(14): p. 5919-31.

557. Donovan, M.J., et al., Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development*, 2000. 127(21): p. 4531-40.
558. Wagner, N., et al., Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1. *Genes Dev*, 2005. 19(21): p. 2631-42.
559. Sun, C.Y., et al., Brain-derived neurotrophic factor inducing angiogenesis through modulation of matrix-degrading proteases. *Chin Med J (Engl)*, 2006. 119(7): p. 589-95.
560. Kermani, P. and B. Hempstead, Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*, 2007. 17(4): p. 140-3.
561. Seo, K., et al., Angiogenesis effects of nerve growth factor (NGF) on rat corneas. *J Vet Sci*, 2001. 2(2): p. 125-30.
562. Raychaudhuri, S.K., et al., Effect of nerve growth factor on endothelial cell biology: proliferation and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *Arch Dermatol Res*, 2001. 293(6): p. 291-5.
563. Emanuelli, C., et al., Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. *Circulation*, 2002. 106(17): p. 2257-62.
564. Turrini, P., et al., Nerve growth factor induces angiogenic activity in a mouse model of hindlimb ischemia. *Neurosci Lett*, 2002. 323(2): p. 109-12.
565. Steinle, J.J. and H.J. Granger, Nerve growth factor regulates human choroidal, but not retinal, endothelial cell migration and proliferation. *Auton Neurosci*, 2003. 108(1-2): p. 57-62.
566. Moser, K.V., et al., Brain capillary endothelial cells proliferate in response to NGF, express NGF receptors and secrete NGF after inflammation. *Brain Res*, 2004. 1017(1-2): p. 53-60.
567. Graiani, G., et al., Nerve growth factor promotes reparative angiogenesis and inhibits endothelial apoptosis in cutaneous wounds of Type 1 diabetic mice. *Diabetologia*, 2004. 47(6): p. 1047-54.
568. Yoo, M.H., et al., Reverse effects of tetraarsenic oxide on the angiogenesis induced by nerve growth factor in the rat cornea. *J Vet Med Sci*, 2004. 66(9): p. 1091-5.
569. Dolle, J.P., et al., Nerve growth factor-induced migration of endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. 315(3): p. 1220-7.

570. Rahbek, U.L., et al., Nerve growth factor activates aorta endothelial cells causing PI3K/Akt- and ERK-dependent migration. *Pflugers Arch*, 2005. 450(5): p. 355-61.
571. Hansen-Algenstaedt, N., et al., Neural driven angiogenesis by overexpression of nerve growth factor. *Histochem Cell Biol*, 2006. 125(6): p. 637-49.
572. Julio-Pieper, M., et al., Effects of nerve growth factor (NGF) on blood vessels area and expression of the angiogenic factors VEGF and TGFbeta1 in the rat ovary. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006. 4: p. 57.
573. Xu, W.P., et al., Promotion of functioning of human periodontal ligament cells and human endothelial cells by nerve growth factor. *J Periodontol*, 2006. 77(5): p. 800-7.
574. Park, M.J., et al., Nerve growth factor induces endothelial cell invasion and cord formation by promoting matrix metalloproteinase-2 expression through the phosphatidylinositol-3 kinase/AKT signaling pathway and AP-2 transcription factor. *J Biol Chem*, 2007.
575. Han, Y., et al., Nerve growth factor promotes formation of lumen-like structures in vitro through inducing apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 366(3): p. 685-91.
576. Ribatti, D., et al., Correlation between NGF/TrkA and microvascular density in human pterygium. *Int J Exp Pathol*, 2009. 90(6): p. 615-20.
577. Liu, X., et al., Neuronal-driven angiogenesis: role of NGF in retinal neovascularization in an oxygen-induced retinopathy model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010. 51(7): p. 3749-57.
578. Tessarollo, L., et al., Targeted deletion of all isoforms of the trkC gene suggests the use of alternate receptors by its ligand neurotrophin-3 in neuronal development and implicates trkC in normal cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(26): p. 14776-81.
579. Liebl, D.J., et al., Absence of sensory neurons before target innervation in brain-derived neurotrophic factor-, neurotrophin 3-, and TrkC-deficient embryonic mice. *J Neurosci*, 1997. 17(23): p. 9113-21.
580. Albers, K.M., et al., Cutaneous overexpression of NT-3 increases sensory and sympathetic neuron number and enhances touch dome and hair follicle innervation. *J Cell Biol*, 1996. 134(2): p. 487-97.
581. Cristofaro, B., et al., Neurotrophin-3 is a novel angiogenic factor capable of therapeutic neovascularization in a mouse model of limb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. 30(6): p. 1143-50.
582. Sariola, H. and M. Saarma, Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci*, 2003. 116(Pt 19): p. 3855-62.

583. Henderson, C.E., et al., GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*, 1994. 266(5187): p. 1062-4.
584. Nguyen, Q.T., et al., Hyperinnervation of neuromuscular junctions caused by GDNF overexpression in muscle. *Science*, 1998. 279(5357): p. 1725-9.
585. Oppenheim, R.W., et al., Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature*, 1995. 373(6512): p. 344-6.
586. Albers, K.M., et al., Glial cell-line-derived neurotrophic factor expression in skin alters the mechanical sensitivity of cutaneous nociceptors. *J Neurosci*, 2006. 26(11): p. 2981-90.
587. Stucky, C.L. and G.R. Lewin, Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *J Neurosci*, 1999. 19(15): p. 6497-505.
588. Adly, M.A., et al., Analysis of the expression pattern of glial cell line-derived neurotrophic factor, neurturin, their cognate receptors GFRalpha-1 and GFRalpha-2, and a common signal transduction element c-Ret in the human scalp skin. *J Cutan Pathol*, 2006. 33(12): p. 799-808.
589. Golden, J.P., et al., Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse. *Exp Neurol*, 1999. 158(2): p. 504-28.
590. Trupp, M., et al., Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J Cell Biol*, 1995. 130(1): p. 137-48.
591. Baloh, R.H., et al., The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol*, 2000. 10(1): p. 103-10.
592. Molliver, D.C., et al., IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron*, 1997. 19(4): p. 849-61.
593. Kamimura, Y., et al., Barrier function of microvessels and roles of glial cell line-derived neurotrophic factor in the rat testis. *Med Electron Microsc*, 2002. 35(3): p. 139-45.
594. Igarashi, Y., et al., Expression of receptors for glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and neurturin in the inner blood-retinal barrier of rats. *Cell Struct Funct*, 2000. 25(4): p. 237-41.
595. Utsumi, H., et al., Expression of GFRalpha-1, receptor for GDNF, in rat brain capillary during postnatal development of the BBB. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000. 279(2): p. C361-8.

596. Morohunfola, K.A., T.E. Jones, and B.L. Munger, The differentiation of the skin and its appendages. II. Altered development of papillary ridges following neurolectomy. *Anat Rec*, 1992. 232(4): p. 599-611.
597. Moore, S.J. and B.L. Munger, The early ontogeny of the afferent nerves and papillary ridges in human digital glabrous skin. *Brain Res Dev Brain Res*, 1989. 48(1): p. 119-41.
598. Stelnicki, E.J., et al., Nerve dependency in scarless fetal wound healing. *Plast Reconstr Surg*, 2000. 105(1): p. 140-7.
599. Basson, M.D. and R.E. Burney, Defective wound healing in patients with paraplegia and quadriplegia. *Surg Gynecol Obstet*, 1982. 155(1): p. 9-12.
600. Barker, A.R., G.D. Rosson, and A.L. Dellon, Wound healing in denervated tissue. *Ann Plast Surg*, 2006. 57(3): p. 339-42.
601. Li, Y., et al., Sensory and motor denervation influence epidermal thickness in rat foot glabrous skin. *Exp Neurol*, 1997. 147(2): p. 452-62.
602. Huang, I.T., et al., Influence of cutaneous nerves on keratinocyte proliferation and epidermal thickness in mice. *Neuroscience*, 1999. 94(3): p. 965-73.
603. Hsieh, S.T., et al., Epidermal denervation and its effects on keratinocytes and Langerhans cells. *J Neurocytol*, 1996. 25(9): p. 513-24.
604. Hsieh, S.T. and W.M. Lin, Modulation of keratinocyte proliferation by skin innervation. *J Invest Dermatol*, 1999. 113(4): p. 579-86.
605. Chiang, H.Y., et al., Regional difference in epidermal thinning after skin denervation. *Exp Neurol*, 1998. 154(1): p. 137-45.
606. Hall, Z.W. and J.R. Sanes, Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell*, 1993. 72 Suppl: p. 99-121.
607. Fromy, B., D. Sigaud-Roussel, and J.L. Saumet, Cutaneous neurovascular interaction involved in tactile sensation. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2008. 6(4): p. 337-42.
608. Marchand, S., *Le phénomène de la douleur*. Deuxième édition ed, ed. C. Éducation. 2009: Chenelière Éducation inc. 392.
609. Egan, C.L., et al., Characterization of unmyelinated axons uniting epidermal and dermal immune cells in primate and murine skin. *J Cutan Pathol*, 1998. 25(1): p. 20-9.
610. Bienenstock, J., et al., Mast cell/nerve interactions in vitro and in vivo. *Am Rev Respir Dis*, 1991. 143(3 Pt 2): p. S55-8.

611. Hosoi, J., et al., Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature*, 1993. 363(6425): p. 159-63.
612. Gaudillere, A., et al., Intimate associations between PGP9.5-positive nerve fibres and Langerhans cells. *Br J Dermatol*, 1996. 135(2): p. 343-4.
613. Baluk, P., Neurogenic inflammation in skin and airways. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 1997. 2(1): p. 76-81.
614. Chiang, H.Y., et al., Skin denervation, neuropathology, and neuropathic pain in a laser-induced focal neuropathy. *Neurobiol Dis*, 2005. 18(1): p. 40-53.
615. Fitzgerald, M., Capsaicin and sensory neurones--a review. *Pain*, 1983. 15(2): p. 109-30.
616. Senapati, A., et al., Depletion of neuropeptides during wound healing in rat skin. *Neurosci Lett*, 1986. 71(1): p. 101-5.
617. Smith, P.G. and M. Liu, Impaired cutaneous wound healing after sensory denervation in developing rats: effects on cell proliferation and apoptosis. *Cell Tissue Res*, 2002. 307(3): p. 281-91.
618. Luo, Y., et al., Morphological analysis of skin in senescence-accelerated mouse P10. *Med Electron Microsc*, 2002. 35(1): p. 31-45.
619. Miller, M.S., et al., Regulation of substance P by nerve growth factor: disruption by capsaicin. *Brain Res*, 1982. 250(1): p. 193-6.
620. Yang, X.D., et al., Regulatory effect of nerve growth factor on release of substance P in cultured dorsal root ganglion neurons of rat. *Neurosci Bull*, 2007. 23(4): p. 215-20.
621. Zerari, F., et al., Immunoelectron microscopic localization of NK-3 receptor in the rat spinal cord. *Neuroreport*, 1997. 8(12): p. 2661-4.
622. Moussaoui, S.M., et al., Distribution of neurokinin B in rat spinal cord and peripheral tissues: comparison with neurokinin A and substance P and effects of neonatal capsaicin treatment. *Neuroscience*, 1992. 48(4): p. 969-78.
623. Fattori, D., M. Altamura, and C.A. Maggi, Small molecule antagonists of the tachykinin NK 2 receptor. *Mini Rev Med Chem*, 2004. 4(3): p. 331-40.
624. Malherbe, P., T.M. Ballard, and H. Ratni, Tachykinin neurokinin 3 receptor antagonists: a patent review (2005 - 2010). *Expert Opin Ther Pat*, 2011. 21(5): p. 637-55.
625. Munoz, M. and R. Covenas, NK-1 receptor antagonists: a new paradigm in pharmacological therapy. *Curr Med Chem*, 2011. 18(12): p. 1820-31.

626. Reilly, D.M., et al., The epidermal nerve fibre network: characterization of nerve fibres in human skin by confocal microscopy and assessment of racial variations. *Br J Dermatol*, 1997. 137(2): p. 163-70.
627. Koizumi, H., et al., Substance P induces intracellular calcium increase and translocation of protein kinase C in epidermis. *Br J Dermatol*, 1992. 127(6): p. 595-9.
628. Burbach, G.J., et al., The neurosensory tachykinins substance P and neurokinin A directly induce keratinocyte nerve growth factor. *J Invest Dermatol*, 2001. 117(5): p. 1075-82.
629. Dallos, A., et al., Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and galanin on the production of nerve growth factor and inflammatory cytokines in cultured human keratinocytes. *Neuropeptides*, 2006. 40(4): p. 251-63.
630. Song, I.S., et al., Substance P induction of murine keratinocyte PAM 212 interleukin 1 production is mediated by the neurokinin 2 receptor (NK-2R). *Exp Dermatol*, 2000. 9(1): p. 42-52.
631. Haegerstrand, A., et al., Vasoactive intestinal polypeptide stimulates cell proliferation and adenylate cyclase activity of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(15): p. 5993-6.
632. Pincelli, C., et al., Substance P is diminished and vasoactive intestinal peptide is augmented in psoriatic lesions and these peptides exert disparate effects on the proliferation of cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 1992. 98(4): p. 421-7.
633. Pelletier, L., et al., Human bone marrow angiogenesis: in vitro modulation by substance P and neurokinin A. *Br J Haematol*, 2002. 119(4): p. 1083-9.
634. Wiedermann, C.J., et al., Induction of endothelial cell differentiation into capillary-like structures by substance P. *Eur J Pharmacol*, 1996. 298(3): p. 335-8.
635. Parenti, A., et al., The tachykinin NK1 receptor mediates the migration-promoting effect of substance P on human skin fibroblasts in culture. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1996. 353(5): p. 475-81.
636. Katayama, I. and K. Nishioka, Substance P augments fibrogenic cytokine-induced fibroblast proliferation: possible involvement of neuropeptide in tissue fibrosis. *J Dermatol Sci*, 1997. 15(3): p. 201-6.
637. Harrison, N.K., et al., Effects of neuropeptides on human lung fibroblast proliferation and chemotaxis. *Am J Physiol*, 1995. 268(2 Pt 1): p. L278-83.
638. Cao, T., et al., Lack of a significant effect of deletion of the tachykinin neurokinin-1 receptor on wound healing in mouse skin. *Neuroscience*, 2001. 108(4): p. 695-700.

639. Hay, D.L., D.R. Poyner, and P.M. Sexton, GPCR modulation by RAMPs. *Pharmacol Ther*, 2006. 109(1-2): p. 173-97.
640. Aiyar, N., et al., A cDNA encoding the calcitonin gene-related peptide type 1 receptor. *J Biol Chem*, 1996. 271(19): p. 11325-9.
641. Kusano, S., et al., Crystal structure of the human receptor activity-modifying protein 1 extracellular domain. *Protein Sci*, 2008. 17(11): p. 1907-14.
642. Steenbergh, P.H., et al., A second human calcitonin/CGRP gene. *FEBS Lett*, 1985. 183(2): p. 403-7.
643. Rosenfeld, M.G., et al., Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature*, 1983. 304(5922): p. 129-35.
644. Sternini, C. and K. Anderson, Calcitonin gene-related peptide-containing neurons supplying the rat digestive system: differential distribution and expression pattern. *Somatosens Mot Res*, 1992. 9(1): p. 45-59.
645. Zaidi, M., et al., The calcitonin gene peptides: biology and clinical relevance. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1990. 28(2): p. 109-74.
646. Gibbins, I.L., D. Wattchow, and B. Coventry, Two immunohistochemically identified populations of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive axons in human skin. *Brain Res*, 1987. 414(1): p. 143-8.
647. Garcia-Caballero, T., et al., Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the neuroendocrine Merkel cells and nerve fibres of pig and human skin. *Histochemistry*, 1989. 92(2): p. 127-32.
648. Asahina, A., et al., Modulation of Langerhans cell function by epidermal nerves. *J Allergy Clin Immunol*, 1995. 96(6 Pt 2): p. 1178-82.
649. Wallengren, J., R. Ekman, and F. Sundler, Occurrence and distribution of neuropeptides in the human skin. An immunocytochemical and immunochemical study on normal skin and blister fluid from inflamed skin. *Acta Derm Venereol*, 1987. 67(3): p. 185-92.
650. Kessler, F., et al., Heat-induced release of CGRP from isolated rat skin and effects of bradykinin and the protein kinase C activator PMA. *Pain*, 1999. 83(2): p. 289-95.
651. Bongenhielm, U., et al., Effects of neuropeptides on growth of cultivated rat molar pulp fibroblasts. *Regul Pept*, 1995. 60(2-3): p. 91-8.

652. Tam, C. and S.D. Brain, The assessment of vasoactive properties of CGRP and adrenomedullin in the microvasculature: a study using in vivo and in vitro assays in the mouse. *J Mol Neurosci*, 2004. 22(1-2): p. 117-24.
653. Haegerstrand, A., et al., Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(9): p. 3299-303.
654. Brain, S.D., et al., Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*, 1985. 313(5997): p. 54-6.
655. Ohno, T., et al., Roles of calcitonin gene-related peptide in maintenance of gastric mucosal integrity and in enhancement of ulcer healing and angiogenesis. *Gastroenterology*, 2008. 134(1): p. 215-25.
656. Huang, J., et al., Calcitonin gene-related peptide inhibits chemokine production by human dermal microvascular endothelial cells. *Brain Behav Immun*, 2011. 25(4): p. 787-99.
657. Takahashi, K., S. Nakanishi, and S. Imamura, Direct effects of cutaneous neuropeptides on adenylyl cyclase activity and proliferation in a keratinocyte cell line: stimulation of cyclic AMP formation by CGRP and VIP/PHM, and inhibition by NPY through G protein-coupled receptors. *J Invest Dermatol*, 1993. 101(5): p. 646-51.
658. Kiss, M., et al., Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone on the IL-8/IL-8 receptor system in a cultured human keratinocyte cell line and dermal fibroblasts. *Inflammation*, 1999. 23(6): p. 557-67.
659. Steinhoff, M., et al., Identification of pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide (PACAP) and PACAP type 1 receptor in human skin: expression of PACAP-38 is increased in patients with psoriasis. *Regul Pept*, 1999. 80(1-2): p. 49-55.
660. Dun, E.C., et al., Pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide-immunoreactivity in human spinal cord and dorsal root ganglia. *Brain Res*, 1996. 721(1-2): p. 233-7.
661. Odum, L., et al., Pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide (PACAP) is localized in human dermal neurons and causes histamine release from skin mast cells. *Inflamm Res*, 1998. 47(12): p. 488-92.
662. Sung, K.J., et al., Vasoactive intestinal polypeptide stimulates the proliferation of HaCaT cell via TGF- α . *Neuropeptides*, 1999. 33(6): p. 435-46.
663. Granth, R., M. Fridkin, and I. Gozes, VIP and the potent analog, stearyl-Nle(17)-VIP, induce proliferation of keratinocytes. *FEBS Lett*, 2000. 475(2): p. 78-83.
664. Ribatti, D., M.T. Conconi, and G.G. Nussdorfer, Nonclassic endogenous novel [corrected] regulators of angiogenesis. *Pharmacol Rev*, 2007. 59(2): p. 185-205.

665. Kakurai, M., et al., Vasoactive intestinal peptide and inflammatory cytokines enhance vascular endothelial growth factor production from epidermal keratinocytes. *Br J Dermatol*, 2009. 161(6): p. 1232-8.
666. Yu, X.J., et al., Vasoactive intestinal peptide induces vascular endothelial growth factor production in human HaCaT keratinocytes via MAPK pathway. *Neuropeptides*, 2010. 44(5): p. 407-11.
667. Koh, S.W. and B.Y. Yue, VIP stimulation of cAMP production in corneal endothelial cells in tissue and organ cultures. *Cornea*, 2002. 21(3): p. 270-4.
668. Hu, D.E., C.R. Hiley, and T.P. Fan, Comparative studies of the angiogenic activity of vasoactive intestinal peptide, endothelins-1 and -3 and angiotensin II in a rat sponge model. *Br J Pharmacol*, 1996. 117(3): p. 545-551.
669. Yang, J., et al., Vasoactive intestinal peptide in rats with focal cerebral ischemia enhances angiogenesis. *Neuroscience*, 2009. 161(2): p. 413-21.
670. Seeliger, S., et al., Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: an important vascular regulator in human skin in vivo. *Am J Pathol*, 2010. 177(5): p. 2563-75.
671. Castorina, A., et al., Effects of PACAP and VIP on hyperglycemia-induced proliferation in murine microvascular endothelial cells. *Peptides*, 2010. 31(12): p. 2276-83.
672. Kakurai, M., et al., Vasoactive intestinal peptide regulates its receptor expression and functions of human keratinocytes via type I vasoactive intestinal peptide receptors. *J Invest Dermatol*, 2001. 116(5): p. 743-9.
673. Levenberg, S. and R. Langer, Advances in tissue engineering. *Curr Top Dev Biol*, 2004. 61: p. 113-34.
674. Vermette, M., et al., Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials*, 2007. 28(18): p. 2850-60.
675. Robayo, L.M., et al., New ligament healing model based on tissue-engineered collagen scaffolds. *Wound Repair Regen*, 2011. 19(1): p. 38-48.
676. Lee, K.I., et al., Tissue Engineering of the Intervertebral Disc with Cultured Nucleus Pulposus Cells Using Atelocollagen Scaffold and Growth Factors. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011.
677. Cai, Y.Z., et al., Novel biodegradable three-dimensional macroporous scaffold using aligned electrospun nanofibrous yarns for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, 2012.

678. Kulig, K.M. and J.P. Vacanti, Hepatic tissue engineering. *Transpl Immunol*, 2004. 12(3-4): p. 303-10.
679. Paquette, J.S., et al., Production of tissue-engineered three-dimensional human bronchial models. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2003. 39(5-6): p. 213-20.
680. Gallico, G.G., 3rd, et al., Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med*, 1984. 311(7): p. 448-51.
681. Green, H., O. Kehinde, and J. Thomas, Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. 76(11): p. 5665-8.
682. Desai, M.H., et al., Lack of long-term durability of cultured keratinocyte burn-wound coverage: a case report. *J Burn Care Rehabil*, 1991. 12(6): p. 540-5.
683. De Luca, M., et al., Multicentre experience in the treatment of burns with autologous and allogenic cultured epithelium, fresh or preserved in a frozen state. *Burns*, 1989. 15(5): p. 303-9.
684. Gallico, G.G., 3rd and N.E. O'Connor, Cultured epithelium as a skin substitute. *Clin Plast Surg*, 1985. 12(2): p. 149-57.
685. Donati, L., et al., Clinical experiences with keratinocyte grafts. *Burns*, 1992. 18 Suppl 1: p. S19-26.
686. Clugston, P.A., et al., Cultured epithelial autografts: three years of clinical experience with eighteen patients. *J Burn Care Rehabil*, 1991. 12(6): p. 533-9.
687. Moustafa, M., et al., A new autologous keratinocyte dressing treatment for non-healing diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabet Med*, 2004. 21(7): p. 786-9.
688. Price, R.D., et al., A comparison of tissue-engineered hyaluronic acid dermal matrices in a human wound model. *Tissue Eng*, 2006. 12(10): p. 2985-95.
689. Myers, S.R., et al., Hyalomatrix: a temporary epidermal barrier, hyaluronan delivery, and neodermis induction system for keratinocyte stem cell therapy. *Tissue Eng*, 2007. 13(11): p. 2733-41.
690. Lam, P.K., et al., Development and evaluation of a new composite Laserskin graft. *J Trauma*, 1999. 47(5): p. 918-22.
691. Navarro, F.A., et al., Sprayed keratinocyte suspensions accelerate epidermal coverage in a porcine microwound model. *J Burn Care Rehabil*, 2000. 21(6): p. 513-8.
692. Gerlach, J.C., et al., Method for autologous single skin cell isolation for regenerative cell spray transplantation with non-cultured cells. *Int J Artif Organs*, 2011. 34(3): p. 271-9.

693. Grant, I., et al., The co-application of sprayed cultured autologous keratinocytes and autologous fibrin sealant in a porcine wound model. *Br J Plast Surg*, 2002. 55(3): p. 219-27.
694. Vanscheidt, W., et al., Treatment of recalcitrant venous leg ulcers with autologous keratinocytes in fibrin sealant: a multinational randomized controlled clinical trial. *Wound Repair Regen*, 2007. 15(3): p. 308-15.
695. Michel, M., et al., Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1999. 35(6): p. 318-26.
696. Bell, E., B. Ivarsson, and C. Merrill, Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. 76(3): p. 1274-8.
697. Bell, E., et al., Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*, 1981. 211(4486): p. 1052-4.
698. Eaglstein, W.H. and V. Falanga, Tissue engineering and the development of Apligraf, a human skin equivalent. *Clin Ther*, 1997. 19(5): p. 894-905.
699. Lafrance, H., et al., Study of the tensile properties of living skin equivalents. *Biomed Mater Eng*, 1995. 5(4): p. 195-208.
700. Lopez Valle, C.A., et al., Peripheral anchorage of dermal equivalents. *Br J Dermatol*, 1992. 127(4): p. 365-71.
701. Shin, H., S. Jo, and A.G. Mikos, Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, 2003. 24(24): p. 4353-64.
702. Langer, R., Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. *Acc Chem Res*, 2000. 33(2): p. 94-101.
703. Kim, B.S., C.E. Baez, and A. Atala, Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol*, 2000. 18(1): p. 2-9.
704. Hubbell, J.A., Biomaterials in tissue engineering. *Biotechnology (N Y)*, 1995. 13(6): p. 565-76.
705. Regnier, M., et al., Expression of high molecular weight (67K) keratin in human keratinocytes cultured on dead de-epidermized dermis. *Exp Cell Res*, 1986. 165(1): p. 63-72.
706. Prunieras, M., M. Regnier, and D. Woodley, Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol*, 1983. 81(1 Suppl): p. 28s-33s.

707. Brigido, S.A., The use of an acellular dermal regenerative tissue matrix in the treatment of lower extremity wounds: a prospective 16-week pilot study. *Int Wound J*, 2006. 3(3): p. 181-7.
708. Kim, H.T.a.A., S T and Park, J G, Absorption Rates of Various-thickness Human Acellular Dermal Grafts(SureDerm(R)). *J Korean Soc Plast Reconstr Surg*, 2003. 30(2): p. 224-230.
709. Still, J., et al., The use of a collagen sponge/living cell composite material to treat donor sites in burn patients. *Burns*, 2003. 29(8): p. 837-41.
710. Yannas, I.V., et al., Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *J Biomed Mater Res*, 1980. 14(2): p. 107-32.
711. Burke, J.F., et al., Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*, 1981. 194(4): p. 413-28.
712. Lukish, J.R., et al., The use of a bioactive skin substitute decreases length of stay for pediatric burn patients. *J Pediatr Surg*, 2001. 36(8): p. 1118-21.
713. Marston, W.A., Dermagraft, a bioengineered human dermal equivalent for the treatment of chronic nonhealing diabetic foot ulcer. *Expert Rev Med Devices*, 2004. 1(1): p. 21-31.
714. Truong, A.T., et al., Comparison of dermal substitutes in wound healing utilizing a nude mouse model. *J Burns Wounds*, 2005. 4: p. e4.
715. Ehrenreich, M. and Z. Ruszczak, Update on tissue-engineered biological dressings. *Tissue Eng*, 2006. 12(9): p. 2407-24.
716. Speer, D.P., et al., Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J Biomed Mater Res*, 1980. 14(6): p. 753-64.
717. Berthod, F., et al., Differential expression of collagens XII and XIV in human skin and in reconstructed skin. *J Invest Dermatol*, 1997. 108(5): p. 737-42.
718. Suzuki, S., et al., Experimental study of a newly developed bilayer artificial skin. *Biomaterials*, 1990. 11(5): p. 356-60.
719. Boyce, S.T., et al., Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autograft for treatment of full-thickness burns. *Ann Surg*, 1995. 222(6): p. 743-52.
720. Doillon, C.J. and F.H. Silver, Collagen-based wound dressing: effects of hyaluronic acid and fibronectin on wound healing. *Biomaterials*, 1986. 7(1): p. 3-8.
721. Saintigny, G., et al., Reconstruction of epidermis on a chitosan cross-linked collagen-GAG lattice: effect of fibroblasts. *Acta Derm Venereol*, 1993. 73(3): p. 175-80.

722. Damour, O., et al., A dermal substrate made of collagen--GAG--chitosan for deep burn coverage: first clinical uses. *Clin Mater*, 1994. 15(4): p. 273-6.
723. Shahabeddin, L., et al., Characterization of skin reconstructed on a chitosan-cross-linked collagen-glycosaminoglycan matrix. *Skin Pharmacol*, 1990. 3(2): p. 107-14.
724. Berthod, F., et al., Optimization of thickness, pore size and mechanical properties of a biomaterial designed for deep burn coverage. *Clin Mater*, 1994. 15(4): p. 259-65.
725. Berthod, F., et al., Collagen synthesis by fibroblasts cultured within a collagen sponge. *Biomaterials*, 1993. 14(10): p. 749-54.
726. Berthod, F., et al., Deposition of collagen fibril bundles by long-term culture of fibroblasts in a collagen sponge. *J Biomed Mater Res*, 1996. 32(1): p. 87-93.
727. Pouliot, R., et al., Reconstructed human skin produced in vitro and grafted on athymic mice. *Transplantation*, 2002. 73(11): p. 1751-7.
728. Coquette, A., et al., Analysis of interleukin-1alpha (IL-1alpha) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization. *Toxicol In Vitro*, 2003. 17(3): p. 311-21.
729. Perkins, M.A., et al., Comparison of in vitro and in vivo human skin responses to consumer products and ingredients with a range of irritancy potential. *Toxicol Sci*, 1999. 48(2): p. 218-29.
730. Barratt, M.D., et al., The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxicol In Vitro*, 1998. 12(4): p. 471-82.
731. Fentem, J.H., et al., The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicol In Vitro*, 1998. 12(4): p. 483-524.
732. Perkins, M.A., R. Osborne, and G.R. Johnson, Development of an in vitro method for skin corrosion testing. *Fundam Appl Toxicol*, 1996. 31(1): p. 9-18.
733. Tremblay, P.L., et al., Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am J Transplant*, 2005. 5(5): p. 1002-10.
734. Jones, I., L. Currie, and R. Martin, A guide to biological skin substitutes. *Br J Plast Surg*, 2002. 55(3): p. 185-93.
735. Saiag, P., et al., Psoriatic fibroblasts induce hyperproliferation of normal keratinocytes in a skin equivalent model in vitro. *Science*, 1985. 230(4726): p. 669-72.

736. Jean, J., et al., Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. *J Dermatol Sci*, 2009. 53(1): p. 19-25.
737. Corriveau, M.P., et al., The fibrotic phenotype of systemic sclerosis fibroblasts varies with disease duration and severity of skin involvement: reconstitution of skin fibrosis development using a tissue engineering approach. *J Pathol*, 2009. 217(4): p. 534-42.
738. Bellemare, J., et al., Epidermis promotes dermal fibrosis: role in the pathogenesis of hypertrophic scars. *J Pathol*, 2005. 206(1): p. 1-8.
739. Woodbury, M.G. and P.E. Houghton, Prevalence of pressure ulcers in Canadian healthcare settings. *Ostomy Wound Manage*, 2004. 50(10): p. 22-4, 26, 28, 30, 32, 34, 36-8.
740. Lorimer, K.R., et al., Assessing venous ulcer population characteristics and practices in a home care community. *Ostomy Wound Manage*, 2003. 49(5): p. 32-4, 38-40, 42-3.
741. Hurd, T., N. Zuiliani, and J. Posnett, Evaluation of the impact of restructuring wound management practices in a community care provider in Niagara, Canada. *Int Wound J*, 2008. 5(2): p. 296-304.
742. Armstrong, D.G., et al., Surgical morbidity and the risk of amputation due to infected puncture wounds in diabetic versus nondiabetic adults. *J Am Podiatr Med Assoc*, 1997. 87(7): p. 321-6.
743. Moll, I., et al., Characterization of epidermal wound healing in a human skin organ culture model: acceleration by transplanted keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 1998. 111(2): p. 251-8.
744. Laplante, A.F., et al., Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *FASEB J*, 2001. 15(13): p. 2377-89.
745. Jain, R.K., et al., Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat Med*, 1997. 3(11): p. 1203-8.
746. Cukierman, E., et al., Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 2001. 294(5547): p. 1708-12.
747. Velazquez, O.C., et al., Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like 3-dimensional networks. *Faseb J*, 2002. 16(10): p. 1316-8.
748. Plendl, J., L. Hartwell, and R. Auerbach, Organ-specific change in Dolichos biflorus lectin binding by myocardial endothelial cells during in vitro cultivation. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1993. 29A(1): p. 25-31.

749. Nicosia, R.F. and A. Ottinetti, Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1990. 26(2): p. 119-28.
750. Nicosia, R.F. and A. Ottinetti, Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest*, 1990. 63(1): p. 115-22.
751. Blacher, S., et al., Improved quantification of angiogenesis in the rat aortic ring assay. *Angiogenesis*, 2001. 4(2): p. 133-42.
752. Black, A.F., et al., In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *Faseb J*, 1998. 12(13): p. 1331-40.
753. Hudon, V., et al., A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro. *Br J Dermatol*, 2003. 148(6): p. 1094-104.
754. Berthod, F., et al., Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. *J Cell Physiol*, 2006. 207(2): p. 491-8.
755. Tremblay, P.L., et al., In vitro evaluation of the angiostatic potential of drugs using an endothelialized tissue-engineered connective tissue. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. 315(2): p. 510-6.
756. Norrby, K., In vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 2006. 10(3): p. 588-612.
757. Momeni, H.R. and M. Kanje, Calpain inhibitors delay injury-induced apoptosis in adult mouse spinal cord motor neurons. *Neuroreport*, 2006. 17(8): p. 761-5.
758. Elliott, J.L., Experimental models of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*, 1999. 6(5): p. 310-20.
759. Rothstein, J.D., et al., Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(14): p. 6591-5.
760. Smalheiser, N.R., E.R. Peterson, and S.M. Crain, Neurites from mouse retina and dorsal root ganglion explants show specific behavior within co-cultured tectum or spinal cord. *Brain Res*, 1981. 208(2): p. 499-505.
761. Bird, M.M., Establishment of synaptic connections between explants of embryonic neural tissue in culture: experimental ultrastructural studies. *Exp Brain Res*, 1985. 57(2): p. 337-47.

762. Balgude, A.P., et al., Agarose gel stiffness determines rate of DRG neurite extension in 3D cultures. *Biomaterials*, 2001. 22(10): p. 1077-84.
763. Bellamkonda, R.V., Peripheral nerve regeneration: an opinion on channels, scaffolds and anisotropy. *Biomaterials*, 2006. 27(19): p. 3515-8.
764. Bellamkonda, R., et al., Hydrogel-based three-dimensional matrix for neural cells. *J Biomed Mater Res*, 1995. 29(5): p. 663-71.
765. Bellamkonda, R., J.P. Ranieri, and P. Aebischer, Laminin oligopeptide derivatized agarose gels allow three-dimensional neurite extension in vitro. *J Neurosci Res*, 1995. 41(4): p. 501-9.
766. Pittier, R., et al., Neurite extension and in vitro myelination within three-dimensional modified fibrin matrices. *J Neurobiol*, 2005. 63(1): p. 1-14.
767. Sakiyama, S.E., J.C. Schense, and J.A. Hubbell, Incorporation of heparin-binding peptides into fibrin gels enhances neurite extension: an example of designer matrices in tissue engineering. *FASEB J*, 1999. 13(15): p. 2214-24.
768. Herbert, C.B., et al., Effects of fibrin micromorphology on neurite growth from dorsal root ganglia cultured in three-dimensional fibrin gels. *J Biomed Mater Res*, 1998. 40(4): p. 551-9.
769. Tonge, D.A., et al., Effects of extracellular matrix components on axonal outgrowth from peripheral nerves of adult animals in vitro. *Exp Neurol*, 1997. 146(1): p. 81-90.
770. Phillips, J.B., et al., Neural tissue engineering: a self-organizing collagen guidance conduit. *Tissue Eng*, 2005. 11(9-10): p. 1611-7.
771. Willits, R.K. and S.L. Skornia, Effect of collagen gel stiffness on neurite extension. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2004. 15(12): p. 1521-31.
772. Dubey, N., P.C. Letourneau, and R.T. Tranquillo, Guided neurite elongation and schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in simulated peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*, 1999. 158(2): p. 338-50.
773. Shaw, D. and M.S. Shoichet, Toward spinal cord injury repair strategies: peptide surface modification of expanded poly(tetrafluoroethylene) fibers for guided neurite outgrowth in vitro. *J Craniofac Surg*, 2003. 14(3): p. 308-16.
774. Tong, Y.W. and M.S. Shoichet, Enhancing the interaction of central nervous system neurons with poly(tetrafluoroethylene-co-hexafluoropropylene) via a novel surface amine-functionalization reaction followed by peptide modification. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1998. 9(7): p. 713-29.
775. Maquet, V., et al., Peripheral nerve regeneration using bioresorbable macroporous polylactide scaffolds. *J Biomed Mater Res*, 2000. 52(4): p. 639-51.

776. Gingras, M., et al., In vitro study of axonal migration and myelination of motor neurons in a three-dimensional tissue-engineered model. *Glia*, 2008. 56(3): p. 354-64.
777. Gingras, M., et al., Optimized protocols for isolation of primary motor neurons, astrocytes and microglia from embryonic mouse spinal cord. *J Neurosci Methods*, 2007. 163(1): p. 111-8.
778. Gingras, M., et al., In vitro development of a tissue-engineered model of peripheral nerve regeneration to study neurite growth. *FASEB J*, 2003. 17(14): p. 2124-6.
779. Gingras, M., I. Paradis, and F. Berthod, Nerve regeneration in a collagen-chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice. *Biomaterials*, 2003. 24(9): p. 1653-61.
780. Beaulieu, M.M., P.L. Tremblay, and F. Berthod, [Tissue-engineered models of the nervous system]. *Med Sci (Paris)*, 2009. 25(3): p. 288-92.
781. Levenberg, S., et al., Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(22): p. 12741-6.
782. Lavik, E., et al., Seeding neural stem cells on scaffolds of PGA, PLA, and their copolymers. *Methods Mol Biol*, 2002. 198: p. 89-97.
783. Levenberg, S., et al., Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(7): p. 4391-6.
784. Young, H.E., et al., Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. *Cell Biochem Biophys*, 2004. 40(1): p. 1-80.
785. Sanz-Ruiz, R., et al., Early translation of adipose-derived cell therapy for cardiovascular disease. *Cell Transplant*, 2009. 18(3): p. 245-54.
786. Mesimaki, K., et al., Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2009. 38(3): p. 201-9.
787. Yoshimura, K., et al., Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg*, 2008. 32(1): p. 48-55; discussion 56-7.
788. Yoshimura, K., et al., Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications. *Breast J*, 2010. 16(2): p. 169-75.
789. Lendeckel, S., et al., Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg*, 2004. 32(6): p. 370-3.

790. Doi, A., et al., Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet*, 2009. 41(12): p. 1350-3.
791. Fernandes, K.J., et al., A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol*, 2004. 6(11): p. 1082-93.
792. Toma, J.G., et al., Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*, 2005. 23(6): p. 727-37.
793. Biernaskie, J., et al., SKPs derive from hair follicle precursors and exhibit properties of adult dermal stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009. 5(6): p. 610-23.
794. Daher, S.R., et al., Adipose stromal/stem cells: basic and translational advances: the IFATS collection. *Stem Cells*, 2008. 26(10): p. 2664-5.
795. De Ugarte, D.A., et al., Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*, 2003. 174(3): p. 101-9.
796. Strem, B.M. and M.H. Hedrick, The growing importance of fat in regenerative medicine. *Trends Biotechnol*, 2005. 23(2): p. 64-6.
797. Zuk, P.A., et al., Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 2001. 7(2): p. 211-28.
798. Zuk, P.A., et al., Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(12): p. 4279-95.
799. Dominici, M., et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006. 8(4): p. 315-7.
800. Mizuno, H., et al., Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg*, 2002. 109(1): p. 199-209; discussion 210-1.
801. Safford, K.M., et al., Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 294(2): p. 371-9.
802. Ashjian, P.H., et al., In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg*, 2003. 111(6): p. 1922-31.
803. Anghileri, E., et al., Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 2008. 17(5): p. 909-16.
804. Romanov, Y.A., et al., Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bull Exp Biol Med*, 2005. 140(1): p. 138-43.

805. Musina, R.A., E.S. Bekchanova, and G.T. Sukhikh, Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bull Exp Biol Med*, 2005. 139(4): p. 504-9.
806. Tobita, M., H. Orbay, and H. Mizuno, Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. *Discov Med*, 2011. 11(57): p. 160-70.
807. Guenard, V., et al., Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci*, 1992. 12(9): p. 3310-20.
808. Wakao, S., et al., Long-term observation of auto-cell transplantation in non-human primate reveals safety and efficiency of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*, 2010. 223(2): p. 537-47.
809. Shimizu, S., et al., Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated-human bone marrow stromal cells with Schwann cell property. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 359(4): p. 915-20.
810. Faroni, A., G. Terenghi, and V. Magnaghi, Expression of Functional gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptors in Schwann-Like Adult Stem Cells. *J Mol Neurosci*, 2012.
811. Tohill, M., et al., Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neurosci Lett*, 2004. 362(3): p. 200-3.
812. Mantovani, C., et al., Bone marrow- and adipose-derived stem cells show expression of myelin mRNAs and proteins. *Regen Med*, 2010. 5(3): p. 403-10.
813. Faroni, A., et al., Schwann-like adult stem cells derived from bone marrow and adipose tissue express gamma-aminobutyric acid type B receptors. *J Neurosci Res*, 2011. 89(9): p. 1351-62.
814. Kashani, I.R., et al., Schwann-like cell differentiation from rat bone marrow stem cells. *Arch Med Sci*, 2011. 7(1): p. 45-52.
815. Matsuse, D., et al., Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2010. 69(9): p. 973-85.
816. Biernaskie, J. and F.D. Miller, White matter repair: skin-derived precursors as a source of myelinating cells. *Can J Neurol Sci*, 2010. 37 Suppl 2: p. S34-41.

817. Biernaskie, J.A., et al., Isolation of skin-derived precursors (SKPs) and differentiation and enrichment of their Schwann cell progeny. *Nat Protoc*, 2006. 1(6): p. 2803-12.
818. Kaewkhaw, R., A.M. Scutt, and J.W. Haycock, Anatomical site influences the differentiation of adipose-derived stem cells for Schwann-cell phenotype and function. *Glia*, 2011. 59(5): p. 734-49.
819. Jiang, L., et al., Differentiation of rat adipose tissue-derived stem cells into Schwann-like cells in vitro. *Neuroreport*, 2008. 19(10): p. 1015-9.
820. Kingham, P.J., et al., Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol*, 2007. 207(2): p. 267-74.
821. Gimble, J.M., A.J. Katz, and B.A. Bunnell, Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*, 2007. 100(9): p. 1249-60.
822. Peters, E.M., et al., Neurotrophins act as neuroendocrine regulators of skin homeostasis in health and disease. *Horm Metab Res*, 2007. 39(2): p. 110-24.
823. Groneberg, D.A., et al., Cell type-specific regulation of brain-derived neurotrophic factor in states of allergic inflammation. *Clin Exp Allergy*, 2007. 37(9): p. 1386-91.
824. Gibran, N.S., et al., Diminished neuropeptide levels contribute to the impaired cutaneous healing response associated with diabetes mellitus. *J Surg Res*, 2002. 108(1): p. 122-8.
825. Engin, C., Effects of calcitonin gene-related peptide on wound contraction in denervated and normal rat skin: a preliminary report. *Plast Reconstr Surg*, 1998. 101(7): p. 1887-90.
826. Kjartansson, J., C.J. Dalsgaard, and C.E. Jonsson, Decreased survival of experimental critical flaps in rats after sensory denervation with capsaicin. *Plast Reconstr Surg*, 1987. 79(2): p. 218-21.
827. Nakamura, M., et al., Synergistic effect of substance P with epidermal growth factor on epithelial migration in rabbit cornea. *Exp Eye Res*, 1997. 65(3): p. 321-9.
828. Khalil, Z. and R. Helme, Sensory peptides as neuromodulators of wound healing in aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 1996. 51(5): p. B354-61.
829. Palazzo, E., et al., Role of neurotrophins on dermal fibroblast survival and differentiation. *J Cell Physiol*, 2012. 227(3): p. 1017-25.
830. Misumi, Y., et al., Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 1986. 261(24): p. 11398-403.

831. Pries, A.R. and W.M. Kuebler, Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol*, 2006(176 Pt 1): p. 1-40.
832. Craig, L.E., et al., Endothelial cells from diverse tissues exhibit differences in growth and morphology. *Microvasc Res*, 1998. 55(1): p. 65-76.
833. Garlanda, C. and E. Dejana, Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. 17(7): p. 1193-202.
834. Thorin, E. and S.M. Shreeve, Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. *Pharmacol Ther*, 1998. 78(3): p. 155-66.
835. Micera, A., et al., Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(11): p. 6162-7.
836. Kohyama, T., et al., Nerve growth factor stimulates fibronectin-induced fibroblast migration. *J Lab Clin Med*, 2002. 140(5): p. 329-35.
837. Segal, R.A. and M.E. Greenberg, Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci*, 1996. 19: p. 463-89.
838. Leoni, C. and F. Valtorta, Constitutive TrkA activity in receptor-overexpressing PC12 clones. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 291(4): p. 972-8.
839. Lamalice, L., F. Le Boeuf, and J. Huot, Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*, 2007. 100(6): p. 782-94.
840. Trott, D., et al., Effect of phosphorylated hsp27 on proliferation of human endothelial and smooth muscle cells. *Proteomics*, 2009. 9(12): p. 3383-94.
841. Lecht, S., et al., Transient signaling of Erk1/2, Akt and PLCgamma induced by nerve growth factor in brain capillary endothelial cells. *Vascul Pharmacol*, 2010. 53(3-4): p. 107-14.
842. Nakahashi, T., et al., Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett*, 2000. 470(2): p. 113-7.
843. Baxter, G.T., et al., Signal transduction mediated by the truncated trkB receptor isoforms, trkB.T1 and trkB.T2. *J Neurosci*, 1997. 17(8): p. 2683-90.
844. Wong, J. and B. Garner, Evidence that truncated TrkB isoform, TrkB-Shc can regulate phosphorylated TrkB protein levels. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. 420(2): p. 331-5.

845. Luberg, K., et al., Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *J Neurochem*, 2010. 113(4): p. 952-64.
846. Patapoutian, A. and L.F. Reichardt, Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol*, 2001. 11(3): p. 272-80.
847. Besson, A., et al., p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev*, 2004. 18(8): p. 862-76.
848. Kilarski, W.W., N. Jura, and P. Gerwins, Inactivation of Src family kinases inhibits angiogenesis in vivo: implications for a mechanism involving organization of the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res*, 2003. 291(1): p. 70-82.
849. Masri, B., et al., Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *Faseb J*, 2004. 18(15): p. 1909-11.
850. Donovan, M.J., et al., Identification of an essential nonneuronal function of neurotrophin 3 in mammalian cardiac development. *Nat Genet*, 1996. 14(2): p. 210-3.
851. Ivanisevic, L., et al., TrkA receptor "hot spots" for binding of NT-3 as a heterologous ligand. *J Biol Chem*, 2007. 282(23): p. 16754-63.
852. Kloth, S. and C. Suter-Crazzolara, Modulation of renal blood vessel formation by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Microvasc Res*, 2000. 59(1): p. 190-4.
853. Igarashi, Y., et al., Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 261(1): p. 108-12.
854. Banerjee, A., et al., ARTEMIS Promotes De Novo Angiogenesis in ER Negative Mammary Carcinoma through Activation of TWIST1-VEGF-A Signalling. *PLoS One*, 2012. 7(11): p. e50098.
855. Gomez, D. and N.C. Reich, Stimulation of primary human endothelial cell proliferation by IFN. *J Immunol*, 2003. 170(11): p. 5373-81.
856. Trupp, M., et al., Ret-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells. *J Biol Chem*, 1999. 274(30): p. 20885-94.
857. Nalbandian, R.M., et al., Pluronic F-127 gel preparation as an artificial skin in the treatment of third-degree burns in pigs. *J Biomed Mater Res*, 1987. 21(9): p. 1135-48.
858. Wallengren, J., D. Chen, and F. Sundler, Neuropeptide-containing C-fibres and wound healing in rat skin. Neither capsaicin nor peripheral neurotomy affect the rate of healing. *Br J Dermatol*, 1999. 140(3): p. 400-8.

859. Horie, H., et al., NGF enhances neurite regeneration from nerve-transected terminals of young adult and aged mouse dorsal root ganglia in vitro. *Neurosci Lett*, 1991. 121(1-2): p. 125-8.
860. Pan, P., S. Huang, and C. Hu, Nerve growth factor induced expression of iNOS and substance P in dorsal root ganglion sensory neuron and interferon regulatory factor-1. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2011. 36(5): p. 386-91.
861. Lindsay, R.M. and A.J. Harmar, Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature*, 1989. 337(6205): p. 362-4.
862. Skaper, S.D., The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol*, 2012. 846: p. 1-12.
863. Lewin, G.R. and Y.A. Barde, Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci*, 1996. 19: p. 289-317.
864. Truzzi, F., A. Marconi, and C. Pincelli, Neurotrophins in healthy and diseased skin. *Dermatoendocrinol*, 2011. 3(1): p. 32-6.
865. Marconi, A., et al., Expression and function of neurotrophins and their receptors in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 2003. 121(6): p. 1515-21.
866. Shibayama, E. and H. Koizumi, Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am J Pathol*, 1996. 148(6): p. 1807-18.
867. Raychaudhuri, S.P., W.Y. Jiang, and E.M. Farber, Psoriatic keratinocytes express high levels of nerve growth factor. *Acta Derm Venereol*, 1998. 78(2): p. 84-6.
868. Chan, J., et al., Intraepidermal nerve fiber expression of calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal peptide and substance P in psoriasis. *Arch Dermatol Res*, 1997. 289(11): p. 611-6.
869. Jiang, W.Y., S.P. Raychaudhuri, and E.M. Farber, Double-labeled immunofluorescence study of cutaneous nerves in psoriasis. *Int J Dermatol*, 1998. 37(8): p. 572-4.
870. Naukkarinen, A., et al., Quantitative histochemical analysis of mast cells and sensory nerves in psoriatic skin. *J Pathol*, 1996. 180(2): p. 200-5.
871. Naukkarinen, A., B.J. Nickoloff, and E.M. Farber, Quantification of cutaneous sensory nerves and their substance P content in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 1989. 92(1): p. 126-9.
872. Saraceno, R., et al., The role of neuropeptides in psoriasis. *Br J Dermatol*, 2006. 155(5): p. 876-82.

873. Amatya, B., et al., Expression of tachykinins and their receptors in plaque psoriasis with pruritus. *Br J Dermatol*, 2011. 164(5): p. 1023-9.
874. Al'Abadie, M.S., et al., Neuropeptides and general neuronal marker in psoriasis--an immunohistochemical study. *Clin Exp Dermatol*, 1995. 20(5): p. 384-9.
875. Creamer, D., et al., Angiogenesis in psoriasis. *Angiogenesis*, 2002. 5(4): p. 231-6.
876. Liew, S.C., et al., Differential expression of the angiogenesis growth factors in psoriasis vulgaris. *BMC Res Notes*, 2012. 5: p. 201.
877. Adly, M.A., H. Assaf, and M.R. Hussein, Age-associated decrease of the nerve growth factor protein expression in the human skin: preliminary findings. *J Dermatol Sci*, 2006. 42(3): p. 268-71.
878. Legat, F.J. and P. Wolf, Photodamage to the cutaneous sensory nerves: role in photoaging and carcinogenesis of the skin? *Photochem Photobiol Sci*, 2006. 5(2): p. 170-6.

1 Annexe 1 : L'ajout de cellules de Schwann dans les peaux reconstruites favorise la régénération nerveuse

Avant-Propos

Ce chapitre fait l'objet d'un article intitulé *Improvement of nerve regeneration in a tissue-engineered skin enriched with Schwann cells* qui est publié dans la revue *Journal of Investigative dermatology*, volume 129, pages 2895-900.

Ce même article est aussi disponible en ligne :

<http://www.nature.com/jid/journal/v129/n12/full/jid2009159a.html>

J'ai conçu et réalisé durant mon doctorat la grande majorité des expériences décrites dans ce manuscrit et je l'ai rédigé en collaboration et sous la supervision du Dr Berthod.

1.1 Résumé

L'incorporation de cellules de Schwann dans les peaux reconstruites pourrait permettre d'atteindre une récupération fonctionnelle de la perception sensorielle cutanée. Nous avons démontré *in vitro*, avec un modèle unique de derme reconstruit innervé reconstruit par génie tissulaire, que les cellules de Schwann ont permis de doubler le nombre de fibres nerveuses sensorielles qui migrent par rapport au témoin. En outre, les cellules de Schwann colocalisent spontanément le long de neurites et forment des gaines de myéline *in vitro*, tel qu'évalué par microscopie électronique à transmission. Nous avons préparé une peau reconstruite enrichie ou non en cellules de Schwann et transplantées sur des souris nus pendant 60 et 90 jours. Nous avons démontré que les cellules de Schwann induisent une augmentation de 1,8 et 1,7 fois du nombre de fibres nerveuses qui migrent en 60 et 90 jours après la transplantation, respectivement. En outre, la peau reconstruite enrichie en cellules de Schwann présentait un seuil de perception sensoriel similaire à la peau normale pour les fibres sensorielles myélinisées A β , contrairement au contrôle. Ainsi, nous avons démontré que l'ajout de cellules de Schwann dans une peau reconstruite par génie tissulaire améliore non seulement la migration des fibres nerveuses, mais promouvoit aussi la formation de la gaine de myéline *in vitro* et la récupération de la fonction nerveuse *in vivo*.

1.2 Improvement of nerve regeneration in a tissue-engineered skin enriched with Schwann cells

Authors: Mathieu Blais, Myriam Grenier, François Berthod*.

Centre CMDGT/LOEX de l'Université Laval, Centre de recherche FRSQ du Centre hospitalier *affilié* universitaire de Québec, and Département de Chirurgie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada

Abstract

The incorporation of Schwann cells in a reconstructed skin could play a major role to achieve a functional recovery of the cutaneous sensory perception. We demonstrated with a unique in vitro model of a tissue-engineered innervated reconstructed dermis that Schwann cells promoted a 2 times increase in the number of sensory neurites migrating in the three-dimensional tissue compared to the control. In addition, Schwann cells spontaneously colocalized along neurites and achieved the formation of myelin sheaths in vitro as assessed by transmission electron microscopy. We prepared a reconstructed skin enriched or not with Schwann cells and transplanted it on nude mice for 60 to 90 days. We demonstrated that Schwann cells induced a 1.8 and 1.7 time increase in the number of nerve fibers migrating in the graft 60 and 90 days after transplantation, respectively. In addition, the reconstructed skin enriched with Schwann cells featured a current perception threshold similar to normal skin for the large and myelinated A β sensory fibers, in contrast with the control. Thus, we demonstrated that the addition of Schwann cells in a tissue-engineered skin not only enhanced nerve migration, but also promoted myelin sheath formation in vitro and nerve function recovery in vivo.

Introduction

The major purpose of covering deep and extensive burns is the restoration of the barrier function of the skin to prevent fluid loss and bacterial infection. Meanwhile, burns also destroy the nerve components of the skin responsible for pain, temperature, and sensory perceptions. Peripheral nerves have the capacity to regenerate through nerve migration in healing tissue, but patients complain about poor discriminative sensibility and/or hyperesthesia and dysesthesia after a conventional split-thickness skin graft (Ward and Tuckett, 1991; Malenfant et al., 1998; Ward et al., 2004; Nedelec et al., 2005).

The cutaneous sensory nerve fibers are broadly classified as A β -, A δ -, or C-fibers on the basis of the degree of myelination and the speed at which action potentials travel along afferent fibers (Gardner et al., 2000). The thicker myelinated A β -fibers innervating hair shafts and specialized mechanoreceptors such as Pacini's corpuscles mediate touch perception, whereas A δ - and C-fibers are important thermoreceptors and nociceptors (Gardner et al., 2000).

We developed a collagen–chitosan sponge, which was used as a scaffold to grow dermis and epidermis. We have previously shown that, once transplanted on nude mice, our biomaterial-based human reconstructed skin (RS) allowed for the migration of new sensory nerve fibers, detected by immunofluorescent staining of the neurofilament M, an intermediate filament of the cytoskeleton specific to neurons (Gingras et al., 2003b). Linear arrangements of migrating Schwann cells were also observed in those experiments.

We further showed that the incorporation of recombinant laminin directly into the biomaterial enhanced cutaneous nerve regeneration (Caissie et al., 2006). Laminin is an adhesion molecule that is normally produced by Schwann cells to create a basement membrane when axonal contact occurs (Clark and Bunge, 1989). Laminin is produced by neither neurons nor fibroblasts (Bunge et al., 1980, 1982).

Schwann cells have been shown to promote nerve regeneration when embedded in high concentrations in specialized peripheral nerve conduits or used to treat spinal cord injuries

(Hou et al., 2006; Oudega and Xu, 2006). However, there is no evidence in the literature indicating whether Schwann cells can improve nerve regeneration when randomly distributed within a whole tissue.

Our goal was to investigate whether the incorporation of Schwann cells in an RS sample could improve global nerve regeneration in vitro and in vivo. First, we investigated the effect of Schwann cells on axonal migration and myelination in vitro in a model of innervated reconstructed dermis (IRD). Second, we analyzed the effect of Schwann cells on nerve regeneration and nerve function recovery in vivo via the transplantation of tissue-engineered RS on athymic mice.

Material and methods

Cell cultures

Fibroblasts and keratinocytes were isolated from human skin biopsies after breast reductive surgeries as previously described (Germain et al., 1993; Auger et al., 1995). The study was approved by the Laval University research ethical committee; participants gave their written informed consent. Fibroblasts used between the third and the sixth passages were grown in the Dulbecco–Vogt modification of Eagle's medium (Flow Lab., Mississauga, ON, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY), 100 U ml⁻¹ penicillin, and 25 mg ml⁻¹ Gentamicin (Schering, Pointe-Claire, QC, Canada). This culture medium is abbreviated as DMEc. Schwann cells were isolated from mouse sciatic nerves using a modified version of a previously described method (Komiya et al., 2003). Briefly, sciatic nerves were cut into 1 mm sections and cultured as explants in petri dishes for 3–4 weeks in DMEc. The explants were transferred to new petri dishes every week. To harvest Schwann cells, nerve explants were digested in DMEc containing 0.05% collagenase IA (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 0.1% dispase II (Roche, Laval, QC, Canada), and 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid) for 3 hours at 37 °C. The mixture was then triturated and centrifuged. Cells were suspended in DMEc supplemented with 10 µM forskolin (Sigma-Aldrich) and 10 ng ml⁻¹ human neuregulin (NRG1-β1/HRG1-β1 EGF domain; R&D Systems, Minneapolis, MN) and cultured onto poly-D-lysine- (10 µg ml⁻¹; Sigma-Aldrich) and laminin (10 µg ml⁻¹; Sigma-Aldrich)-coated flasks.

Sensory neurons were extracted from the dorsal root ganglia of mouse embryos (E13) as described previously (Gingras et al., 2003a). Sensory neurons were added fresh to the tissue-engineered models.

Human umbilical vein endothelial cells were obtained from healthy newborns by enzymatic digestion with 0.25 µg ml⁻¹ thermolysin (Sigma-Aldrich) as previously described

(L'Heureux et al., 1998) and grown in endothelial growth medium 2 (Cambrex Bioscience, Baltimore, MD).

Preparation of the collagen-chitosan biomaterial

Collagen sponges were prepared as described previously (Berthod et al., 1994, 1997) but without chondroitins 4-6 sulphates. Briefly, type I, III bovine collagen (Symatase, Chaponost, France) and chitosan (Kemestrie, Sherbrooke, Canada) were dissolved in 0.1% acetic acid, mixed, and 1 mL/well of the final solution was poured in 12-well plates (for the in vitro experiments) or 2.5 mL/well in 6 well plates (for the in vivo experiments) (BD Biosciences, Mississauga, Canada) and frozen at -80°C for 1 h. The frozen plates were then lyophilized in a vacuum lyophilizer (Dura-Stop™ Microprocessor Controlled Tray Freeze-Dryer; FTS Systems inc., Stone Ridge, NY).

Preparation of the innervated reconstructed dermis (IRD) for in vitro testing:

The IRD was produced from a 3.8 cm^2 collagen-chitosan sponge seeded with 2.1×10^5 cells/ cm^2 human fibroblasts and cultured in DMEc supplemented with $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ascorbic acid. A suspension of 2.1×10^5 cells/ cm^2 sensory neurons were seeded 14 days later and the IRD were then lifted to the air-liquid interface and cultured in 3:1 ratio of DMEM-Ham's F-12 medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS, $0.4\text{ }\mu\text{g/ml}$ hydrocortisone (Calbiochem, La Jolla, CA), $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ bovine insulin (Sigma-Aldrich), 10 ng/ml NGF 2.5S (natural murine; Invitrogen; Burlington, Canada), $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid and antibiotics. A suspension of 2.1×10^5 cells/ cm^2 Schwann cells was seeded on the IRD at the same time than neurons (day 14). Neurons were allowed to innervate the IRD in presence or absence of Schwann cells for 7 or 14 additional days.

Preparation of the reconstructed skin for in vivo testing:

Collagen-chitosan sponges (9.6 cm²) were first seeded with a 1:1 suspension of 4.2 x 10⁵ cells/cm² human fibroblasts and HUVEC and cultured in a 1:1 ratio of EGM-2 : DMEc supplemented with 25 µg/ml ascorbic acid. Three days later, a suspension of 2.1 x 10⁵ cells/cm² Schwann cells was seeded on half of the sponges. The sponges were then cultured in a 1:1 ratio of EGM-2 : DMEc supplemented with 25 µg/ml ascorbic acid, 5 µM forskolin and 5 ng/mL human neuregulin. On day 7, a suspension of 2.1 x 10⁵ cells/cm² of human keratinocytes (3rd passage) was seeded on all samples. These samples were cultured for 7 additional days in DME-Ham in a ratio 3:1 (Flow Lab., Mississauga, Canada) supplemented with 24.3 µg/ml adenine, 10 ng/ml human epidermal growth factor (EGF) (Chiron Corp., Emeryville, CA), 0.4 µg/ml hydrocortisone (Calbiochem, La Jolla, CA), 5 µg/ml bovine insulin, 5 µg/ml human transferrin, 2×10⁻⁹ M 3,3',5', triiodo-L-thyronin, 100 µg/ml ascorbic acid, 10⁻¹⁰ M cholera toxin (Schwarz/Mann, Cleveland, OH), 5 µM forskolin, 5 ng/mL human neuregulin, antibiotics and 10% newborn calf serum (Fetal Clone II, Hyclone, Logan, UT). The RS were then lifted to the air-liquid interface and cultured for 14 additional days without EGF.

Animals and surgical manipulations

Adult male athymic nu/nu mice (56 days old) (Charles River Laboratories, Lasalle, Canada) were used as surgical recipients, as previously described (Gingras et al., 2003b). The mice were injected with ceftazidime (140 mg/mouse Glaxo, Toronto, Canada) 24 and 48 h before surgery. Penicillin G and gentamicin (100 U/ml and 25 mg/ml, respectively, Sigma, Mississauga, Canada) were also added to their sterile drinking water. Animals were anaesthetized by inhalation of 3% isoflurane with 1.5 l/min oxygen (lowered to 2% for surgery). A 2.5×2.5 cm² full-thickness skin area was excised to the muscle, on the back of the mouse. A Fusenig chamber was installed in the wound and stitched to the mouse skin, to protect the RS after grafting. The Fusenig chamber was removed after 30 days and the mouse skin was stitched to the graft margins. Mice were sacrificed 60 and 90 days after graft for histological and immunohistochemical analysis of reconstructed skin biopsies. All

the manipulations of the animals were done with respect to the rules established from the Canadian Council on Animal Care.

Current perception threshold testing

Neurosensory recovery was evaluated by testing A β -, A δ - or C-fibers with a Neurometers (Neurotron Inc. Baltimore, MD) 90 days after graft. The Neurometer evaluation uses three different frequencies of an electrical sine wave stimulus: 2000 Hz, 250 Hz and 5 Hz for the specific stimulation of A β -fibers, A δ -fibers and C-fibers, respectively (Katims et al., 1986; Masson et al., 1989; Anon, 1999; Caissie et al., 2007). The apparatus was connected to each animal by two self-sticking electrodes. One was placed on the graft site whilst the other was placed on the proximal tail. Each animal was placed in a restraint system for easy manipulation and to prevent chewing of the electrodes. The current intensity (in mAmp) was increased until the mice showed a tail flick, which defined the current stimulus threshold. This stimulation procedure was repeated until the same current intensity was obtained on three consecutive stimulations. The relative current perception threshold percentage was calculated as follows: $[(Graft\ current\ intensity \div Normal\ skin\ current\ intensity\ of\ the\ same\ mouse) \times 100] - 100$.

Indirect immunofluorescence staining

Indirect immunofluorescence assays were performed on formaldehyde (3.7%) followed by methanol (100%) frozen tissue sections embedded in O.C.T. compound (Sukura, Finetek U.S.A. Inc., Torrance, CA). The primary antibodies used were: Rabbit polyclonal anti-neurofilament M (160 kDa), mouse monoclonal anti-gial fibrillary acidic protein (all from Upstate International, Temecula, CA), rat monoclonal anti-laminin (Abcam, Cambridge, MA). The secondary antibodies used were: goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor[®]488, goat anti-mouse IgG Alexa Fluor[®]594, donkey anti-rat IgG Alexa Fluor[®]594 (all from Invitrogen). Cell nuclei were labeled with Hoechst reagent 33258 (Sigma-Aldrich). As a control, the primary antibody was omitted (Data not shown). Sections were viewed with a Nikon C1 laser scanning confocal microscope. Images were collected from the center of the reconstructed skin dermis. The serial images collected throughout one section with the confocal microscope were summed to give a two-dimensional representation of the full

depth of the field. Images were processed with Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA).

Electron microscopy

For electron microscopy analysis of myelin sheath formation, tissues were fixed overnight at 4°C in 2.5% glutaraldehyde, washed with 0.1 M cacodylate buffer and postfixated with 1% OsO₄ for 30 min. Regions of interest were identified and embedded in LRWhite™ (London Resin Company Ltd., Theale, Berkshire, UK). Ultra thin sections stained with uranyl acetate were observed with a transmission electron microscope (JEOL JEM-1230; Soquelec Ltd., Montreal, Canada).

Quantification of innervation

For in vitro quantification, 160 kDa neurofilament–positive neurites detected in transversal sections of the IRD were counted in 5 different representative fields and expressed per squared millimeter. For each condition, a total of six IRD were assessed. For in vivo assessment of innervation, neurites detected in whole transversal sections of the graft were quantified as previously described (Caissie et al., 2006). A total of four biopsies by condition were taken on day 60, and a total of five biopsies by condition were taken on day 90. Values are expressed as the means ± SD. Differences were tested by the bilateral Student's t-test. The probability level was regarded significant at $p < 0.05$.

Results

Schwann cells increased nerve migration in vitro in the IRD

Human dermal fibroblasts were cultured into collagen-chitosan sponges for two weeks. Sensory neurons alone or with Schwann cells were then seeded on the top of the construct. No difference was observed after 7 days of culture with neurons (Figure 1A versus 1B), but there was more nerve fibers 14 days after addition of neurons in the IRD with Schwann cells, as assessed by staining of NF160 (Figure 1D versus 1C). There were 2.15 times more nerve fibers/mm² in the IRD enriched with Schwann cells compared to the control without Schwann cells at day 14 (Figure 1E; $p < 0.002$; $n = 6$).

Myelin sheath formation around neurites in the IRD

We have previously demonstrated that incorporation of laminin in the sponge enhanced nerve regeneration in a RS (Caissie et al., 2006). Schwann cells are the only cell type known to secrete the neural adhesion molecule laminin in our model (Bunge et al., 1980, 1982). Therefore, any detection of laminin would originate from them. In order to detect the colocalization of laminin with nerve fibers, we performed a series of three double indirect immunofluorescent staining: NF160 and GFAP (Figure 2A), laminin and GFAP (Figure 2B) and laminin and NF160 (Figure 2C). We found that Schwann cells were often closely associated with neurites (Figure 2A). They also deposited laminin in their surrounding extracellular matrix (Figure 2B) while nerve fibers were often colocalized with laminin deposits (Figure 2C). Schwann cells also formed myelin sheaths around some sensory neuron axons in the IRD, as assessed by transmission electronic microscopy (Figure 2D-E, arrow). E is an enlargement of D (white square).

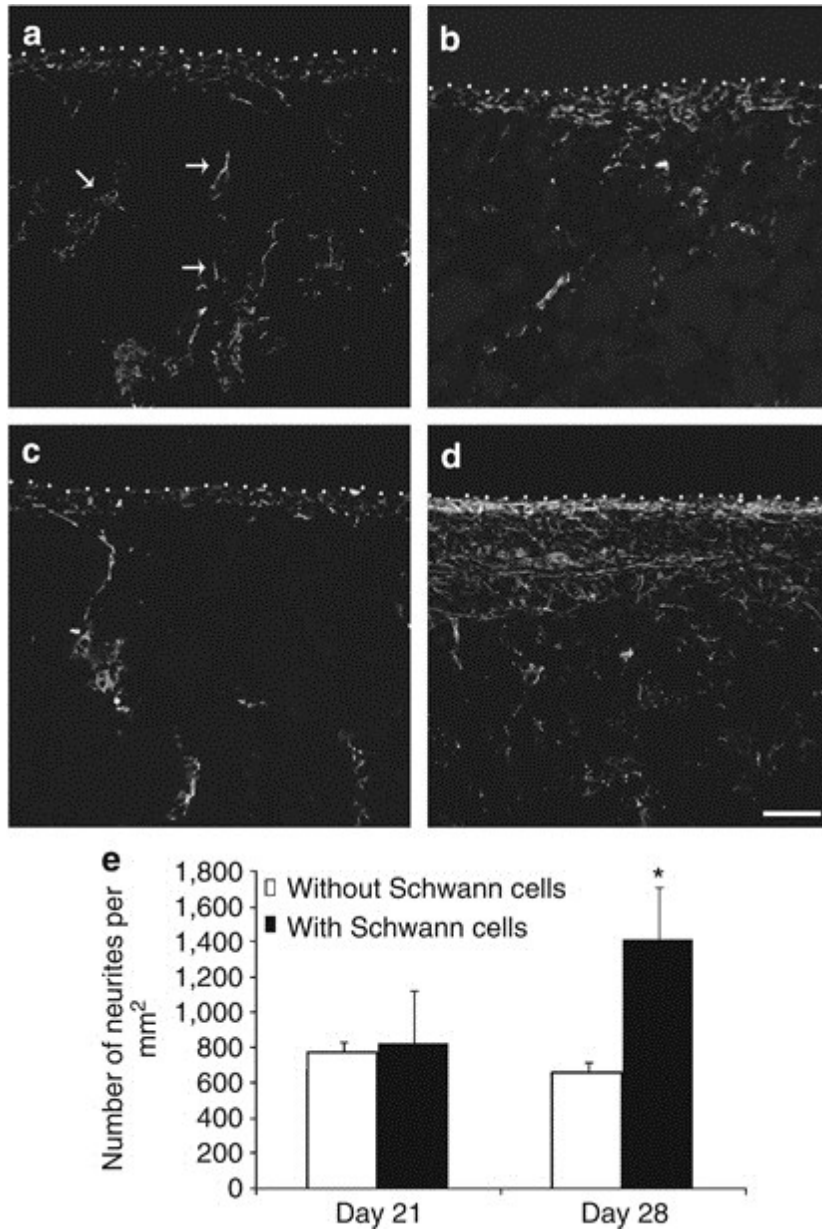


Figure 1. Quantification of axonal migration in a reconstructed connective tissue enriched with Schwann cells in vitro.

Sensory neurons were seeded alone (a and c) or with Schwann cells (b and d) for 7 (a and b) or 14 days (c and d). Axonal migration was assessed by immunofluorescent staining of the 160 kDa neurofilament (a–d). The arrows in panel a indicate examples of nerve fibers. The dotted lines indicate the upper sides of the collagen sponges where the cells were seeded. (e) The number of neurites was expressed per mm^2 . The graph is a representation of the mean results SD obtained for each condition (* P 0.002; n=6). Bar=100 μm .

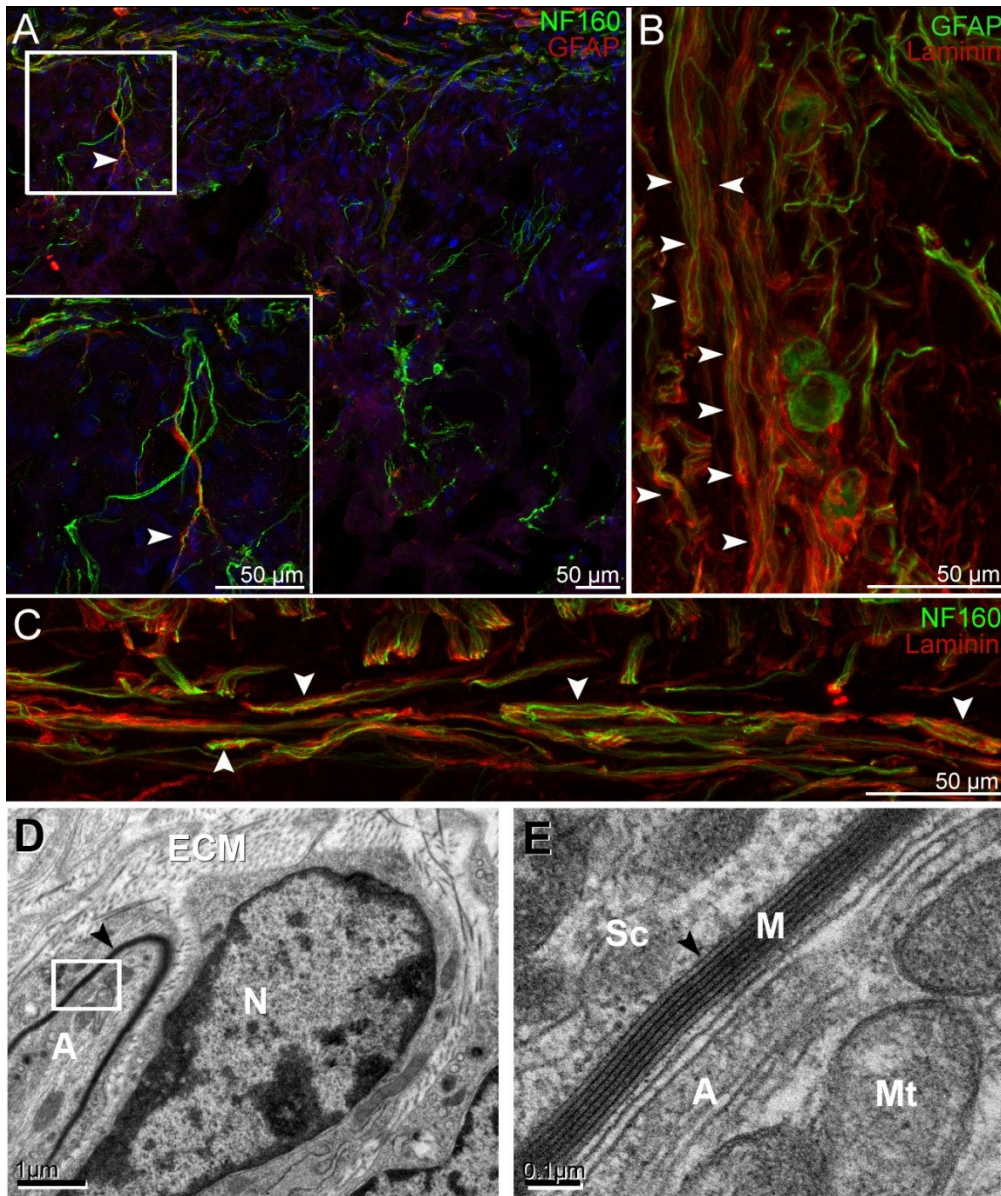


Figure 2. Detection of laminin and myelin sheaths in the reconstructed connective tissues enriched with Schwann cells.

(a) Double immunofluorescent staining of neurons (160 kDa neurofilament, green) and Schwann cells (GFAP, red) on day 14. Schwann cells are colocalized with neurites (arrowheads). (b) Double immunofluorescent staining of Schwann cells (GFAP, green) and laminin (red). The GFAP staining is detected inside the laminin staining (arrowheads). (c) Double immunofluorescent staining of neurons (160 kDa neurofilament, green) and laminin (red). The 160-kDa neurofilament staining colocalized with the laminin staining (arrowheads). (d–e) The extent of myelination was analyzed by transmission electron microscopy (TEM). Myelin sheaths (arrowheads) were found around some sensory neurites. The box in panel d is enlarged in panel e. A, axon; ECM, extracellular matrix; M, myelin; Mt, mitochondria; N, nuclei; Sc, Schwann cell. Bar=50 μ m (a–c), bar=1 μ m (d), and bar=0.1 μ m (e).

Schwann cells enhanced axonal migration in vivo

In order to investigate whether Schwann cells have the potential to enhance cutaneous nerve regeneration *in vivo*, we reconstructed *in vitro* for 28 days in culture a human reconstructed skin enriched (Figure 3B) or not (Figure 3A) with Schwann cells. The RS enriched (Figure 3D) or not (Figure 3C) with Schwann cells displayed a thick and well-differentiated epidermis that persisted 90 days after graft on athymic mice without sign of necrosis.

Nerve migration was monitored by the indirect immunofluorescent staining of the 160 kDa neurofilament in RS enriched or not with Schwann cells 60 and 90 days after graft (Figure 4). A 1.81 time increase in the number of nerve fibers was detected 60 days after graft in the RS enriched with Schwann cells versus the control (Figure 4E and Figure 4B versus 4A; $p \leq 0.05$; $n = 4$). There were 1.71 times more nerve fibers in the RS with Schwann cells 90 days after graft (Figure 4E and Figure 4D versus 4C; $p \leq 0.005$; $n = 4$). However, a much lower amount of nerve fibers was observed in the RS after grafting compared to the IRD *in vitro*, because the number of neurites *in vitro* depends on the number of neurons added in the model, a large number being more convenient for imaging.

Schwann cells enhanced current perception recovery in the RS

A current perception threshold analysis in the RS was performed 90 days after graft with a Neurometer[®] as described in the method section. The current perception threshold for the A δ and C nerve fibers did not show significant difference between the normal mouse skin and the graft enriched or not with Schwann cells (Figure 5). The current perception threshold of the large and myelinated A β -fibers was significantly higher ($p < 0.05$; $n = 4$) in the graft without Schwann cells versus normal skin, indicating a decreased functionality of these fibers. In contrast, no significant difference was observed in the current perception threshold of A β fibers in the graft enriched with Schwann cells versus normal mouse skin (Figure 5).

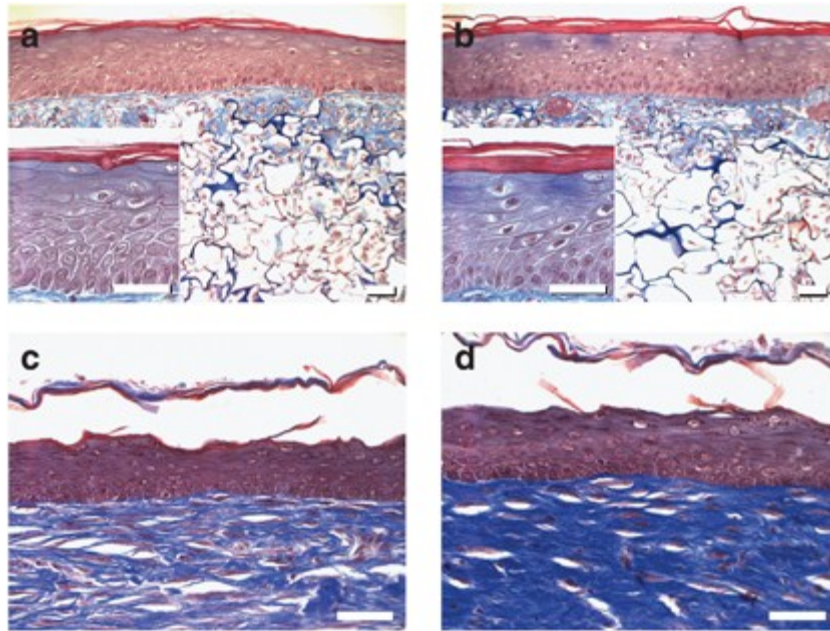


Figure 3. Histology of the reconstructed skin (Masson's trichrome staining). Tissue-engineered skin enriched (b) or not (a) with Schwann cells was cultured for 28 days in vitro and grafted on nude mice for 90 days (without Schwann cells (c) and with Schwann cells (d)). Bars=50 μ m (a–d).

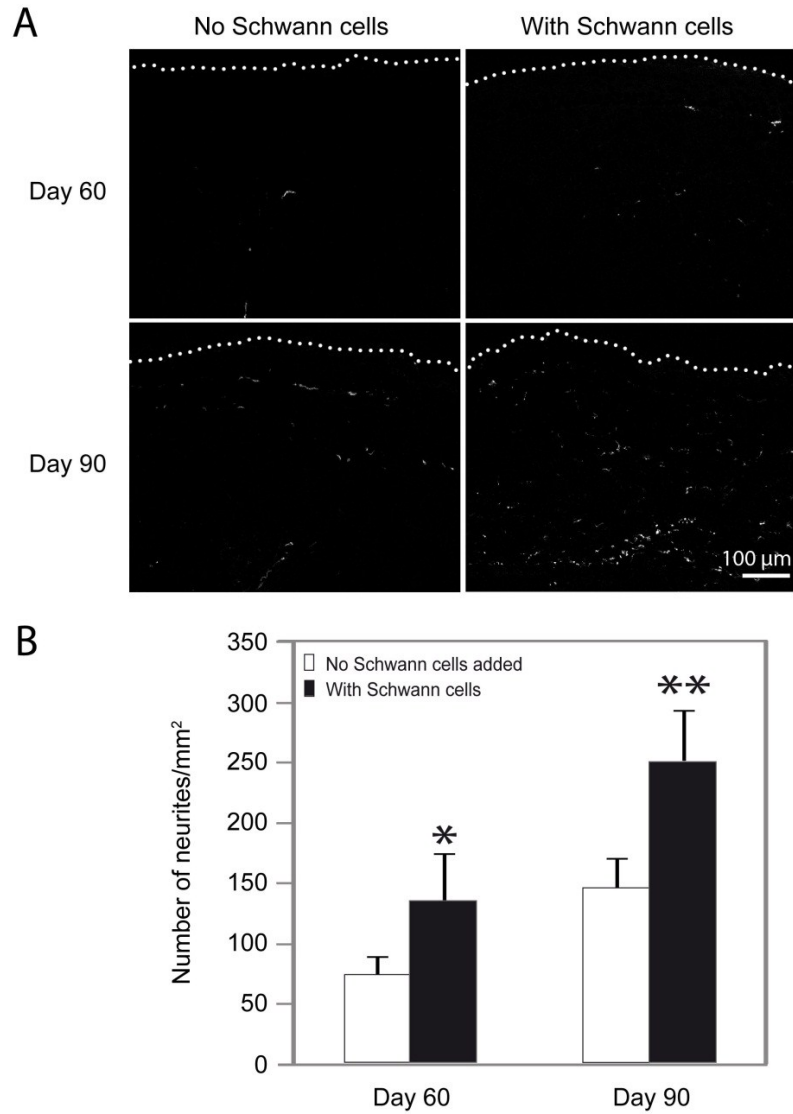


Figure 4. Quantification of the nerve migration in the reconstructed skin (RS) enriched with Schwann cells and grafted on mice.

(a–d) The innervation was revealed by immunofluorescent staining of the 160-kDa neurofilament on biopsies taken from the reconstructed skin enriched (b and d) or not (a and c) with Schwann cells, 60 days (a and b) and 90 days (c and d) after the graft. The dotted lines indicate the upper sides of the graft. (e) Nerve fibers were counted and divided by the total area of the graft (in mm²). The graph is a representation of the mean results \pm SD obtained for each condition. (* P0.05, ** P0.005; n=4). Bar=100 m.

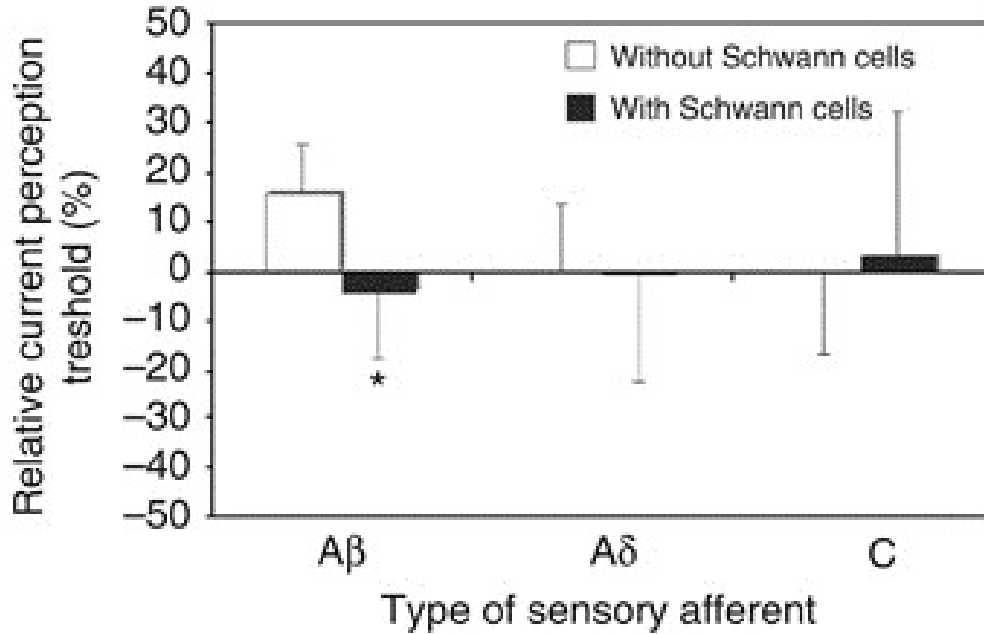


Figure 5. Current perception threshold analysis 90 days after the graft. The results are presented as the percentage of the relative current perception threshold of the graft with respect to the perception threshold for the corresponding normal skin of the same mouse, positive values indicating hypoesthesia, and negative values hyperesthesia. A-, A-, and C-nerve fibers were recruited using an electrical sine wave stimulus at 2,000, 250, and 5 Hz, respectively (* P<0.05; n=4).

Discussion

Schwann cells have a major role in the promotion and organization of axonal migration in the peripheral nervous system. However, they have mostly been studied in large nerves after an injury, not in the regeneration of the thin nerve network of the whole target organ. Skin is a perfect organ in which to study this process because its sensory nerve network can be easily visualized and functionally tested *in vivo*.

First, we developed an *in vitro* model to study axonal migration through a three-dimensional reconstructed connective tissue. The major questions to be addressed in such a model concerned the ability of Schwann cells to enhance neurite migration, to migrate and organize around neurites, and finally to achieve *in vitro* the myelination and formation of myelin sheaths around neurites.

Using our unique IRD model, we showed that Schwann cells induced a 2.15 times increase in the number of neurites migrating through the tissue compared with the control without Schwann cells. In addition, these cells were shown to be colocalized with neurites, showing that they were able to migrate through the tissue and organize around neurites in a very physiological process. We also showed that Schwann cells deposited large amounts of laminin in their close vicinity that could participate in the promotion of axonal migration (Bunge et al., 1980, 1982; Clark and Bunge, 1989). They are also known to secrete neurotrophic factors that enhance nerve migration and stabilize neurites (for a review, see (Boyd and Gordon, 2003; Lykissas et al., 2007)). Moreover, Schwann cells produced myelin sheaths that wrapped around neurites *in vitro*. Myelin sheath formation is a crucial process for achieving nerve function recovery, as A β - and A δ -nerve fibers need to be myelinated *in vivo* to propagate nerve impulses efficiently. This myelin sheath formation *in vitro* suggested that Schwann cells added to a tissue-engineered organ could participate in the myelination of migrating axons *in vivo*.

The second step was to investigate the *in vivo* effect on nerve migration of Schwann cells cultured in RS transplanted into nude mice. Our purpose was to analyze whether Schwann cells would survive for at least the 25 days of *in vitro* maturation of the RS before grafting and whether they would have any beneficial effect on nerve migration after grafting. We

prepared an RS sample enriched or not with Schwann cells and grafted it onto the backs of athymic mice. We also incorporated into this RS sample a network of capillary-like tubes to promote rapid vascularization of the graft as a routine method to optimize graft take and integration into the wound (Tremblay et al., 2005). The human epidermis reconstructed *in vitro* persisted after grafting with no signs of necrosis for up to 90 days. The addition of Schwann cells to the RS induced a 1.81- and 1.71-fold increase in the number of nerve fibers migrating in the graft 60 and 90 days after transplantation, respectively. Schwann cells could promote nerve regeneration through both the deposition of laminin in the extracellular matrix, which has previously been shown to enhance innervation (Caissie et al., 2006), and the secretion of growth factors, or by a faster myelination of axons. We investigated whether Schwann cells could improve the perception threshold of the RS with regard to the normal mouse skin. We showed that our model of RS, with or without Schwann cells, promoted optimal regeneration of the A δ - and C-nerve fibers, achieving a current perception threshold in the graft similar to that of normal mouse skin. By contrast, the current perception threshold of the A β -fibers was significantly higher than that of the normal skin in the RS without Schwann cells, suggesting a hypoesthesia of the graft compared with normal skin. This deficit of perception was not observed in the RS enriched with Schwann cells, indicating that these cells enhanced the regeneration of functional A β -fibers (those responsible for the sense of touch).

The improvement in the density of nerve fibers migrating in the graft, as well as its perception recovery, suggests that Schwann cells can promote faster and more efficient cutaneous nerve regeneration *in vivo*, even when they are randomly incorporated into tissue-engineered skin.

The major limitation in the use of Schwann cells from a clinical perspective to promote nerve regeneration in tissue-engineered organs is their availability. These cells can be isolated from a peripheral nerve biopsy, which may cause morbidity. However, recent studies have demonstrated that Schwann cells can be differentiated from human adult stem cells isolated from a skin biopsy (Biernaskie et al., 2006, 2007). Skin biopsies can be

harvested from patients with minimal morbidity and could be a valuable source of stem cells for tissue engineering.

Our work has demonstrated that Schwann cells randomly incorporated into a connective tissue promote nerve regeneration in the whole organ and enhance large myelinated nerve fiber regeneration and recovery of function. Schwann cell enrichment could be a valuable strategy for increasing nerve regeneration in any tissue-engineered organ that needs fast recovery of its nerve function after transplantation.

Acknowledgements

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MOP-67082), the Canada Foundation for Innovation and the Fondation des Hôpitaux Enfant-Jésus - Saint-Sacrement. F. Berthod was recipient of a research fellowship from FRSQ. The authors are grateful to Vicky Gagnon for her skilled assistance during the neurometer procedures. The authors also thank Dr. Marie Gingras and Anne-Marie Moisan for their expert technical assistance.

References

1. Anon (1999) Technology review: the Neurometer Current Perception Threshold (CPT). AAEM Equipment and Computer Committee. American Association of Electrodiagnostic Medicine. *Muscle Nerve* 22:523–31
2. Auger FA, Lopez Valle CA, Guignard R, Tremblay N, Noel B, Goulet F et al. (1995) Skin equivalent produced with human collagen. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31:432–9
3. Berthod F, Germain L, Guignard R, Lethias C, Garrone R, Damour O et al. (1997) Differential expression of collagens XII and XIV in human skin and in reconstructed skin. *J Invest Dermatol* 108:737–42
4. Berthod F, Saintigny G, Chretien F, Hayek D, Collombel C, Damour O (1994) Optimization of thickness, pore size and mechanical properties of a biomaterial designed for deep burn coverage. *Clin Mater* 15:259–65
5. Biernaskie J, Sparling JS, Liu J, Shannon CP, Plemel JR, Xie Y et al. (2007) Skinderived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J Neurosci* 27:9545–59
6. Biernaskie JA, McKenzie IA, Toma JG, Miller FD (2006) Isolation of skin-derived precursors (SKPs) and differentiation and enrichment of their Schwann cell progeny. *Nat Protoc* 1:2803–12
7. Boyd JG, Gordon T (2003) Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol* 27:277–324
8. Bunge MB, Williams AK, Wood PM (1982) Neuron–Schwann cell interaction in basal lamina formation. *Dev Biol* 92:449–60
9. Bunge MB, Williams AK, Wood PM, Uitto J, Jeffrey JJ (1980) Comparison of nerve cell and nerve cell plus Schwann cell cultures, with particular emphasis on basal lamina and collagen formation. *J Cell Biol* 84:184–202
10. Caissie R, Gingras M, Champigny MF, Berthod F (2006) In vivo enhancement of sensory perception recovery in a tissue-engineered skin enriched with laminin. *Biomaterials* 27:2988–93
11. Caissie R, Landry PE, Paquin R, Champigny MF, Berthod F (2007) Quantitative method to evaluate the functionality of the trigeminal nerve. *J Oral Maxillofac Surg* 65:2254–9
12. Clark MB, Bunge MB (1989) Cultured Schwann cells assemble normalappearing basal lamina only when they ensheath axons. *Dev Biol* 133:393–404

13. Gardner EP, Martin JH, Jessell TM (2000) The bodily senses. In: Principles of neural science (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds), New York: McGraw-Hill Medical, 430–49
14. Germain L, Rouabhia M, Guignard R, Carrier L, Bouvard V, Auger FA (1993) Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns* 19:99–104
15. Gingras M, Bergeron J, Dery J, Durham HD, Berthod F (2003a) In vitro development of a tissue-engineered model of peripheral nerve regeneration to study neurite growth. *FASEB J* 17:2124–6
16. Gingras M, Paradis I, Berthod F (2003b) Nerve regeneration in a collagen–chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice. *Biomaterials* 24:1653–61
17. Hou SY, Zhang HY, Quan DP, Liu XL, Zhu JK (2006) Tissue-engineered peripheral nerve grafting by differentiated bone marrow stromal cells. *Neuroscience* 140:101–10
18. Katims JJ, Naviasky EH, Ng LK, Rendell M, Bleecker ML (1986) New screening device for assessment of peripheral neuropathy. *J Occup Med* 28:1219–21
19. Komiyama T, Nakao Y, Toyama Y, Asou H, Vacanti CA, Vacanti MP (2003) A novel technique to isolate adult Schwann cells for an artificial nerve conduit. *J Neurosci Methods* 122:195–200
20. L’Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA (1998) A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 12:47–56
21. Lykissas MG, Batistatou AK, Charalabopoulos KA, Beris AE (2007) The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. *Curr Neurovasc Res* 4:143–51
22. Malenfant A, Forget R, Amsel R, Papillon J, Frigon JY, Choiniere M (1998) Tactile, thermal and pain sensibility in burned patients with and without chronic pain and paresthesia problems. *Pain* 77:241–51
23. Masson EA, Veves A, Fernando D, Boulton AJ (1989) Current perception thresholds: a new, quick, and reproducible method for the assessment of peripheral neuropathy in diabetes mellitus. *Diabetologia* 32:724–8

24. Nedelec B, Hou Q, Sohbi I, Choiniere M, Beaugard G, Dykes RW (2005) Sensory perception and neuroanatomical structures in normal and grafted skin of burn survivors. *Burns* 31:817–30
25. Oudega M, Xu XM (2006) Schwann cell transplantation for repair of the adult spinal cord. *J Neurotrauma* 23:453–67
26. Tremblay PL, Hudon V, Berthod F, Germain L, Auger FA (2005) Inoculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am J Transplant* 5:1002–10
27. Ward RS, Tuckett RP (1991) Quantitative threshold changes in cutaneous sensation of patients with burns. *J Burn Care Rehabil* 12:569–75
28. Ward RS, Tuckett RP, English KB, Johansson O, Saffle JR (2004) Substance P axons and sensory threshold increase in burn-graft human skin. *J Surg Res* 118:154–60

2 Annexe 2 : Peau reconstruite par génie tissulaire et régénération nerveuse après un traitement pour brûlure

Avant-Propos

Ce chapitre fait l'objet d'un article de revue intitulé *Tissue-engineered skin and nerve regeneration in burn treatment* qui est accepté pour être publié dans la revue *Stem Cells Translational Medicine*.

Je l'ai écrit durant mon doctorat avec l'aide de collègues ainsi qu'en collaboration et sous la supervision du Dr François Berthod.

2.1 Résumé

Les brûlures détruisent non seulement la fonction barrière de la peau, mais elles modifient aussi la perception de la douleur, de la température et du toucher. Différentes stratégies ont été développées pour couvrir les brûlures profondes et étendues dans le but ultime de régénérer la fonction barrière de l'épiderme tout en récupérant un aspect esthétique acceptable. Cependant, les patients se plaignent souvent d'une perte de sensibilité de la peau et même, de douleurs chroniques. La régénération nerveuse cutanée peut se produire à partir des terminaisons nerveuses du lit de la plaie, mais elle est souvent compromise par la formation de cicatrices ou par une guérison anarchique. La récupération des perceptions sensorielles normales est un défi majeur à résoudre en vue d'améliorer la qualité de vie du patient. En outre, le réseau de nerfs cutanés pourrait jouer un rôle important dans l'homéostasie épidermique. Alors que le processus de régénération des nerfs a été largement étudié dans le contexte de transections nerveuses, très peu d'études visant à élaborer des stratégies pour l'améliorer ont été réalisées dans le cadre de la guérison cutanée. Dans cette revue, nous décrivons brièvement les caractéristiques et les traitements actuels pour les brûlures étendues, y compris la méthode de peaux reconstruites par génie tissulaire. Nous décrivons aussi certaines approches visant à améliorer la régénération des nerfs cutanés et nous suggérons des utilisations possibles des cellules souches adultes autologues dérivées de la peau humaine pour améliorer la récupération tactile.

2.2 Tissue-engineered skin and nerve regeneration in burn treatment

Mathieu Blais, Rémi Parenteau-Bareil, Sébastien Cadau, François Berthod*.

Centre LOEX de l'Université Laval, Centre de recherche du CHU de Québec, and
Département de Chirurgie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec (Québec),
Canada

Key words : nerve regeneration, skin, burns, Schwann cells, hair shafts, stem cells

Abstract

Burns not only destroy the barrier function of the skin, they also alter the perception of pain, temperature and touch. Different strategies have been developed over the years to cover deep and extensive burns with the ultimate goal of regenerating the barrier function of the epidermis while recovering an acceptable esthetic aspect. However, patients often complain about a loss of skin sensation and even, cutaneous chronic pain. Cutaneous nerve regeneration can occur from the nerve endings of the wound bed, but it is often compromised by scar formation or anarchic wound healing. Restoration of pain, temperature and touch perceptions should now be a major challenge to solve in order to improve patient's quality of life. In addition, the cutaneous nerve network has been recently highlighted to play an important role in epidermal homeostasis and may be essential at least in the early phase of wound healing through the induction of neurogenic inflammation. While the nerve regeneration process was largely studied in the context of nerve transections, very few studies aimed to develop strategies to improve it in the context of cutaneous wound healing. In this concise review, we provide a description of the characteristics and current treatments for extensive burns, including tissue-engineered skin approaches to improve cutaneous nerve regeneration and describe prospective uses for autologous skin-derived adult stem cells to enhance skin sense of touch recovery.

Characteristics and treatment of burn injuries

Whereas skin is the largest organ of the body, it is rarely seen as a vital one like the brain or the heart. However, a destruction of only 15% of skin total body surface area is sufficient to be life threatening. Indeed, the rupture of the skin barrier function induces massive water loss that will rapidly cause a deadly hypovolemic shock. In addition, burn is the most traumatic injury human body can bear, and induces a complete disruption of its homeostasis, including immunodepression, massive hypermetabolism and vascular hyperpermeability, which enhances oedema formation [1]. Major improvements in resuscitation techniques in the last 50 years enable the survival of patients with more than 90% of total body surface area burned. Then arises the challenge to cover these deep and extensive burns as fast as possible to protect the patients from septicemia, and achieve the best functional and esthetic healing possible.

There are about 15 to 20 000 hospitalizations per year for acute burn injuries in the U.S recorded by the American Burn Association. Most of them were caused by fire/flames, scald, electricity and chemical products. Duration and intensity of exposure to these different factors as well as location and depth of the trauma determine the gravity of burn injuries. The first degree burn is superficial one that only affects the epidermis. Superficial second degree burn also affect in part the dermis while preserving some epidermal rete ridges enabling spontaneous scarless healing. Deep second degree burn induces the complete destruction of epidermis, but preserves hair follicles in the deep dermis from which epidermal healing can be initiated, but will promote hypertrophic scar formation. Third degree burn destroys both epidermis and dermis up to the hypodermis and necessitates a skin graft coverage. A fourth degree burn can also be distinguished when underlying organs such as muscles, tendons and bones are altered [2].

The gold standard to cover deep burns is to harvest split-thickness skin from unburned areas and graft it on wounds. This will inflict a superficial second degree burn at the donor site, which can heal in two weeks without scarring, while promoting a good quality coverage of the autograft skin on burns. However, the use of this method is limited if

patients have only few unburned areas left [1]. It necessitates to wait for donor sites and grafted wounds healing to harvest additional split-thickness skin. However, time is life for burn patients because uncovered wounds are at high risks of infection, highlighting the needs for alternative burn coverage therapies.

Challenge of tactile and sensory recovery

The skin is a highly sensitive organ. It is densely innervated with different types of nerve endings, which discriminate between pain, temperature and sense of touch. When a deep burn occurs, cutaneous nerves and their sensory corpuscles are destroyed while the sensory neuron cell bodies persist in the dorsal root ganglia (DRG) along the spinal cord. The cutaneous sensory nerves are broadly classified according to diameter and speed of impulse as A β , A δ and C nerve fibers, respectively from the biggest and fastest to the smallest and slowest. They are associated with Schwann cells, which secrete a basal lamina around them and also produce myelin sheaths on the larger A β and A δ fibers. Mechanical stimuli are detected via mechanoreceptors associated with sensory corpuscles through A β fibers (and about 20% of A δ fibers), temperature, via the thermoreceptors through A δ and C fibers, and pain via the nociceptors through A δ and C fibers (For an extensive review on skin innervation, see [5]).

After a deep burn injury, cutaneous nerve regeneration will occur with the migration of new nerve fibers from the wound bed or from the collateral sprouting of nerve fibers from adjacent non-uninjured area. This nerve regeneration process is imperfect. It was reported that 71% of extensively burned victims suffer from abnormal sensations and 36% from chronic pain [6]. Victims often suffer permanent sensory deficits [7-9]. In addition, deficits are more pronounced if there was a skin graft [10], perhaps because these grafts were performed on the deepest burned areas. Among the possible causes of this abnormal sensitivity are: the lack of nerve fibers [11, 12], a reinnervation mostly made of A δ and C fibers with a deficit in A β fibers [13] and the lack of sensory unit such as the sensory corpuscles and hair follicles [14]. Among other possible causes, there may be changes in the processing of information by the central nervous system [15, 16]. Hypersensitivity (allodynia), even in unburned parts of the body, may suggest that changes in the processing

of sensory information by the central nervous system may contribute to some extent to the abnormal sensitivity [17].

Basic principles in the development of a tissue-engineered skin

The most promising technique to fulfill the clinical needs to cover deep and extensive burns is to reconstruct a complete skin by tissue engineering using the patient's own cells. The primary therapeutic concern is a rapid recovery of the skin barrier function to diminish water loss and prevent infection when the access to autografts is limited. This aim can be achieved by reconstruction of the epidermis. Most protocols to obtain autologous epidermis suitable for grafting from cultured keratinocytes are derived from the pioneering work of J-G. Rheinwald and H. Green in the mid-seventies [18]. To rebuild epidermal equivalents, keratinocytes purified from a small skin biopsy are grown on lethally irradiated murine 3T3 fibroblasts until they form a cell sheet. These 3T3 cells have an inhibitory influence on the multiplication of contaminating fibroblasts from the donor tissue. The addition to the medium of cholera toxin, that increase cellular cyclic AMP (cAMP), and of epidermal growth factor (EGF), that promote proliferation, allow for a large-scale amplification of keratinocytes in vitro [19, 20]. Epithelial sheets can be directly grafted on donor sites to accelerate and improve their regeneration in order to harvest split-thickness autografts faster and several times from the same donor site. Alternatively, epithelial sheets can also be grafted alone on debrided burns, but with less optimal healing quality or in combination with a widely meshed split-thickness autograft for a better esthetic result [21-24].

However, the reconstruction of a complete tissue-engineered skin featuring both the epidermis and the dermis is the ultimate goal to improve the healing quality and avoid scar formation. The stability of the attachment of the epidermis to a well vascularized underlying dermis is a critical issue [25-28]. The dermis would also provide beneficial mechanical and paracrine support during the in vitro reconstruction and the transplantation. But while the keratinocytes naturally organize in basal and suprabasal cell layers while cultured on a plastic dish, fibroblasts don't in conventional culture conditions. For that

reason, most of the methods developed to reconstruct a dermis rely on the culture of fibroblasts in a scaffold to build a three dimensional tissue.

The biomaterial used in the dermal portion can be natural, synthetic or both and made of autologous or allogenic fibroblasts [29]. Collagens type I and III being the major proteins of the skin extracellular matrix (ECM), they were widely used to reconstruct dermal compartments. The first full-thickness skin was reconstructed using a fibroblast-populated collagen gel seeded with keratinocytes [30]. Several biomaterials made of collagens or biodegradable polymers were marketed for the reconstruction of the skin, notably collagen sponges [31]. As an alternative method, a dermal construct made of an ECM secreted and assembled by the fibroblasts themselves was developed after addition in the culture medium of ascorbate [32]. Fibroblasts synthesizing collagen naturally, this feature can be exploited to produce fibroblast sheets that can be stacked together to achieve thicker dermal compartment prior to keratinocytes seeding [33]. This method enables the production of a tissue-engineered skin exclusively made of the patient's cells.

Our approach to enhance cutaneous nerve regeneration

After nerve endings destruction following deep burns, axonal migration can occur from the wound bed into the healed skin. However, this process takes place in absence of the critical guidance cues derived from cutaneous neuroanatomical structures such as hair follicles and sensory corpuscles destroyed in deep burns [34]. In addition, anarchic remodeling of the dermal ECM during wound healing may impair nerve migration. If most of current strategies to reconstruct skin result in the development of tissues without appendage, a well-structured ECM may facilitate tissue innervation. In our group, we investigated whether a tissue-engineered skin could be innervated after graft in mice. We used a reconstructed skin made of human keratinocytes seeded on a collagen sponge populated with fibroblasts promoting the deposition and remodeling of a highly physiological ECM [35, 36]. We first showed that this connective tissue facilitates axonal migration in vitro by seeding dorsal root ganglia-derived mouse sensory neurons at the bottom of the tissue-engineered skin (Figure 1B) [37]. When the reconstructed skin was transplanted on immunodeficient mice, nerve fibers from the wound bed were observed to migrate into the transplant after 2 months [38]. Schwann cells were also detected migrating in the graft and

forming bungner bands-like structure to guide axonal migration [38]. These results showed that a well-structured tissue-engineered skin can enhance nerve regeneration.

Schwann cells and the basement membrane components they produce such as laminin appear to play a critical role in peripheral nerve regeneration [39]. We investigated whether nerve regeneration could be improved by adding laminin to the collagen sponge used to reconstruct skin [40]. Four months after transplantation, there were 7 times more neurofilament M-positive nerve fibers migrating in the graft in the condition enriched with 10 Pg laminin per sponge. There was also a significant improvement in the current perception threshold of the transplant for the A β and A δ nerve fibers in all grafts enriched with laminin in respect to the control. In addition, whereas a larger number of nerve fibers was observed in the laminin group compared to normal mouse skin, it did not induce skin hyperesthesia [40]. These results showed that it is possible to increase nerve migration in a tissue-engineered organ using laminin.

Since laminin can be secreted by Schwann cells and these cells are major contributors to the nerve regeneration process, we hypothesized that the addition of Schwann cells in our tissue-engineered skin could also promote nerve regeneration. We extracted Schwann cells from mouse peripheral nerves and incorporated them with the fibroblasts in our reconstructed skin model innervated in vitro with mouse sensory neurons. Schwann cells spontaneously localized along nerve fibers (Figure 1C,D) and achieved the formation of myelin sheaths around axons in vitro as assessed by transmission electron microscopy [41]. In addition, they promoted a twofold increase in the number of sensory fibers migrating in the reconstructed skin as compared with the control without Schwann cells. Once our tissue-engineered skin was transplanted on nude mice, Schwann cells induced a 1.8 fold increase in the number of nerve fibers migrating in the graft 60 days after transplantation, and promoted a sensory recovery of the transplant with a current perception threshold similar to that of normal skin for the large and myelinated A β -sensory fibers (responsible for the sense of touch), in contrast with transplants without Schwann cells [41]. Overall, the addition of laminin or Schwann cells in reconstructed skin promoted a significant

improvement in nerve regeneration for the $A\beta$ and $A\delta$ nerve fibers. This improvement is interesting since there is a deficit in the regeneration of these large nerve fibers in deep and extensive burns after skin grafts [13]. However, the $A\beta$ fibers will not be able to detect sense of touch perception as long as they will not be connected to a tactile sensor such as a sensory corpuscle (Meissner, Pacini, Ruffini and Merkel touch dome) or a hair follicle. While how to reconstruct a corpuscle remains largely unknown, attempts to incorporate hair follicles in tissue-engineered skin have already been investigated [42]. Using a tissue-engineered skin with mouse hair bud-like structures, we analyzed the impact of these appendages on axonal migration. We showed that hair bud-like structures established in vitro specific guiding cues to promote a preferential axonal migration around them, but failed to make mature hairs. When this reconstructed skin was transplanted on mice, hair buds successfully developed into hairs and their presence accelerated nerve regeneration (occurring after one month instead of 2) and oriented it to preferentially innervate hair shafts (Figure 1E) [43]. This result showed that it is possible to orient nerve regeneration in a tissue-engineered organ using specific cells that can establish neuronal guiding cues.

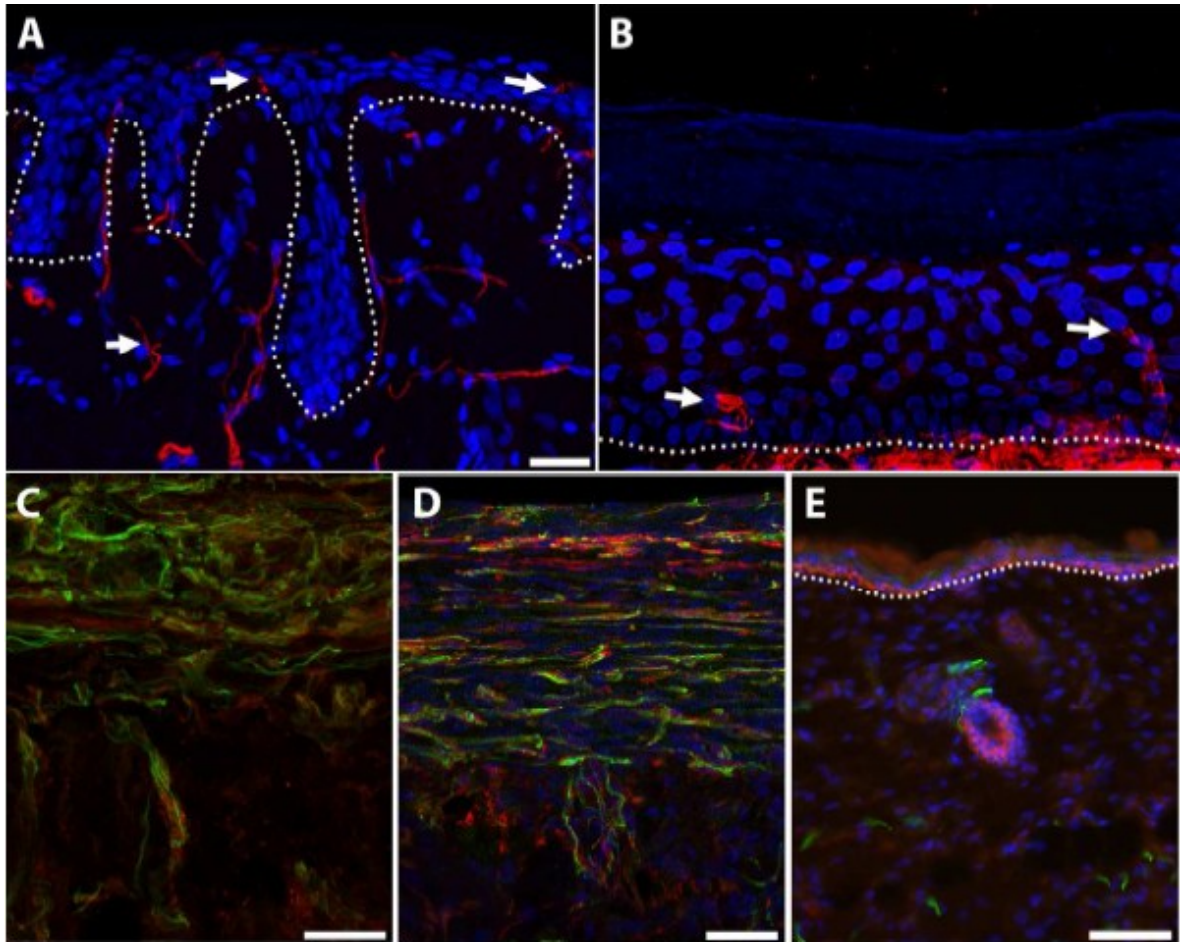


Figure 1. Addition of Schwann cells and hair buds to improve nerve regeneration in a tissue-engineered skin.

(A-B) Intraepidermal nerve fibers were stained for protein gene product 9.5 in normal human skin (A, red) and tissue-engineered skin after 21 days of in vitro innervation (B, red; cell nuclei in blue). The dotted lines represent the dermo epidermal junction. (C) The addition of Schwann cells (green) in the tissue-engineered skin induces the deposition of laminin in vitro (red). (D) Nerve fibers (green) stick to the laminin (red) produced by Schwann cells. (E) In reconstructed skin, hair buds like structures included prior to graft (Keratin 6, in red, below the dotted line delineating the epidermis) attract nerve fibers (Neurofilament-M, green) from the wound bed one month after transplantation on mice. Bars : A-B : 40 μm , C : 30 μm , D : 50 μm , E: 60 μm .

Potential in the use of patient's stem cells to produce Schwann cells and/or hair follicles

From a clinical perspective, the major limitation to the addition of a complementary cell types such as Schwann cells to promote nerve regeneration in a tissue-engineered skin is their availability. Indeed, while epidermal stem cells persist during in vitro culture, allowing for a large amplification of keratinocytes, the isolation of patient's Schwann cells is a challenge. They can be obtained from a peripheral nerve biopsy, but it causes morbidity.

The possibility of using autologous stem cells isolated from skin to generate Schwann cells represent a promising strategy to optimize tissue-engineered skin innervation. The technology of induced pluripotent stem cells (iPS) is a promising strategy to obtain stem cells from a small skin biopsy, but it is not ready for clinical application on short term [44]. However, adult skin already contains different populations of stem cells, including epidermal and melanocytes stem cells [45, 46], skin-derived precursor cells (SKPs) [47, 48] and mesenchymal stem cells (MSCs). While the epidermal and melanocytes stem cells were not shown to have a large potential of differentiation, SKPs and MSCs are multipotent.

SKPs derive from the neural crest and are located mainly in the follicle dermal papillae where they contribute to the homeostasis of the skin and of the hair follicles in the adult [47, 48]. We successfully isolated these precursors from adult human skin biopsies and demonstrated their potential to differentiate into mature neurons [49]. These precursors were also shown to have the potential to differentiate into Schwann cells [50].

Multipotent mesenchymal stem cells are present in the dermis in proximity of hair follicles in perivascular sites that may act as a niche in human scalp skin [51].

Adipose-derived stem cells (ASCs) are multipotent cells characterized by the expression of mesenchymal stem cells markers. They are present in the hypodermis and they can be enriched in cell culture from the stromal vascular fraction of homogenized fat tissue [52]. The use of stem cells from adipose tissue is advantageous because they can be obtained by

liposuction, a common and minimally invasive procedure. In addition, this cell population is abundant and has already been grafted in humans [52]. Their potential of differentiation into Schwann cell has also been demonstrated [53].

Developing a tissue-engineered skin with hair follicles would be a promising approach to enhance sense of touch recovery after transplantation. However, generating hair follicles from the differentiation of stem cells *in vitro* is a challenge for functional skin reconstruction. The addition of hair follicles would not only improve nerve regeneration, it would also provide a niche for stem cells involved in hair renewal and wound healing [54, 55]. *De novo* formation of hair follicle *in vivo* was shown to be possible using epithelial and mesenchymal cells from embryos as well as new-born mice or stem cells from the adult bulge area [56, 57]. Recently, the regeneration of both pelage hair follicle and vibrissae from suspensions of dorsal embryonic skin plus epithelial bulge cells and dermal papilla cells cultured under the subrenal capsule was shown in an elegant study [3, 58]. Long term cultured dermal papilla cells from vibrissae are also able to induce *de novo* hair follicle development in athymic mice without cell suspension [59]. Tissue engineered skin with hair follicles could be successfully obtained after their engraftment using neonatal multipotent skin precursor cells [60]. The most advanced *in vitro* model for hair follicle regeneration is based on dermal papilla cells. These cells are cultured in aggregate, then keratinocytes from outer root sheath and hair follicle melanocyte are added to form microfollicles *in vitro* which result in hair shaft formation [61]. Taken together, these data showed that stem cells from the bulge area or from dermal papilla as well as embryonic back skin suspension cells owned hair inducing ability *in vitro*. The obtention of hair shaft in reconstructed skin *in vitro*, prior to the graft, should therefore be achievable.

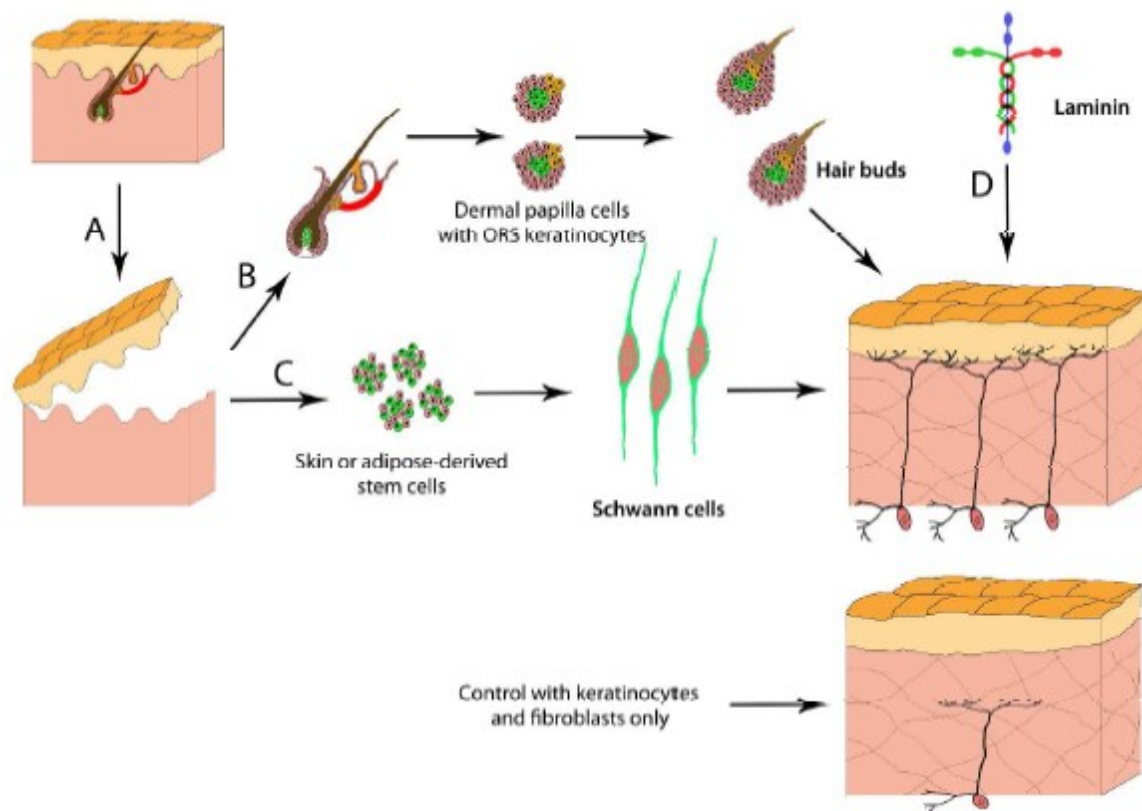


Figure 2. Schematic representation of different strategies to enhance nerve regeneration in a tissue-engineered skin.

(A) All the cellular components should preferentially be isolated from a single uninjured skin biopsy. (B) Dermal papilla cells cultured with outer root sheath keratinocytes of hair follicles and melanocytes (according to the differentiation method of Lindner and al. [61]) could be added to promote hair buds formation and growth and functional mechanoreceptor regeneration. (C) Skin-derived precursor cells or adipose-derived mesenchymal stem cells could be differentiated into Schwann cells prior to be included in the tissue-engineered skin in order to promote nerve regeneration. (D) Laminin can be embedded into a biomaterial subsequently used to prepare the tissue-engineered skin. Any of these possibilities (B–D) will promote a better nerve regeneration in grafted skin, compared with the same tissue-engineered skin only made of fibroblasts and keratinocytes.

Conclusion

After the clinical success of autologous epithelial sheets for the coverage of deep and extensive burns, the next step will be the transplantation of patient-derived tissue-engineered skin that promotes a better healing quality. Now that the essential cutaneous barrier function can be recovered with acceptable esthetic outcome, the question of how improving pain, temperature and sense of touch perception of these large skin areas is arising. Different strategies can be followed, from the easiest to the most complex (Figure 2). At the beginning, a well-structured connective tissue ECM is the basis to facilitate nerve migration while avoiding scar formation from the wound bed. Then, the simple combination into the transplant of highly stable and large molecules such as laminin, which are known to enhance axonal migration, could be an easy way to ensure a general, but not specifically guided, nerve regeneration. A more complex approach relying on the isolation and differentiation of patient-derived stem cells into Schwann cells, could lead to better controlled nerve regeneration in the transplant (Figure 2). If these strategies will allow the recovery of the pain and temperature perception, they will not meet the challenge of sense of touch recovery. To reach that aim, the reconstruction in the tissue-engineered skin of tactile sensors such as sensory corpuscles and hair follicles is necessary. The incorporation of hair follicles derived from autologous stem cells remains an exciting challenge to investigate for the development of the next generation of tissue-engineered skin and should be very promising in terms of sense of touch recovery in addition to an improvement of the skin esthetic aspect.

Acknowledgments

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR grant MOP-106429). Mathieu Blais is recipient from a Doctoral scholarship from Fonds de recherche du Québec en Santé (FRQS).

References

1. Berthod F, Rouabhia M. Exhaustive review of clinical alternatives for damaged skin replacement. In: Rouabhia M, ed. Skin substitute production by tissue engineering: clinical and fundamental applications. Austin: Landes Bioscience; 1997:23-45.
2. MendezEastman S. Burn injuries. *Plast Surg Nurs* 2005;25:133-139.
3. Toyoshima KE, Asakawa K, Ishibashi N, et al. Fully functional hair follicle regeneration through the rearrangement of stem cells and their niches. *Nat Commun*;3:784.
4. Auger FA, Lacroix D, Germain L. Skin substitutes and wound healing. *Skin Pharmacol Physiol* 2009;22:94-102.
5. Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, et al. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev* 2006;86:1309-1379.
6. Malenfant A, Forget R, Papillon J, et al. Prevalence and characteristics of chronic sensory problems in burn patients. *Pain* 1996;67:493-500.
7. Hermanson A, Jonsson CE, Lindblom U. Sensibility after burn injury. *Clin Physiol* 1986;6:507-521.
8. Ward RS SJ, Schnebly WA, Hayes-Lundy C, Reddy R. Sensory loss over grafted areas in patients with burns. *J Burn Care Rehabil* 1989;10(6):536-538.
9. Ward RS, Tuckett RP. Quantitative threshold changes in cutaneous sensation of patients with burns. *J Burn Care Rehabil* 1991;12:569-575.
10. Malenfant A, Forget R, Amsel R, et al. Tactile, thermal and pain sensibility in burned patients with and without chronic pain and paresthesia problems. *Pain* 1998;77:241-251.
11. Altun V, Hakvoort TE, van Zuijlen PP, et al. Nerve outgrowth and neuropeptide expression during the remodeling of human burn wound scars. A 7-month follow-up study of 22 patients. *Burns* 2001;27:717-722.
12. Stella M, Calcagni M, Teich-Alasia S, et al. Sensory endings in skin grafts and scars after extensive burns. *Burns* 1994;20:491-495.
13. Ward RS, Tuckett RP, English KB, et al. Substance P axons and sensory threshold increase in burn-graft human skin. *J Surg Res* 2004;118:154-160.
14. Nedelec B, Hou Q, Sohbi I, et al. Sensory perception and neuroanatomical structures in normal and grafted skin of burn survivors. *Burns* 2005;31:817-830.

15. Coderre TJ, Melzack R. Increased pain sensitivity following heat injury involves a central mechanism. *Behav Brain Res* 1985;15:259-262.
16. Coderre TJ, Melzack R. Cutaneous hyperalgesia: contributions of the peripheral and central nervous systems to the increase in pain sensitivity after injury. *Brain Res* 1987;404:95-106.
17. Sang CN, Gracely RH, Max MB, et al. Capsaicin-evoked mechanical allodynia and hyperalgesia cross nerve territories. Evidence for a central mechanism. *Anesthesiology* 1996;85:491-496.
18. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:5665-5668.
19. Rheinwald JG, Green H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature* 1977;265:421-424.
20. Green H. Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view. *Cell* 1978;15:801-811.
21. Gallico GG, 3rd, O'Connor NE, Compton CC, et al. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984;311:448-451.
22. De Luca M, Albanese E, Bondanza S, et al. Multicentre experience in the treatment of burns with autologous and allogenic cultured epithelium, fresh or preserved in a frozen state. *Burns* 1989;15:303-309.
23. Donati L, Magliacani G, Bormioli M, et al. Clinical experiences with keratinocyte grafts. *Burns* 1992;18 Suppl 1:S19-26.
24. Gallico GG, 3rd, O'Connor NE. Cultured epithelium as a skin substitute. *Clin Plast Surg* 1985;12:149-157.
25. Cuono C, Langdon R, McGuire J. Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury. *Lancet* 1986;1:1123-1124.
26. Michel M, L'Heureux N, Pouliot R, et al. Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1999;35:318-326.
27. Boyce ST, Goretsky MJ, Greenhalgh DG, et al. Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autograft for treatment of full-thickness burns. *Ann Surg* 1995;222:743-752.
28. Clugston PA, Snelling CF, Macdonald IB, et al. Cultured epithelial autografts: three years of clinical experience with eighteen patients. *J Burn Care Rehabil* 1991;12:533-539.
29. Place ES, Evans ND, Stevens MM. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat Mater* 2009;8:457-470.

30. Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, et al. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* 1981;211:1052-1054.
31. Ruszczak Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1595-1611.
32. van der Veen VC, Boekema BK, Ulrich MM, et al. New dermal substitutes. *Wound Repair Regen* 2011;19 Suppl 1:s59-65.
33. Auger FA, Remy-Zolghadri M, Grenier G, et al. A truly new approach for tissue engineering: the LOEX self-assembly technique. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2002:73-88.
34. Peters EM, Botchkarev VA, Muller-Rover S, et al. Developmental timing of hair follicle and dorsal skin innervation in mice. *J Comp Neurol* 2002;448:28-52.
35. Berthod F, Germain L, Guignard R, et al. Differential expression of collagens XII and XIV in human skin and in reconstructed skin. *J Invest Dermatol* 1997;108:737-742.
36. Berthod F, Germain L, Li H, et al. Collagen fibril network and elastic system remodeling in a reconstructed skin transplanted on nude mice. *Matrix Biol* 2001;20:463-473.
37. Gingras M, Bergeron J, Dery J, et al. In vitro development of a tissue-engineered model of peripheral nerve regeneration to study neurite growth. *FASEB J* 2003;17:2124-2126.
38. Gingras M, Paradis I, Berthod F. Nerve regeneration in a collagen-chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice. *Biomaterials* 2003;24:1653-1661.
39. Hoke A. Mechanisms of Disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? *Nat Clin Pract Neurol* 2006;2:448-454.
40. Caissie R, Gingras M, Champigny MF, et al. In vivo enhancement of sensory perception recovery in a tissue-engineered skin enriched with laminin. *Biomaterials* 2006;27:2988-2993.
41. Blais M, Grenier M, Berthod F. Improvement of nerve regeneration in tissue-engineered skin enriched with schwann cells. *J Invest Dermatol* 2009;129:2895-2900.
42. Larouche D, Cuffley K, Paquet C, et al. Tissue-engineered skin preserving the potential of epithelial cells to differentiate into hair after grafting. *Tissue Eng Part A*;17:819-830.
43. Gagnon V, Larouche D, Parenteau-Bareil R, et al. Hair follicles guide nerve migration in vitro and in vivo in tissue-engineered skin. *J Invest Dermatol*;131:1375-1378.

44. Sipp D. Challenges in the clinical application of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2010;1:9.
45. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:207-217.
46. Nishimura EK. Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011;24:401-410.
47. Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol* 2004;6:1082-1093.
48. Biernaskie J, Paris M, Morozova O, et al. SKPs derive from hair follicle precursors and exhibit properties of adult dermal stem cells. *Cell Stem Cell* 2009;5:610-623.
49. Gingras M, Champigny MF, Berthod F. Differentiation of human adult skin-derived neuronal precursors into mature neurons. *J Cell Physiol* 2007;210:498-506.
50. McKenzie IA, Biernaskie J, Toma JG, et al. Skinderived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *J Neurosci* 2006;26:6651-6660.
51. Yamanishi H, Fujiwara S, Soma T. Perivascular localization of dermal stem cells in human scalp. *Exp Dermatol* 2012;21:78-80.
52. Tobita M, Orbay H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. *Discov Med* 2011;11:160-170.
53. Kaewkhaw R, Scutt AM, Haycock JW. Anatomical site influences the differentiation of adipose-derived stem cells for Schwann-cell phenotype and function. *Glia* 2011;59:734-749.
54. Ito M, Yang Z, Andl T, et al. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* 2007;447:316-320.
55. Oshima H, Rochat A, Kedzia C, et al. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* 2001;104:233-245.
56. Zheng Y, Du X, Wang W, et al. Organogenesis from dissociated cells: generation of mature cycling hair follicles from skin-derived cells. *J Invest Dermatol* 2005;124:867-876.
57. Zheng Y, Nace A, Chen W, et al. Mature hair follicles generated from dissociated cells: a universal mechanism of folliculoneogenesis. *Dev Dyn* 2010;239:2619-2626.
58. Asakawa K, Toyoshima KE, Ishibashi N, et al. Hair organ regeneration via the bioengineered hair follicular unit transplantation. *Sci Rep*;2:424.
59. Osada A, Iwabuchi T, Kishimoto J, et al. Long-term culture of mouse vibrissal dermal papilla cells and de novo hair follicle induction. *Tissue Eng* 2007;13:975-982.

60. Lee LF, Jiang TX, Garner W, et al. A simplified procedure to reconstitute hair-producing skin. *Tissue Eng Part C Methods*;17:391-400.

61. Lindner G, Horland R, Wagner I, et al. De novo formation and ultra-structural characterization of a fiber-producing human hair follicle equivalent in vitro. *J Biotechnol* 2011;152:108-112.

3 Annexe 3 : Le réseau vasculaire guide la migration des précurseurs neuronaux dans le cerveau adulte antérieur des mammifères par l'intermédiaire du BDNF.

Avant-Propos

Ce chapitre fait l'objet d'un article intitulé *Vasculature Guides Migrating Neuronal Precursors in the Adult Mammalian Forebrain via Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling* qui est publié dans la revue *Journal of Neuroscience*, volume 29, pages 4172-88.

Ce même article est aussi disponible en ligne :

<http://www.jneurosci.org/content/29/13/4172>

Ma contribution à ce manuscrit fut de réaliser la modélisation d'un réseau vasculaire afin de reproduire in vitro la migration des neuroblastes sur un réseau vasculaire. J'ai également vérifié la production de BDNF dans le modèle.

3.1 Résumé

Les précurseurs neuronaux adultes possèdent la remarquable capacité de migrer sur de longues distances depuis la partie postérieure (zone sous-ventriculaire) jusqu'au bulbe olfactif (OB), dans la partie antérieure du cerveau. Nos connaissances des mécanismes qui empêchent les précurseurs neuronaux de s'éloigner du flux migratoire et d'organiser cette migration à longue distance est incomplète. Ici, nous montrons que les vaisseaux sanguins délimitent précisément le flux migratoire des nouveaux neurones dans le cerveau antérieur des mammifères adultes. En utilisant des techniques d'imagerie vidéo en temps réel pour observer la migration cellulaire sur des tranches fines, nous avons pu démontrer que les précurseurs neuronaux se maintiennent dans le flux migratoire et sont guidés vers l'OB par les vaisseaux sanguins. Ces derniers servent de substrat physique pour les neuroblastes en migration. Nos données suggèrent que les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins synthétisent le facteur neurotrophique BDNF, qui favorise la migration neuronale par l'intermédiaire de p75NTR exprimé sur les neuroblastes. Nous avons observé que le GABA libéré par les neuroblastes induit une insertion Ca^{2+} -dépendante du récepteurs TrkB sur la membrane plasmique des astrocytes ce qui piège le BDNF extracellulaire. Nous supposons que cela module la disponibilité du BDNF qui autrement serait piégé par les astrocytes. Le BDNF ne pourrait ainsi lier p75NTR sur les cellules en migration, les rendant stationnaires. Nos résultats fournissent de nouveaux éléments sur l'organisation fonctionnelle des substrats qui facilitent le voyage à longue distance des précurseurs neuronaux adultes.

3.2 Vasculature Guides Migrating Neuronal Precursors in the Adult Mammalian Forebrain via Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling

Marina Snappyan^{1,*}, Morgane Lemasson^{1,*}, Monika S. Brill^{3,4}, Mathieu Blais⁵, Mireille Massouh^{1,2}, Jovica Ninkovic^{3,4}, Claude Gravel^{2,6}, François Berthod⁵, Magdalena Götz^{3,4}, Philip A. Barker⁷, André Parent², and Armen Saghatelian^{1,6}

¹The Cellular Neurobiology Unit and ²The Systemic Neurobiology Unit, Centre de Recherche Université Laval Robert-Giffard, Québec, Québec, Canada G1J 2G3 and ³Department of Physiological Genomics, Institute of Physiology and Center for Integrated Protein Science Munich, Ludwig Maximilian University Munich, D-80336 Munich, Germany and ⁴Institute for Stem Cell Research, Helmholtz Zentrum München–National Research Center for Environmental Health, D-85764 Neuherberg/Munich, Germany and ⁵Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale, Centre Hospitalier Affilié Universitaire de Québec, Département de Chirurgie, Université Laval, Hôpital du Saint-Sacrement, Québec, Canada G1S 4L8 and ⁶Département de Psychiatrie, Université Laval, Québec, Québec, Canada G1K 7P4 and ⁷Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Québec, Canada H3A 2B4

Abstract

Adult neuronal precursors retain the remarkable capacity to migrate long distances from the posterior (subventricular zone) to the most anterior [olfactory bulb (OB)] parts of the brain. The knowledge about the mechanisms that keep neuronal precursors in the migratory stream and organize this long-distance migration is incomplete. Here we show that blood vessels precisely outline the migratory stream for new neurons in the adult mammalian forebrain. Real-time video imaging of cell migration in the acute slices demonstrate that neuronal precursors are retained in the migratory stream and guided into the OB by blood vessels that serve as a physical substrate for migrating neuroblasts. Our data suggest that endothelial cells of blood vessels synthesize brain-derived neurotrophic factor (BDNF) that fosters neuronal migration via p75NTR expressed on neuroblasts. Interestingly, GABA released from neuroblasts induces Ca^{2+} -dependent insertion of high-affinity TrkB receptors on the plasma membrane of astrocytes that trap extracellular BDNF. We hypothesize that this renders BDNF unavailable for p75NTR-expressing migrating cells and leads to their entrance into the stationary period. Our findings provide new insights into the functional organization of substrates that facilitate the long-distance journey of adult neuronal precursors.

Introduction

Since the discovery of neuronal progenitors in the adult brain approximately four decades ago (Altman and Das, 1966; Hinds, 1968), a key question in the field has been how these neuronal precursors migrate long distances, through complex brain territories, from the posterior to the most anterior parts of the brain. Neuronal precursors are generated in the subventricular zone (SVZ) and migrate first tangentially, in chains, along the rostral migratory stream (RMS) and, once in the olfactory bulb (OB), turn to migrate radially and individually out of the RMS into the bulbar layer (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002; Lledo and Saghatelian, 2005).

Molecular signals that are involved in tangential migration of neuroblasts in the adult brain include the following: polysialated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) (Cremer et al., 1994; Ono et al., 1994; Hu et al., 1996); members of the Slit (Wu et al., 1999); ephrin-B (Conover et al., 2000) and integrin families (Murase and Horwitz, 2002; Belvindrah et al., 2007); astrocyte-derived factor of unknown identity (Mason et al., 2001); the ErbB4 (Anton et al., 2004) and prokineticin 2 (Ng et al., 2005) receptors and neuroblast-derived GABA (Bolteus and Bordey, 2004). Reelin and tenascin-R, two extracellular matrix molecules, contribute to radial migration of neuronal precursors (Hack et al., 2002; Saghatelian et al., 2004). Despite the extensive investigation of the molecular signals involved in the neuronal migration in the adult brain, our knowledge of how the RMS is defined and how neuronal precursors find their routes toward and into OB remains incomplete.

The most widely accepted model accounting for neuronal precursor migration posits that cell movements are dictated by chemorepulsive and chemoattractive gradients. Thus, neuroblasts are forced to remain in the migratory stream as a result of the action of chemorepellent molecules secreted from neighboring territories, such as Slit released from the septum (Wu et al., 1999) and choroid plexus (Sawamoto et al., 2006), and are guided by chemoattractive molecules secreted from the OB that include prokineticin 2 (Ng et al., 2005) and glial cell line-derived neurotrophic factor (Paratcha et al., 2006). However, surgical removal of the OB does not abolish neuronal migration (Jankovski et al., 1998;

Kirschenbaum et al., 1999), suggesting that molecules secreted from the OB are not essential for neuroblasts migration in the adult RMS (Marín and Rubenstein, 2003). Furthermore, the migratory pathway of newborn cells in the adult brain has very complex curvature architecture and numerous chemorepellent molecule gradients acting in concert and with different efficiency would be required to ensure a faithful migration.

In the studies presented here, we have tested the hypothesis that neuroblasts migrate along physical substrates that topographically define the RMS. We show that blood vessels precisely outline the migratory stream for new neurons from the posterior (SVZ) to the most anterior (OB) regions of the adult brain and that they serve as a physical substrate for migrating neuroblasts in the adult brains. We identify brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a molecular signal that is released from endothelial cells of blood vessels and show that it fosters neuronal migration via p75NTR activation on neuroblasts. Interestingly, GABA released from neuroblasts leads to the insertion of high-affinity TrkB receptors on the plasma membrane of astrocytes that ensheath neuronal precursors and contact blood vessels. Consequently, astrocytes trap free extracellular BDNF. We hypothesize that, via this mechanism, neuroblasts control the amount of extracellular BDNF and, therefore, the periodicity of the migratory periods. Together, our data provide functional and mechanistic explanations for long-distance journey of new cells in the adult brain. This information may contribute to the development of new strategies to cure neurodegenerative diseases and brain trauma.

Materials and Methods

Animals.

All experiments were performed in adult 2- to 3-month-old C57BL/J6 mice (Charles River), GAD67–green fluorescent protein (GFP)-deficient mice (Ono et al., 2005), and p75NTR-deficient mice (Lee et al., 1992) in accordance with Laval Institute guidelines. TrkB floxed mice (Minichiello et al., 1999) were crossed with GlastCre::ERT2 mice (Mori et al., 2006), which carry an inducible form of Cre in the astrocyte-specific glutamate transporter (GLAST) locus. As experimental animals, TrkB^{fl/fl} GLAST::CreERT2 and control TrkB wildtype/wildtype GLAST::CreERT2 were used. Two- to 3-month-old mice received intraperitoneal injections of 1 mg of Tamoxifen, two injections per day for 5 consecutive days (Mori et al., 2006). To evaluate the proportion of cells that underwent recombination, GLAST::CreERT2 mice were crossed with reporter mice (Z/EG). Animals were kept on a 12 h light/dark cycle at constant temperature (22°C) with food and water ad libitum.

Stereotaxic injections and osmotic minipump infusions.

To label newborn neurons, GFP-encoding retrovirus was injected either to the SVZ (for analysis of cell migration in the RMS) or to the RMS (for analysis of cell migration in the OB) at the following coordinates (in mm): for the SVZ, anteroposterior, 0.75; mediolateral, 1.20; dorsoventral, 1.9; and for the RMS, anteroposterior, 2.55; mediolateral, 0.82; dorsoventral, 2.9. BDNF (100 ng; Peprotech) and vehicle (NaCl, 0.9%) were injected stereotaxically to the striatum at the following coordinates (in mm): anteroposterior, 0.9; mediolateral, 0.8; dorsoventral, 2.1. IgG–Fc, TrkB–Fc (10 µg/ml; 100 µl infusion volume; R & D Systems), and function-blocking antibodies for p75NTR described previously (Clary and Reichardt, 1994) were infused via 7 d osmotic minipumps (Alzet) at the following coordinates (in mm): anteroposterior, 2.55; mediolateral, 0.82; dorsoventral, 2.7. Double-stranded siSTABLE small interfering RNAs (siRNA) directed against BDNF mRNA were obtained from Dharmacon. In addition, FITC fluorescent tag was added to 5+

end of siRNA. The sense and antisense sequences of BDNF were designed as follows: sense, GAACTACCCAATCGTATGTTTT; antisense, ACATACGATTGGGTAGTTCTT. BDNF siRNA and control siRNA were infused via 7 d osmotic minipump directly to the external carotid artery. For this, mouse jugular catheter (Alzet) connected to the osmotic minipump was inserted to the external carotid artery and maintained in place with non-absorbable silk sutures. Heparin at 5 μ l was added to 100 μ l of solution containing either control or BDNF siRNAs.

Immunohistochemistry and in situ hybridization.

Immunohistochemistry was performed as described previously (Saghatelian et al., 2004). The following antibodies were used: rabbit (N-20; 1:50; Santa Cruz Biotechnology), goat (K-14; 1:50; Santa Cruz Biotechnology), and chicken (1:50; Promega) anti-human BDNF; goat anti-human (N-20; 1:50; Santa Cruz Biotechnology) and rabbit anti-mouse (1:1000; Millipore Bioscience Research Reagents) TrkB; rabbit anti-human (H-137; 1:50; Santa Cruz Biotechnology) and anti-rat (1:500; Covance and 1:500; Millipore) p75NTR; guinea-pig anti-mouse doublecortin (1:1000; Abcam); mouse anti-PSA-NCAM (1:1000; Millipore Bioscience Research Reagents); mouse anti-5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (1:200; Serotec); rabbit (1:1000; Dako) and mouse (1:1000; Millipore Bioscience Research Reagents) anti-GFAP; rabbit anti-caspase 3 (1:500; Cell Signaling Technology); and rabbit anti-Ki67 (1:1000; Abcam) and rat anti-mouse platelet/endothelial cell adhesion molecule (PECAM) (1:1000; BD Pharmingen). For some immunostainings, we used tyramide amplification kit (PerkinElmer Life and Analytical Sciences). The DNA synthesis marker BrdU (Sigma) was dissolved in a sterile solution of 0.9% NaCl and 1.75% NaOH (0.4 N). This solution was injected intraperitoneally at a concentration of 50 mg/kg body weight. Two injections of BrdU spaced 2 h apart were performed 5 d before killing the animals to evaluate the number of BrdU-positive (BrdU+) in the RMSOB. For osmotic minipump infusion of IgG-Fc, TrkB-Fc, and function-blocking antibodies for p75NTR above the horizontal limb of RMS, BrdU was injected twice spaced by 2 h 2 d before installation of pumps. One pulse of BrdU was given 6 h before installation of pumps to the carotid artery. BrdU staining was performed as described previously (Saghatelian et al., 2004), and BrdU+ cells were counted in each third 40- μ m-thick section. In some experiments, blood

vessels were visualized by injecting fluorescent dextran (molecular weight, 70,000 kDa) to the tail vein. Corresponding secondary antibodies were used. Images were acquired with an FV1000 confocal microscope equipped with argon 488 nm, helium–neon 543 nm, and helium–neon 633 nm lasers (Olympus). Double- and triple-immunolabeled cells were analyzed using three-dimensional (3D) reconstructed images with the x–z and y–z orthogonal projections.

For in situ hybridization studies, antisense RNA probes were labeled using the DIG RNA labeling kit (Roche Diagnostics) and purified on ProbeQuant G-50 columns (GE Healthcare). In situ hybridization was performed on 50- μ m-thick vibratome sections, and the signals were revealed with nitroblue-tetrazolium-chloride/5-bromo-4-chlor-indolyl-phosphate (Promega). Antisense RNA probes were obtained from plasmids containing a fragment of the extracellular domain of mouse TrkB (kindly provided by Dr. Lino Tessarollo, National Institutes of Health, Bethesda, MD) and two plasmids containing mouse BDNF [kindly provided by Drs. S. Nakamura (National Institute of Neuroscience, Tokyo, Japan) and E. Castren (University of Helsinki, Finland)].

Retrovirus production.

The replication defective retroviral vector pMMP–f2–IRES–EGFP (obtained from Dr. J. Lee, Harvard Gene Therapy Initiative, Harvard Medical School, Boston, MA) was produced by calcium phosphate-mediated transfection of the vector DNA into the retrovirus-packaging cell line GPG-293 and was subsequently concentrated from the supernatant by ultracentrifugation. Titration was performed by infecting NIH-3T3 cells with serial dilutions of the vector and counting the number of enhanced GFP (EGFP)-positive cells or colonies 72 h after infection.

Slice preparation and time-lapse video imaging.

Sagittal sections (250 μ m) from adult (2–3 months old) mouse forebrain were prepared and maintained at 32°C. Slices were continually superfused (2 ml/min) with artificial CSF (ACSF) containing the following (in mM): 125 NaCl, 26 NaHCO₃, 10 glucose, 3 KCl, 2

CaCl₂, 1.3 MgCl₂, and 1.25 NaH₂PO₄ (bubbled with 95% O₂/5% CO₂), pH ~7.4. For Ca²⁺ imaging of astrocytes, slices were incubated for 1 h with 2 μM Fluo4-AM, a membrane-permeable Ca²⁺ indicator. For time-lapse video imaging of cell migration and Ca²⁺ fluctuation in astrocytes, multiple z-stack images (at least 6–10 z-sections, with ~10 μm interval) were acquired every 15 s for at least 1 h with a BX61WI (Olympus) upright microscope equipped with CCD camera (CoolSnap HQ2). For Ca²⁺ imaging experiments, Fluo4 was excited by using a DG-4 xenon light source (Sutter Instruments). At least 20 migrating cells were analyzed per slice and for each time point. Multiple z-step acquisition in our time-lapse experiments of cell migration allowed us to follow the same cell in different z plans. For the analysis of stationary periods, we took into consideration only those phases that were intercepted by two migratory periods. For the experiments requiring pharmacological treatment (BDNF, antibodies, GABA, bicuculline, etc.), time-lapse movies were first acquired under control conditions for 30–45 min and then in the presence of the pharmacological agent for another 30–45 min. Under these conditions, we were unable to see long stationary phases (intercepted by two migratory periods), and, therefore, our values for stationary periods are shorter compared with the ones obtained from 1.5–2 h of recordings (see Figure 2F). At least 50 time points were averaged for each slice to obtain the mean value for the changes induced by pharmacological agent. Control values were calculated by averaging 50 time points before drug application. These values were then averaged across all slices. Because of low amounts of p75NTR function-blocking antibodies, we incubated the slices with these antibodies for 1 h before recording. For time-lapse video imaging of GFP+ neuroblasts along dextran–Texas Red-labeled blood vessels, imaging was performed deep in the slice (40–100 μm from the slice surface).

Fluorescence-activated cell sorting and neurosphere analysis.

SVZ was dissected from five animals, and tissue was dissociated to the single cells. Single-cell suspension was incubated with rabbit anti-rat p75NTR (1:200; Millipore) on ice for 20 min and then washed with PBS containing 1% fetal calf serum (FCS). Anti-p75NTR binding was detected with Alexa 647-coupled anti-rabbit IgG (1:500; Invitrogen). Before sorting, cells were washed with PBS containing 0.5 μg/ml propidium iodide to exclude dead cells. Cells were sorted on a FACS Aria (BD Biosciences) and collected into the

medium containing epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (FGF). Sorted cells were plated into 96-well tissue culture plates at density of one cell per well, as confirmed by counting 4 h after plating, in FGF (10 ng/ml) and EGF (20 ng/ml) containing medium. After 7 d of culturing, neurosphere formation was used as a readout for proliferative activity of p75-positive and p75-negative cell populations. The identity of the sorted cells was assessed immediately after the sorting. Namely, 1000 fluorescence-activated cell sorting (FACS) events have been cytopspined, cells were fixed in 4% paraformaldehyde and stained for doublecortin (Dcx) (rabbit antibody; 1:200; Millipore) and GFAP (rabbit antibody; 1:200; Dako) visualized by the secondary anti-rabbit antibodies coupled with cyanine 2 and 3, respectively.

Reverse transcription-PCR analysis of FACS-purified cell populations.

SVZ was dissected from five hGFAP–EGFP transgenic mice per experiment, and tissue was dissociated to the single cells. The following cell populations were purified using FACS: astrocytes (GFP-positive, PSA-NCAM-negative population), neuroblasts (PSA-NCAM-positive population, mouse IgM, 1:100), and endothelial cells (vascular endothelial cadherin-positive cells, mouse IgG, 1:400) as described above. Immediately after the sorting, the total RNA was isolated from the different populations using RNeasy Micro kit (Qiagen), according to the instructions of the manufacturer. First-strand cDNA synthesis reaction was performed with RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas Life Science) with oligo-dT primers. Obtained cDNA were amplified using the following primers: for BDNF, 5+-CAACATAAATCCACTATCTTC-3+ and 5+-ATGACCATCCTTTTCCTTAC-3+; for TrkB, 5+-TGAAGACGCTGAAGGACGCCA-3+ and 5+-CAGGTTCTCTCCTACCAAGCA-3+; for p75NTR, 5+-CCAGCAGACCCACACACAGACTG-3+ and 5+-CCCTACACAGAGATGCTCGGTTC-3+; for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 5+-TCCATTCTTCCACCTTTGATG-3+ and 5+-GTCCACCACCCTGTTGCTGTA-3+; and for β -actin, 5+-CACCACCTTCTACAATGAGC-3+ and 5+-CGGTCAGGATCTTCATGAGG-3+.

Primary culture of adult astrocytes.

To prepare culture of astrocytes from the adult SVZ, the lateral wall of the lateral ventricle from the brains of at least five 6- to 9-week-old C57BL/J6 mice were dissected out under a microscope. Preparation was performed in HBSS containing 10 mM HEPES. The isolated brain tissue was then centrifuged and resuspended in 10 ml of culture medium. Cells were cultured under adherent conditions in the presence of 10% fetal bovine serum, 5% horse serum, DMEM/F-12 supplemented with B27 and growth factors (20 ng/ml EGF and 10 ng/ml FGF2). Medium was changed every second day. For ELISA experiments, astrocytes were seeded on poly-D-lysine-coated coverslips in six-well plates. For coculture of astrocytes and endothelial cells, astrocytes were prepared as described, and then human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) transfected with BDNF–GFP plasmid (kindly provided by Dr. M. Kojima, National Institute of Advanced Science and Technology, Ikeda, Japan) were added. The cocultures were analyzed 24 h later with the help of FV1000 confocal microscope (Olympus). After control acquisition of GFP+ punctate labeling on the surface of astrocytes, a small region of interest was selected and bleached for 1 min with an argon 488 nm laser. Astrocytes were visualized in bright-field images according to their large soma size and were identified with post hoc staining with GFAP antibodies.

Isolation of fibroblasts and endothelial cells.

Human fibroblasts were isolated from skin biopsies after breast reductive surgeries as described previously (Berthod et al., 2006) using 0.2 IU/ml collagenase H (Roche Diagnostics). Cells were grown in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% FCS (HyClone), 100 IU/ml penicillin G (Sigma), and 25 mg/ml gentamicin (Schering) and incubated in 8% CO₂ at 37°C. HUVECs were obtained from healthy newborns by enzymatic digestion with 0.250 mg/ml thermolysin (Sigma) as described previously (Berthod et al., 2006). They were grown in endothelial growth medium-2 (EGM-2; Cambrex Bioscience Baltimore) and characterized as described previously (Berthod et al., 2006).

Construction of the tissue-engineered 3D capillary-like network.

Collagen-chitosan sponges were used as a scaffold to construct a 3D capillary-like network as described previously (Berthod et al., 2006). Briefly, type I and III bovine collagen (Symatase) and chitosan (Kemestrie) were dissolved and mixed in 0.1% acetic acid, and 1 ml/well (3.8 cm²) of the final solution was poured in 12-well plates (BD Biosciences), frozen at -80°C, and lyophilized in a vacuum lyophilizer (Dura-Stop Freeze-Dryer; FTS Systems). Human dermal fibroblasts and HUVECs (2.1 × 10⁵ cells/cm² each) were seeded on top of the sponges and cultured for 10 d in a 1:1 ratio of EGM-2/DMEM, supplemented with 75 µg/ml ascorbic acid. The sponges were cultured in a 3:1 ratio of DMEM/Ham's F-12 medium supplemented with 10% FBS, 0.4 µg/ml hydrocortisone, 5 µg/ml bovine insulin, 100 µg/ml ascorbic acid, and antibiotics and were elevated to the air-liquid interface for 17 additional days.

For time-lapse imaging of migrating neuroblasts in the reconstituted 3D capillary-like network, GFP⁺ cells derived from the SVZ of GAD67-GFP mice were cultured together with HUVECs and fibroblast prepared sponges. In control experiments, GFP⁺ neuroblasts were cultured with sponges prepared from fibroblasts alone. HUVECs were transduced with GFP lentivirus. GFP⁺ neuroblasts (small cells of ~5–10 µm size) and GFP⁺ capillaries (long tubular-like structures) were easily distinguishable on the basis of their shapes and were false-colored in offline analysis using ImagePro software (see Figure 6L).

For reconstituted capillaries, siRNA transfection were performed with HiPerFect transfection reagent (Qiagen) according to the instructions of the manufacturer. BDNF and control siRNAs were provided from Santa Cruz Biotechnology (sc-42121 and sc-37007, respectively). BDNF siRNA were a pool of three target-specific 20–25 nt siRNA designed to knock down BDNF gene expression. Control siRNA were a nontargeting siRNA designed as negative control. Each transfection was effectuated with 70 µM of siRNA. Total RNA was prepared using the Invitrogen TRIzol reagent according to the instructions of the manufacturer. siRNA efficiency were checked by reverse transcription (RT)-PCR reaction with the primers provided from Santa Cruz Biotechnology (sc-42121-Pr).

Determination of BDNF concentration.

The primary culture of astrocytes from adult SVZ were treated with GABA (10 μ M) for 30 min. The total protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad), and BDNF concentration was measured by BDNF Emax ImmunoAssay system (Promega) according to the protocol of the manufacturer. Exogenous BDNF (10 ng/ml) was added to the cultures for 30 min, and then cultures were washed extensively and treated with GABA as described.

Surface TrkB internalization.

TrkB internalization was evaluated by biotinylation of surface TrkB receptors. Acute slices of the adult mouse forebrain were incubated in bicuculline (100 μ M), GABA (10 μ M), or BDNF (10 ng/ml) for 1 h. After incubation, slices were immediately transferred to ice-cold HBSS, and the RMS and SVZ were extracted under a dissecting microscope. The cells were dissociated, washed in ice-cold PBS, and biotinylated with EZ-Link Sulfo-NHS-biotin (Pierce) for 30 min according to the protocol of the manufacturer. The cells were then extensively washed with ice-cold PBS containing 100 mM glycine and lysed using a buffer containing the following (in mM): 50 Tris-HCl, 1 EDTA, 1 EGTA, 1 sodium orthovanadate, 50 sodium fluoride, 5 sodium pyrophosphate, 10 sodium b-glycerophosphate, 0.1% 2-mercaptoethanol, 1% Triton X-100, and a 1:100 dilution of freshly added protease inhibitor cocktail set III (Calbiochem). The biotinylated surface proteins were immobilized on streptavidin-coated agarose beads (GE Healthcare), incubated with anti-TrkB antibodies, followed by incubation with HRP-labeled secondary antibodies. HRP-labeled TrkB immunocomplexes were eluted in 0.1 M glycine-HCl, and surface TrkB protein concentrations were determined by ELISA.

Statistical analysis.

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical significance was tested by using Student's t test (with * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$).

Results

Adult neuronal precursors are aligned and migrate along the blood vessels

To investigate whether the SVZ–OB pathway contains physical substrates that might be used by neuronal precursors for their faithful migration from the posterior to the most anterior parts of the brain, we performed blood vessel labeling in the adult mammalian forebrain. When blood vessels were labeled via injection of fluorescent dextran–Texas Red into the tail vein or by immunohistochemical detection for PECAM, a marker of endothelial cells, an unexpected organization of blood vessels was observed in the SVZ–OB pathway. Blood vessels in most parts of the brain are distributed in a rather random manner, but, in the RMS, they parallel the migratory stream and almost all migrating cells are aligned along the blood vessels (Figure 1A) (supplemental Video 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Interestingly, blood vessel organization is modified in the core of the OB, in which neuroblasts have to detach from each other and start to migrate radially. Whereas some blood vessels are still oriented parallel to the migratory stream and reach the most rostral end of the RMS of OB (RMSOB), many others are organized perpendicular with respect to the tangentially migrating neuroblasts (Figure 1B). Moreover, cells that exit from the RMSOB and initiate their radial migration into the bulbar layers do so along these perpendicularly oriented blood vessels (Figure 1B). Quantification of the number of BrdU-labeled migrating cells (to reveal migrating cells, BrdU was injected 5 d before counting) along the blood vessels revealed that, among 444 BrdU-labeled cells, $75.3 \pm 4.1\%$ of them were within $3 \mu\text{m}$ of blood vessels ($n = 3$ animals). Because BrdU labeling depicts only cell nuclei and not the cell body or processes, these numbers likely underrepresent the proportion of blood vessel-associated neuroblasts. Therefore, we counted the number of vasculature-associated neuroblasts whose soma or leading process could be easily identified in either GAD67–GFP transgenic animals or animals in which a GFP-encoding retrovirus was injected into the SVZ. Among 921 GFP+ cells counted in the RMS, $97.3 \pm 0.7\%$ of neuroblasts were located within $3 \mu\text{m}$ of blood vessels ($n = 5$ animals) (Figure 1C,F). This number is decreased in the RMSOB in which

neuroblasts have to change their mode of migration from tangential to radial. At this level, $33.3 \pm 4.9\%$ of GFP+ neuroblasts were “detached” from blood vessels (Figure 1F; see also B). However, only vasculature-associated neuronal-specific nuclear protein-negative migrating cells are found in the OB at 5, 8, and 12 d after stereotaxic RMS injection of GFP-encoding retrovirus ($99.4 \pm 1.2\%$, n = 161 cells from 4 animals, at 5 d; $98.9 \pm 2.0\%$, n = 91 cells from 5 animals, at 8 d; and $98.3 \pm 1.7\%$, n = 93 cells from 4 animals, at 12 d) (Figure 1D–F). After their arrival to the OB, newborn cells that start to differentiate and develop long dendritic processes ($>30 \mu\text{m}$) were equally abundant close to or distant from blood vessels (Figure 1E,F).

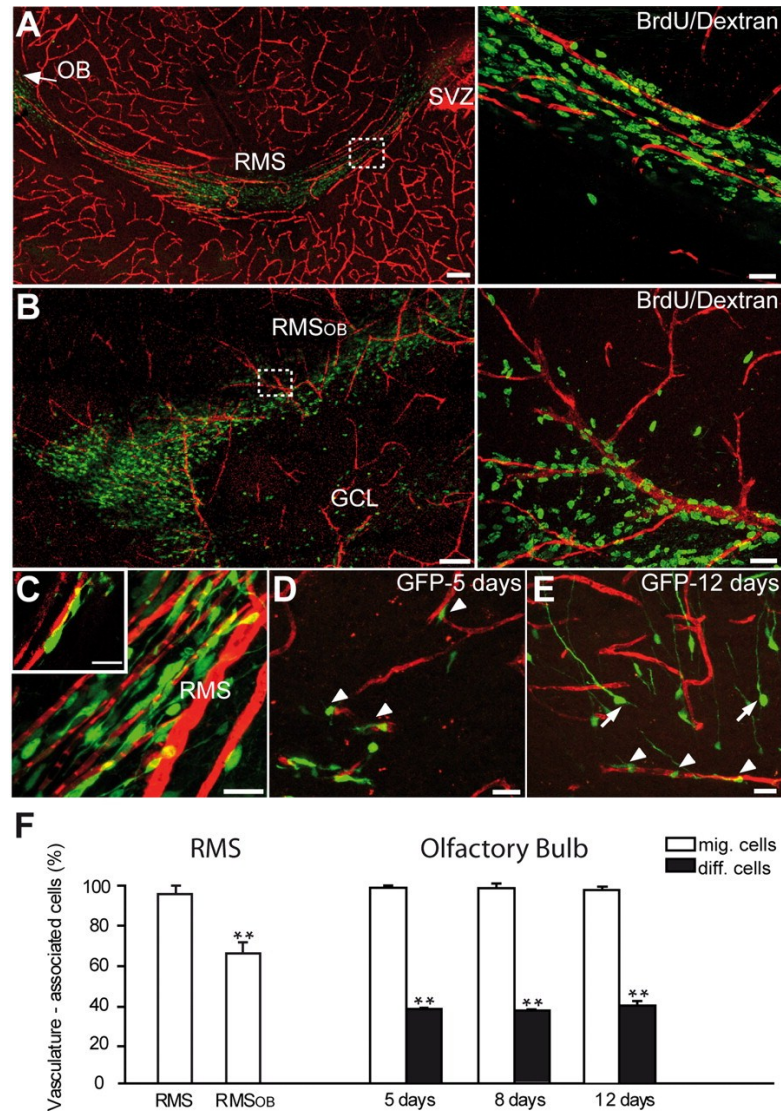


Figure 1. Migrating neuroblasts are aligned along the blood vessels in the adult brain. A, B, Micrographs showing organization of blood vessels in the adult mouse forebrain. Note the close association of tangentially (A) and radially (B) migrating neuronal precursors (green) with blood vessels (red) that parallel the migratory stream. Newly generated cells in the migratory pathway were labeled by BrdU injection 5 d before analysis. Blood vessels were revealed by injection of dextran–Texas Red to the tail vein. Scale bars: A, B, 100 μ m; Aright, Bright, 20 μ m. C–E, Vasculature-associated GFP+ cells in the RMS and OB. GFP-expressing retrovirus was injected into the SVZ (C) or RMS (D, E) 5, 8, and 12 d before analysis. Arrowheads and arrows indicate migrating (mig.) and differentiating (diff.) cells, respectively. Scale bars, 10 μ m. F, Quantification of vasculature-associated cells in the RMS and OB.

To determine whether migrating cells physically contact blood vessels, we performed coimmunostains for BrdU-labeled neuroblasts, for vasculature, and for astrocytes (Figure 2.A,B), which are known to ensheath migrating cells (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002; Lledo and Saghatelian, 2005). Analysis of sections after triple immunolabeling revealed that blood vessels are enveloped by the processes of GFAP-expressing astrocytes and that BrdU- or Dcx-labeled migrating cells are attached to these processes (Figure 2B). These data revealed that adult neuroblasts, enveloped by astrocytic processes, are positioned close ($<3 \mu\text{m}$ away) to blood vessels, but they do not show whether these migrating cells use blood vessels as a scaffold for their migration. To investigate this issue, we decided to monitor migrating neuroblasts in real time. For this, we studied the behavior of migrating neuronal precursors in acute slices of the adult (2–3 months old) mouse forebrain with time-lapse video imaging. This analysis revealed fast migration of neuronal precursors in the RMS ($121.2 \pm 3.9 \mu\text{m}/\text{h}$; $n = 64$ cells from 4 animals) (Figure 2C,D) (supplemental Video 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material). The migration of neuronal precursors was saltatory and comprised two distinct phases: displacement of neuronal cell body toward the leading process ($288.1 \pm 18.4 \text{ s}$; $n = 64$ cells from 4 animals) (Figure 2E) separated by a resting period ($492.3 \pm 41.5 \text{ s}$; $n = 64$ cells from 4 animals) (Figure 2F). To examine whether these migrating neuroblasts used blood vessels for their saltatory displacement, we imaged GFP-labeled neuronal precursors deep in the slices in which dextran–Texas Red-stained blood vessels preserve their integrity. Our time-lapse analysis revealed that $88.1 \pm 4.6\%$ of neuronal precursors migrate along blood vessels ($<3 \mu\text{m}$ away during entire period of recording) in the adult RMS ($n = 118$ cells from 7 animals) (Figure 2G) (supplemental Video 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Even in the cases when the soma of GFP+ neuroblasts migrate $>3 \mu\text{m}$ away from the blood vessels, these cells almost invariably preserve their leading process close to blood vessels (Figure 2G) (supplemental Videos 3,4, available at www.jneurosci.org as supplemental material). This type of migration is likely to be used under circumstances when migrating neuronal precursors meet some physical constrains (such as soma of astrocytes or neuroblasts in the stationary phase) that impede straightforward propagation along the blood vessel. Together, these data indicate that vasculature plays an important role in the migratory behavior of neuronal precursors in the

RMS–OB pathway and that these migratory cells use blood vessels for their navigation in the adult brain (for a model, see Figure 2H). But what are the mechanisms of this vasculature-associated migration?

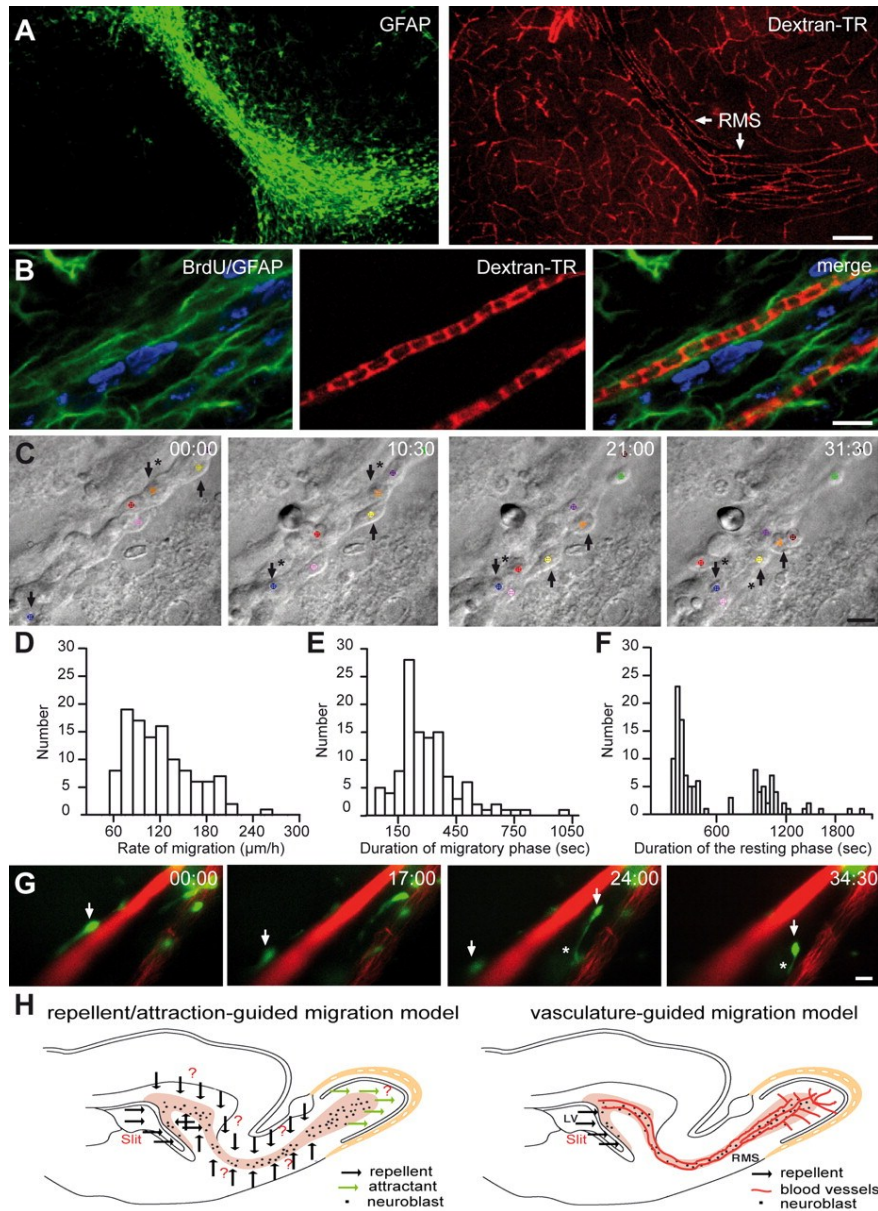


Figure 2. Neuronal precursors migrate along the blood vessels in the adult brain. A, GFAP-labeled astrocytes (green) and dextran–Texas Red (TR)-labeled blood vessels (red) in the adult RMS. Note the parallel organization of blood vessels in the RMS. Scale bar, 100 µm. B, Micrographs of BrdU-positive cells (5 d after BrdU injection) in the close vicinity of dextran–Texas Red-loaded blood vessels (injection to the tail vein). GFAP-labeled astrocytes (green) envelop blood vessels (red), and neuroblasts (blue) are attached to the astrocytic processes. Scale bar, 10 µm. C, Time-lapse video imaging of migrating neuroblasts in slices from the adult mouse forebrain (time is indicated in minutes in the top right corner of each photograph). Migrating cells are indicated during their migratory (arrows only) and stationary (arrows with asterisks) phases. D–F, Rate of migration and durations of migratory and stationary periods of neuronal precursors in the RMS in the acute slices of mouse forebrain. G, GFP-labeled neuronal precursors migrate along blood

vessels in the acute slices of the adult mouse forebrain. Blood vessels were labeled by injection of dextran–Texas Red to the tail vein 1 h before preparation of acute slices. GFP-expressing retrovirus was injected into the SVZ 3 d before time-lapse imaging in the RMS. Arrows indicate the soma of migratory cells, whereas asterisk shows leading process. Note that GFP+ cells are always positioned close to the vasculature either with their soma or leading processes. Time is indicated in minutes in the top right corner of each photograph. Scale bar, 10 μ m. H, Schematic representation of the adult brain showing the migratory pathway. According to the repellent/attraction-guided model, neuroblasts remain in this complex-shaped migratory stream because of myriads of chemorepellent molecules (black arrows) secreted from all RMS-neighboring territories and are guided toward OB attributable to chemoattractive molecules secreted from the this region (green arrows). According to the vasculature-guided migration model proposed herein, neuroblasts are retained in the RMS and migrate in this pathway as a result of the presence of blood vessels that are oriented parallel to the migratory stream. Neuroblasts course along blood vessels, and a single chemorepellent molecule that is secreted from the posterior parts of the brain could be sufficient to direct neuronal precursors to the OB. Neuroblasts receive all other signal(s) for their migration from RMS–OB vasculature. It should be noted, however, that the vasculature-guided migration model proposed here does not exclude the earlier chemorepellent/chemoattraction-mediated scheme. It is likely that both mechanisms operate in parallel to ensure faithful migration of newborn cells in the adult brain.

Mechanisms of vasculature-associated migration

Endothelial cells synthesize BDNF (Leventhal et al., 1999; Louissaint et al., 2002; Guo et al., 2008), injection of this trophic factor into the lateral ventricle leads to the appearance of new neurons in the parenchyma of the striatum (Benraiss et al., 2001; Pencea et al., 2001; Bédard and Parent, 2004) (but see also (Galvão et al., 2008), and it has been suggested recently that BDNF affects migration of neuronal precursors in the RMS (Chiaramello et al., 2007; Bath et al., 2008). We therefore tested the putative role of BDNF in the vasculature-guided migration of neuronal precursors. In situ hybridization analysis for BDNF combined with immunohistochemistry for PECAM showed BDNF mRNA expression in the endothelial cells of blood vessels in the adult RMS (Figure 3A). In contrast, astrocytes and neuroblasts in the RMS were devoid of BDNF mRNA (Figure 3A) (supplemental Figure 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Semiquantitative RT-PCR analysis of FACS-purified endothelial cells, astrocytes, and neuroblasts confirmed the presence of BDNF mRNA in the endothelial cells but not in other cells types of the adult migratory pathway (n = 3 experiments) (Figure 3B). Interestingly, however, immunodetection of BDNF revealed a different distribution with the protein mostly found on the astrocytic processes enveloping blood vessels (Figure 3C). To confirm that our immunostaining reflects the actual presence of BDNF protein, immunostains were also performed on sections derived from TrkB–Fc-infused animals. Application of TrkB–Fc (10 µg/ml) via 7 d osmotic minipump implants placed just above the horizontal limb of the RMS, to capture endogenous BDNF, decreased the intensity of immunostaining for this trophic factor on astrocytes (n = 4 animals) (Figure 3D). In addition, coculturing of SVZ astrocytes with BDNF–GFP-transfected endothelial cells revealed punctate staining for GFP on the surface of these glial cells (Figure 3E). This punctate labeling reappears several minutes after bleaching of GFP on the astrocytes (n = 10 cells from 3 independent experiments) (Figure 3E). No such staining was observed in control experiments when astrocytes were cocultures with only GFP-transfected endothelial cells (data not shown). These data suggest that BDNF is synthesized by the endothelial cells, secreted into the extracellular space, and bound to receptors on astrocytic processes. Importantly, the pattern of BDNF expression was not observed outside of the RMS, in which neuroblast migration ends (granule cell layer of the OB) or is not observed (striatum) (supplemental Figs. 1, 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

Astrocytes were devoid of BDNF immunoreactivity in these regions (supplemental Figure 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

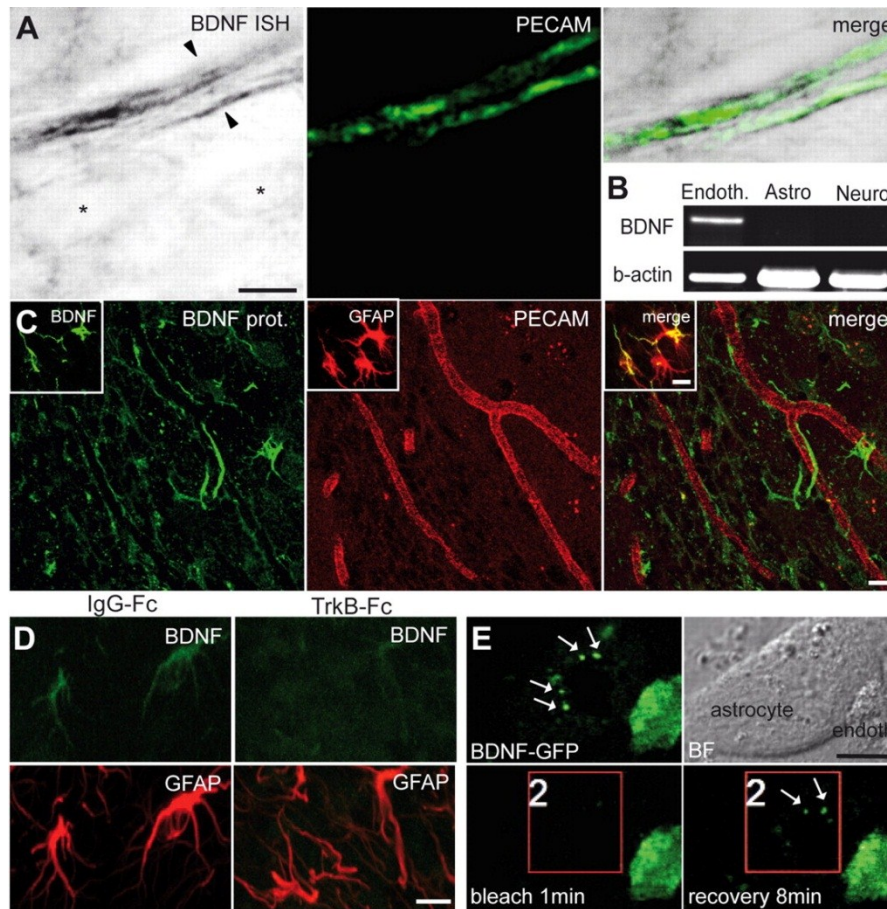


Figure 3. Expression of BDNF in the adult RMS.

A, In situ hybridization (ISH) for BDNF and immunostaining for PECAM (green) showing that endothelial cells of blood vessels synthesize BDNF. Note that BDNF mRNA is present in the endothelial cells (arrowheads) but not in other cell types of the adult RMS (asterisks). Scale bar, 5 μ m. B, RT-PCR analysis of FACS-purified endothelial cells (Endoth.), astrocytes (Astro), and neuroblasts (Neuro). BDNF is expressed in endothelial cells but not in astrocytes and neuroblasts. C, Immunostaining for BDNF in the adult mouse RMS. Inset shows colocalization of BDNF (green) and GFAP (red). Scale bar, 10 μ m. D, Immunostaining for BDNF (green) and GFAP (red) in the adult mouse RMS after osmotic minipump infusion of TrkB-Fc or IgG-Fc, as a control. BDNF immunostaining is drastically reduced after 7 d of TrkB-Fc infusion. Scale bar, 10 μ m. E, Coculture of astrocytes with BDNF-GFP-transfected endothelial cells. Note the strong GFP signal in the endothelial cells and punctate staining (arrows) of astrocyte. Bright-field (BF) images are also shown. Bleaching area is indicated by the red square. After 8 min of recovery period, the punctate staining reappears at the surface of astrocyte. Scale bar, 10 μ m.

We next performed immunostaining, in situ hybridization, and semiquantitative RT-PCR on FACS-purified neuroblasts and on astrocytes to determine which cell types in the adult RMS expressed the neurotrophin receptors TrkB and p75NTR. TrkB was found mostly on astrocytes (Figure 4A–H), whereas p75NTR was expressed mainly by migrating neuroblasts (Figure 4C,I,J) and by a small fraction of GFAP-immunopositive cells (Figure 4J). In the adult SVZ, p75NTR immunoreactivity was also observed in C-type cells (Young et al., 2007). Evaluation of FACS-purified p75NTR+ population of cells in the SVZ revealed that $20.2 \pm 1.3\%$ of cells were neurosphere-forming cells ($n = 3$ independent sorting experiments), as reported previously (Young et al., 2007). However, already in the SVZ, ~ 38 and 7% of FACS-isolated p75NTR+ cells were Dcx+ and GFAP+, respectively ($n = 3$ independent sorting experiments). These data indicate that p75NTR starts to be expressed by some migrating neuroblasts in the SVZ. We were not able to detect C-type cells expressing p75NTR immunoreactivity in the RMS, in contrast to what was reported recently (Bath et al., 2008). It has been shown previously that this population of cells is virtually absent in the adult RMS (Jankovski and Sotelo, 1996; Lois et al., 1996; Doetsch et al., 1997; Gritti et al., 2002).

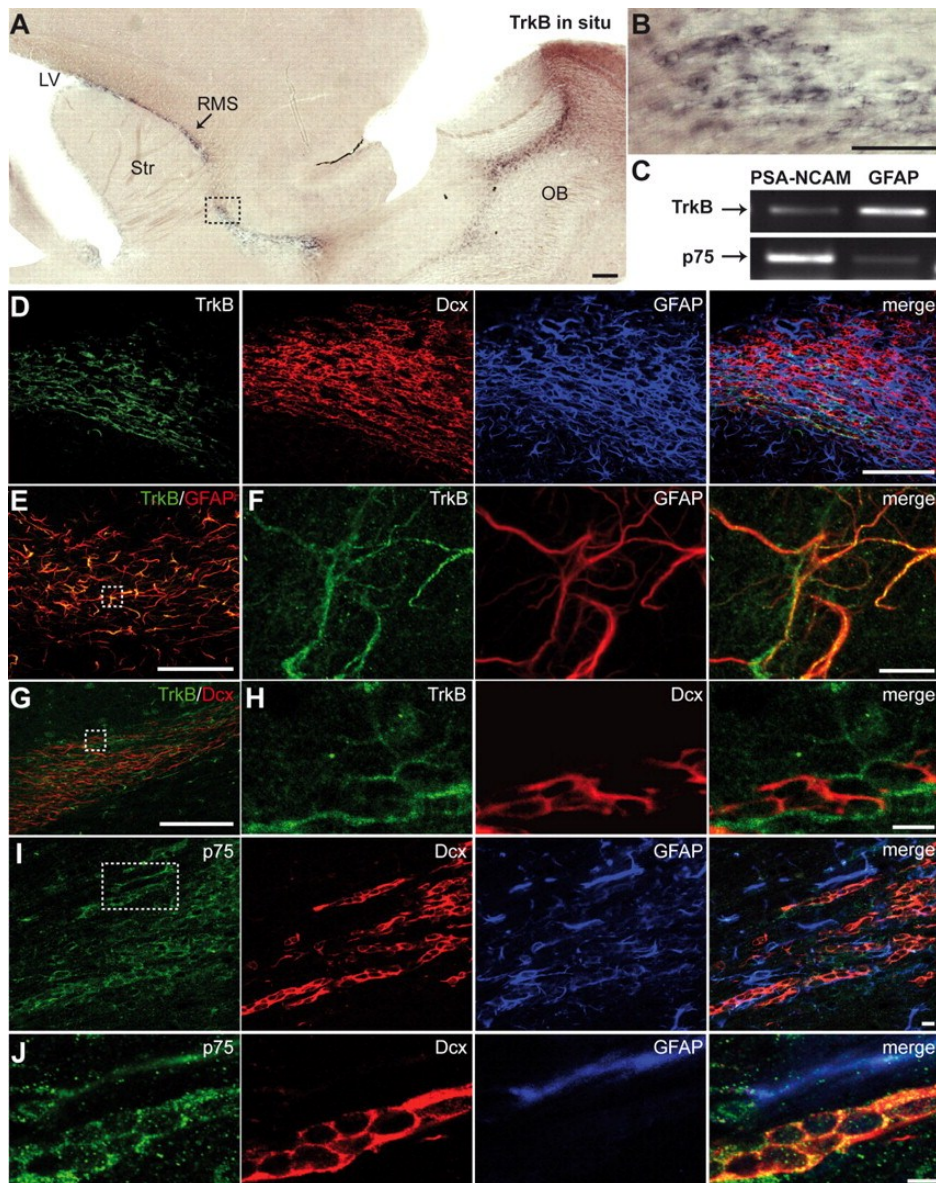


Figure 4. Expression of TrkB and p75NTR in the adult RMS. A, In situ hybridization for TrkB in the adult SVZ–OB pathway. Note the intense labeling in the adult RMS. Scale bar, 100 μ m. LV, Lateral ventricle; Str, striatum. B, High-magnification images of the boxed areas in A. Scale bar, 10 μ m. C, RT-PCR analysis of FACS-purified astrocytes (GFAP) and neuroblasts (PSA-NCAM). Note the high level of expression of p75NTR in neuroblasts and TrkB receptors in astrocytes. D, Immunostaining for TrkB (green), Dcx (red), and GFAP (blue) in the adult mouse RMS. Scale bar, 100 μ m. E, F, Immunostaining for TrkB (green) and GFAP (red) in the adult mouse RMS. F, High-magnification images of the boxed area in E. Scale bars: E, 100 μ m; F, 10 μ m. G, H, Micrographs showing that most, if not all, of TrkB (green) immunopositivity is not localized in Dcx-immunopositive cells (red). H, High-magnification images of the boxed area in G. Scale bars: G, 100 μ m; H, 10 μ m. I, J, Micrographs displaying expression of

p75NTR (green) by migrating neuroblasts (Dcx, red). J, High-magnification images of the boxed area in (I). Scale bar, 10 μ m.

BDNF fosters neuronal migration via p75NTR

The expression patterns of BDNF and its receptors suggest that this trophic factor might be involved in the vasculature-associated migration of neuronal precursors. To investigate the role of BDNF in the neuronal migration in adult brain, we delivered this trophic factor into the striatum, a brain region that borders the migrating stream but in which neuronal precursors do not normally migrate. Three days after stereotaxic injection of BDNF (100 ng) in the striatum, numerous GFP⁺ neuronal precursors (stereotaxically labeled in the SVZ with a retroviral vector encoding GFP 2 d before application of BDNF) were derouted from their normal migratory pathway toward the BDNF-injected zone, whereas few were derouted after a control saline injection (8.2 ± 1.4 cells/mm² in control vs 90.1 ± 12.4 cells/mm² in BDNF-injected mice; $n = 3$ animals; $p < 0.001$) (Figure 5A,B). Remarkably, 75.0 ± 3.6 of these derouted cells still migrated along blood vessels ($n = 3$ animals) (Figure 5A). Similarly, the density of Dcx⁺ precursors was increased in the striatum 1 and 3 d after BDNF injection (9.4 ± 1.1 cells/mm² in control vs 43.5 ± 16.0 cells/mm² in 1 d BDNF-injected mice, $n = 3$ animals, $p < 0.001$; and 12.6 ± 4.1 cells/mm² in control vs 71.2 ± 13.0 cells/mm² in 3 d BDNF-injected mice, $p < 0.001$; $n = 3$ animals per group) (Figure 5B) (supplemental Figure 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material). To remove endogenous BDNF from the RMS, we implanted osmotic minipumps containing either TrkB-Fc or IgG-Fc (10 µg/ml) just above the horizontal limb of the RMS. After 7 d treatment, BrdU⁺ cells, with BrdU being injected 2 d before installation of pumps, were sharply reduced in the OB of TrkB-Fc-treated animals (313.5 ± 23.3 cells/mm² in IgG-FC vs 216.8 ± 13.1 cells/mm² in TrkB-Fc-infused mice; $n = 4$ animals; $p < 0.001$) (Figure 5C,D). Interestingly, this reduction in the OB was accompanied by concomitant increase in BrdU⁺ cells in the RMS and SVZ ($11,021.5 \pm 221.4$ cells/mm² in IgG-FC vs $14,733.0 \pm 698.7$ cells/mm² in TrkB-Fc-infused mice for the RMS, $p < 0.001$; and 8212.0 ± 1631.7 cells/mm² in IgG-FC vs $13,736.2 \pm 1836.8$ cells/mm² in TrkB-Fc-infused mice for the SVZ, $n = 4$ animals, $p < 0.05$) (Figure 5C,D). Similar results were obtained when the Dcx immunofluorescence intensity was analyzed in the OB of TrkB-Fc-infused animals (supplemental Figure 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Cell survival in the RMS was not affected by TrkB-Fc infusion (supplemental Figure 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Thus, our in vivo gain-of-

function and loss-of-function experiments demonstrates that BDNF plays a crucial role in neuronal migration in the adult brain and are compatible with recent observations of decreased number of BrdU+ cells in the OB of BDNF haploinsufficient mice 28 d after BrdU injection (Bath et al., 2008).

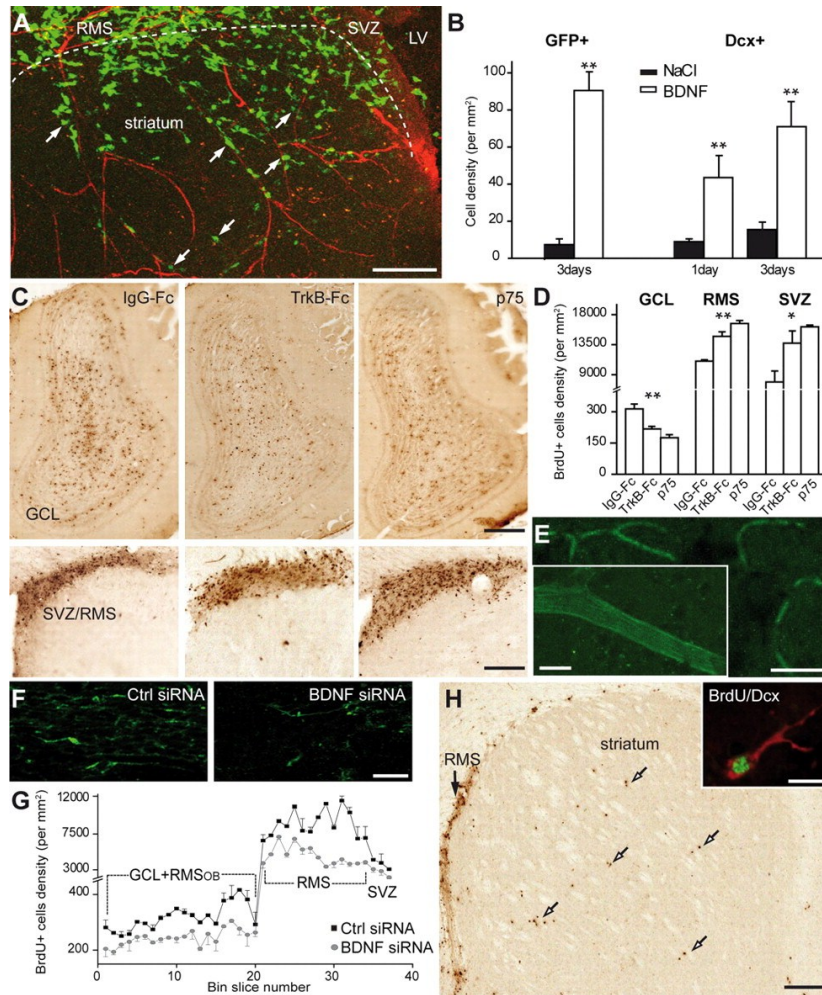


Figure 5. BDNF induces vasculature-associated cell migration in the adult forebrain.

A, Micrographs illustrating migration of GFP⁺ neuroblasts into the striatum 3 d after stereotaxic injection of BDNF (100 ng) to this region. GFP-expressing retrovirus was injected into the SVZ 2 d before injection of BDNF. Note that numerous migrating neuroblasts (arrows) use blood vessels for their navigation into the striatum. LV, Lateral ventricle. Scale bar, 100 μ m. **B**, Quantification of the density of GFP⁺ and Dcx⁺ derouted cells in the striatum. **C**, Micrographs showing BrdU⁺ cells in the OB and SVZ/RMS 7 d after osmotic minipump infusions of IgG-Fc (10–90 μ g/ml), TrkB-Fc (10 μ g/ml), and p75NTR function-blocking antibodies (90 μ g/ml) just above horizontal limb of the RMS. BrdU was injected 2 d before osmotic minipump installation. Note the reduced number of BrdU⁺ cells in the OB and increased number in the SVZ/RMS of TrkB-Fc and p75NTR function-blocking antibody infused animals. Scale bar, 100 μ m. **D**, Density of BrdU⁺ cells in the granule cell layer (GCL) of the OB, RMS, and SVZ of IgG-Fc, TrkB-Fc, and p75NTR function-blocking antibody infused animals. **E**, Labeling of blood vessels after osmotic minipump infusion of fluorescently tagged BDNF siRNA to the carotid artery. Control and BDNF siRNAs were infused for 7 d. Inset shows high-magnification image of fluorescently tagged siRNA-labeled blood vessel. Scale bars: **E**, 50 μ m; inset, 10 μ m. **F**, Immunostaining for BDNF in the control and BDNF siRNAs-treated animals. Note the

reduced intensity of immunostaining. Scale bar, 20 μm . **G**, Density of BrdU⁺ cells in the SVZ–OB pathway after control (black squares) and BDNF (gray squares) siRNA infusion to the carotid artery. Single pulse of BrdU was given 6 h before installation of osmotic minipumps. BrdU⁺ cells were counted in the coronal sections spaced by 120 μm throughout the SVZ–OB pathway. **H**, Micrographs displaying BrdU⁺ cells in the RMS of BDNF siRNA-treated animals. Note that numerous BrdU⁺ cells (arrows) leave RMS and migrate to the striatum. Inset shows high-magnification image of BrdU (green) and Dcx (red) colabeled cell in the striatum. Scale bars: **H**, 100 μm ; inset, 10 μm .

Because migrating neuroblasts express p75NTR, we investigated whether this receptor is involved in BDNF-induced migration. For this, we implanted osmotic minipumps containing either function-blocking antibodies for p75NTR (Clary and Reichardt, 1994) or IgG-Fc (90 µg/ml) just above the horizontal limb of the RMS. This treatment reduced the number of Dcx+ (supplemental Figure 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material) and BrdU+ cells in the OB (313.5 ± 23.3 cells/mm² in IgG-Fc vs 175.0 ± 14.7 cells/mm² in p75NTR-antibody-infused mice; $n = 3$ animals; $p < 0.001$) (Figure 5C,D) and increased their number in the RMS and SVZ ($11,021.5 \pm 221.4$ cells/mm² in IgG-Fc vs $16,920.0 \pm 444.9$ cells/mm² in p75NTR-antibody-infused mice for the RMS; and 8212.0 ± 1631.7 cells/mm² in IgG-Fc vs $16,177.2 \pm 254.4$ cells/mm² in p75NTR-antibody-infused mice for the SVZ; $n = 3$ animals; $p < 0.001$) (Figure 5C,D). These results demonstrate that BDNF-p75NTR interaction is important for the accumulation of neuronal precursors in the adult OB.

Recent studies have shown that TrkB haploinsufficient mice have a reduced number of BrdU+ cells in the OB 28 d after BrdU injection (Bath et al., 2008). Whereas TrkB receptors are mostly found on astrocytes (Figure 4C-G), low level of their expression is also detected in neuroblasts (Figure 4C), and, from these experiments, it was not clear whether the reduced number of BrdU+ cells in the OB results from the alterations of TrkB expression on astrocytes or neuroblasts. To address this issue, we analyzed the number of BrdU+ cells in the RMSOB of mice lacking TrkB expression in astrocytes. To produce these animals, we crossed animals bearing a floxed TrkB allele (Minichiello et al., 1999) with *GlastCre::ERT2* mice (Mori et al., 2006), which carry tamoxifen-inducible form of Cre in the GLAST locus. Because neuronal precursors are derived from GFAP-expressing cells (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002; Lledo and Saghatelian, 2005) and, therefore, can be also affected in these transgenic animals, we performed all our analysis 5 d after the end of tamoxifen treatment. At this stage, only $4 \pm 2\%$ of recombined neuroblasts (assessed by the Dcx immunoreactivity and the presence of the reporter protein in *GlastCre::ERT2/ZEG* mice) were present in the RMSOB. In contrast, $69.6 \pm 8.8\%$ of astrocytes were found to be recombined in the RMS, as it has been reported for the adult SVZ (Mori et al., 2006). Five days after BrdU injection, with BrdU being injected at the end of tamoxifen treatment, the number of BrdU+ cells was drastically reduced in the

RMSOB of TrkBfl/fl GLAST::CreERT2 mice compared with the control TrkBwildtype/wildtype GLAST::CreERT2 animals ($10,642.2 \pm 187.9$ cells/mm² in wild-type vs 6560.0 ± 89.7 cells/mm² in TrkBfl/fl GLAST::CreERT2 mice; $n = 4$ animals; $p < 0.001$) (supplemental Figure 4, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Because (1) this 40% reduction in the number of BrdU+ cells cannot be explained by the 4% of recombined neuroblasts in the RMSOB and (2) cell proliferation and survival analyzed immediately after the end of tamoxifen treatment were not affected in the RMS and SVZ (data now shown), we conclude that TrkB receptors expressed on astrocytes play an important role in neuroblast migration in the RMS.

Our data show that application of TrkB–Fc reduced the number of BrdU+ cells in the OB (Figure 5C,D) and that endothelial cells are a likely candidate for the source of BDNF in the RMS (Figure 3A,B). To directly show that blood vessel-derived BDNF is involved in the arrival of newborn cells, we next attempted to downregulate its expression specifically in the blood vessels and only in adults. For this, we inserted a catheter connected to the 7 d osmotic minipump to the external carotid artery. Figure 5E shows that, with this approach, fluorescently tagged BDNF siRNAs accumulate in blood vessels but not in other cell types of the adult brain. Importantly, infusion of BDNF siRNA reduces the expression of BDNF in the adult RMS by $38.45 \pm 10.6\%$ (data were normalized for GFAP immunostaining; $n = 3$ animals) (Figure 5F) that consequently decreased the number of BrdU+ cells all along the SVZ–OB pathway ($n = 3$ animals; $p < 0.001$) (Figure 5G). Although these data do not exclude possibility that endothelial cell-derived BDNF has also a nonmigratory role (such as cell proliferation, survival, and differentiation), the reduction in the BrdU+ cells in the adult SVZ–OB was at least partially attributable to the immigration of these cells to neighboring territories, such as striatum (0.5 ± 0.3 cells/mm² in control vs 30.2 ± 8.9 cells/mm² in BDNF siRNA-treated animals) (Figure 5H).

Altogether our in vivo experiments demonstrate that BDNF is important for the proper navigation of neuronal precursors in the adult brain and that p75NTR as well as TrkB receptors expressed on the astrocytes are involved in this process. However, the

physiological mechanisms that govern neuronal migration are very complex (Figure 2C–F), and, from our *in vivo* experiments, it is difficult to discern the direct and acute role of BDNF, TrkB, or p75NTR. We therefore directly tested whether BDNF, TrkB, and p75NTR affect neuronal migration, using time-lapse video microscopy in the acute slices of the adult mouse forebrain. Bath application of BDNF (10 ng/ml) increased the average distance covered by migrating cells, the number of cells in the migratory phase, and decreased the duration of the resting period (Figure 6A–C) (Table 1) (supplemental Video 5, available at www.jneurosci.org as supplemental material). In contrast, application of TrkB–Fc (1 µg/ml) decreased the average distance covered by migrating cells, decreased the number of cells in the migratory phase, and increased the duration of the stationary period (Figure 6C) (see also Figure 7B; Table 1) (supplemental Video 6, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Application of TrkB–Fc together with BDNF either slightly increased or decreased or had no effect on the migratory behavior of neuroblasts depending on the concentration of BDNF (supplemental Figure 5, available at www.jneurosci.org as supplemental material). In agreement with our *in vivo* experiments with function-blocking antibodies for p75NTR, incubation of acute adult mouse forebrain slices in these antibodies (20 µg/ml) drastically reduced the average distance that cells migrated, decreased the number of cells in the migratory phase, and increased the duration of the stationary period (Figure 6D–F; Table 1). Importantly, investigation of neuronal migration in the acute slices prepared from p75NTR-deficient animals revealed very similar defects in migration (Figure 6F–I; Table 1) (supplemental Video 7, available at www.jneurosci.org as supplemental material). The average distance that cells migrated as well as the number of cells in the migratory phase were drastically reduced, whereas the duration of the stationary period was increased. Moreover, bath application of BDNF (10 ng/ml), TrkB–Fc (1 µg/ml), or p75NTR function-blocking antibodies did not affect the migratory behavior of neuroblasts in the acute slices prepared from p75NTR-deficient animals (Figure 6G–I; Table 1) (supplemental Video 7, available at www.jneurosci.org as supplemental material). These experiments suggest that p75NTR, but not TrkB receptors, expressed by neuroblasts control their migratory behavior. In agreement with these results are our observations showing that application of Trk inhibitor K252a (200 nM) did not affect the migration of neuronal precursors in the wild-type animals (Table 1) (supplemental Figure 6, available at

www.jneurosci.org as supplemental material). Despite the reductions in net migration observed, migration velocity was not altered after incubation of slices with p75NTR function-blocking antibodies, after application of BDNF and TrkB-FC, or in p75NTR-deficient animals (data not shown).

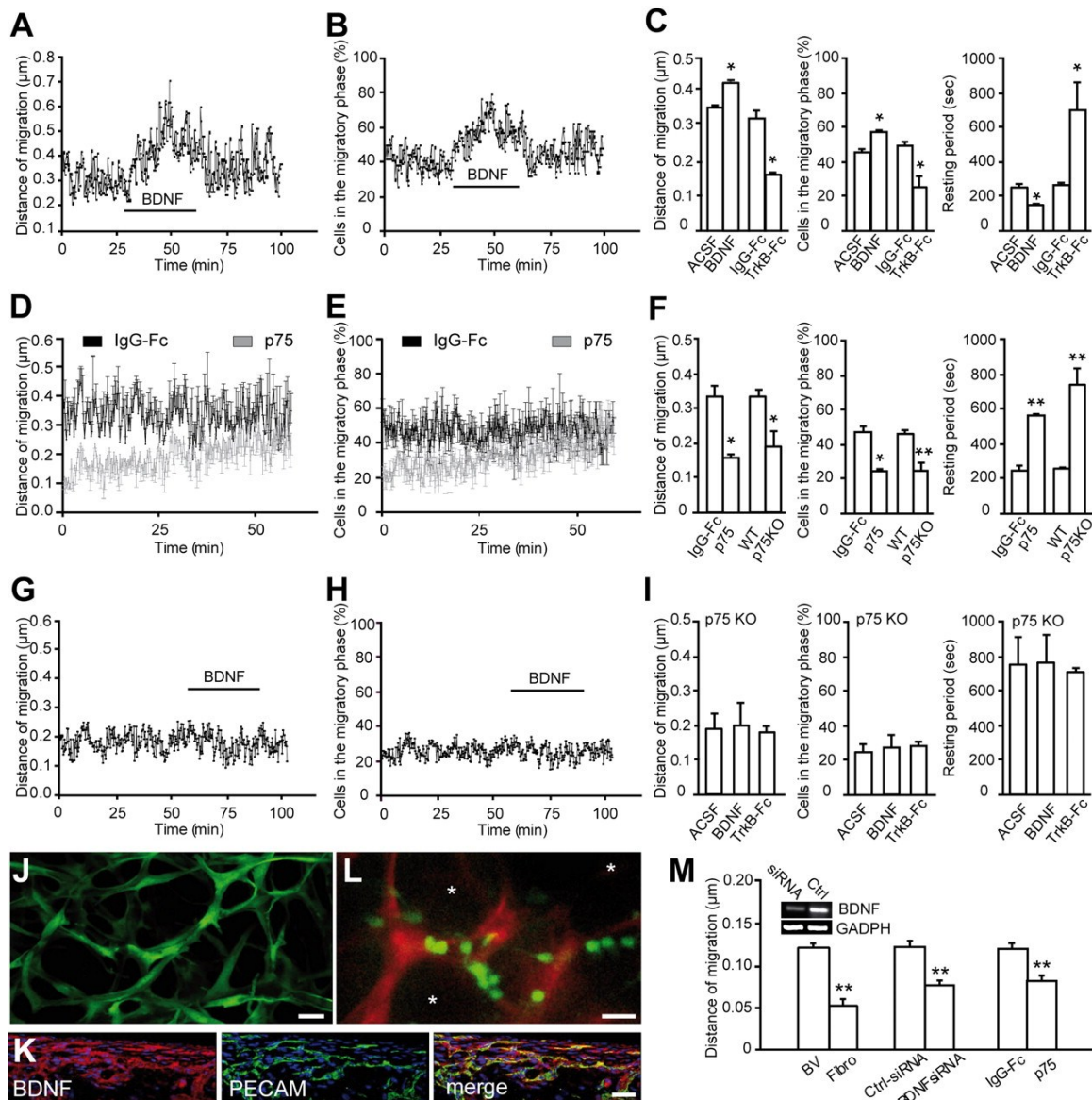


Figure 6. BDNF fosters neuronal migration via p75NTR. Figure 6.

A, B, Individual experiment demonstrating that bath application of BDNF (10 ng/ml) increases the average distance that migrating cells propagate (A) and raises the percentage of cells that are in the migratory phase at each time point (B). The time period for BDNF application is shown by a black line. C, Summary graph showing the effect of BDNF or TrkB-Fc (1 $\mu\text{g/ml}$) applications on the average distance that migratory cells propagate (per 15 s), the percentage of cells in the migratory phase, and the duration of the stationary period. In control experiments, IgG-Fc (1 $\mu\text{g/ml}$) was applied instead of TrkB-Fc. D, E, Summary graphs showing that preincubation of slices with p75NTR function-blocking antibodies drastically decreases the average distance that migrating cells propagate (D) and reduces percentage of cells in the migratory phase at each time point (E). The time-lapse recording was performed after preincubation of slices in either p75NTR function-blocking antibodies or IgG-Fc (20 $\mu\text{g/ml}$) for 1 h. During the entire period of recording, the slices were continuously perfused with oxygenated ACSF (2 ml/min). Note that the blocking

effect of p75NTR function-blocking antibodies is washed out during recording. F, Summary graph showing that deficiency in p75NTR and application of p75NTR function-blocking antibodies affects the average distance that migratory cells propagate (per 15 s), the percentage of cells in the migratory phase, and the duration of the stationary period. G, H, Individual experiment demonstrating that bath application of BDNF (10 ng/ml) does not affect the average distance that migrating cells propagate (G) and the percentage of cells in the migratory phase at each time point (H) in the slices prepared from p75NTR-deficient animals. I, Summary graph showing the absence of effect of BDNF and TrkB-Fc applications on the average distance that migratory cells propagate (per 15 s), the percentage of cells in the migratory phase, and the stationary period duration in p75NTR-deficient animals. J, Micrograph illustrating GFP+ tissue-engineered 3D capillary-like network in vitro. Scale bar, 30 μ m. K, Immunostaining for BDNF (red) and PECAM (green) in the transversal sections of sponges containing capillary-like network. Scale bar, 50 μ m. L, Micrograph depicting GAD67-GFP+ neuroblasts (green) cocultured in 3D capillary-like network (red). HUVEC cells were transduced with GFP lentivirus. GFP+ neuroblasts (small cells of ~5–10 μ m size) and GFP+ capillaries (long tubular-like structures) were easily distinguishable on the basis of their shapes and were false-colored in offline analysis using ImagePro software. Note that neuroblasts accumulate along the capillaries, and places that do not contain these capillary-like structures (asterisks) are also free of neuroblasts. Scale bar, 20 μ m. M, Quantification of neuroblast migration in the capillary-like network under different experimental conditions. Note the increased migration of neuronal precursors in the cultures containing capillary-like structure compared with the control fibroblast containing cultures (Fibro). Note also that BDNF siRNA and p75NTR function-blocking antibodies reduce the migration of neuronal precursors. Distance of migration (per 15 s) was calculated in the images acquired every 15 s for at least 1 h. Inset shows semiquantitative RT-PCR analysis of BDNF expression in the endothelial cells after siRNA transfection. KO, Knock-out; WT, wild type; BV, blood vessels.

Table 1. Migration of neuronal precursors and Ca²⁺ fluctuations in astrocytes in the acute slices of the adult mouse forebrain

Table 1. Migration of neuronal precursors and Ca²⁺ fluctuations in astrocytes in the acute slices of the adult mouse forebrain

Experiment		Distance of migration (μm)	Cells in the migratory phase (%)	Duration of the resting period (s)	Rate of migration (μm/h)	Frequency of Ca ²⁺ fluctuations (peak/min)	Number of cells/slices/animals
Migration in the RMS control		0.32 ± 0.02	47.4 ± 2.0	492.3 ± 41.5	121.2 ± 3.9		64/14/10
Application of BDNF (10 ng/ml)	Ctrl	0.34 ± 0.01	44.9 ± 2.0	274.2 ± 13.8	136.4 ± 5.2		376/4/4
	BDNF	0.43 ± 0.02*	57.4 ± 1.2*	147.5 ± 5.6*	142.6 ± 6.9		
Application of TrkB-Fc (1 μg/ml)	IgG-Fc	0.33 ± 0.02	49.4 ± 2.1	260.5 ± 12.7	115.7 ± 7.3		162/4/4
	TrkB-Fc	0.16 ± 0.04*	24.3 ± 6.2*	713.2 ± 160.0*	88.3 ± 8.8		194/4/4
Application of p75NTR (20 μg/ml)	IgG-Fc	0.33 ± 0.03	47.0 ± 3.3	243.6 ± 28.1	121.1 ± 6.7		91/4/4
	p75NTR	0.16 ± 0.01*	24.6 ± 1.1*	558.7 ± 2.9**	101.5 ± 6.6		138/5/3
Application of K252a (200 nM)	Ctrl	0.33 ± 0.05	48.3 ± 7.9	293.5 ± 44.2	135.3 ± 4.1		125/2/2
	K252a	0.30 ± 0.06	44.4 ± 6.9	294.5 ± 55.9	127.1 ± 1.9		
p75NTR-WT		0.33 ± 0.01	47.1 ± 1.4	259.4 ± 10.9	124.4 ± 4.3		150/5/4
p75NTR-KO		0.18 ± 0.03*	26.9 ± 4.2**	735.1 ± 101.1**	121.7 ± 8.4		200/6/6
Application of BDNF (10 ng/ml) in p75NTR-KO	Ctrl	0.19 ± 0.06	25.2 ± 6.4	750.5 ± 158.4	121.7 ± 13.3		168/4/4
	BDNF	0.2 ± 0.06	26.2 ± 7.1	760.0 ± 156.3	125.9 ± 10.3		
Application of TrkB-Fc (1 μg/ml) in p75NTR-KO	Ctrl	0.18 ± 0.06	30.1 ± 1.9	704.2 ± 38.4	121.6 ± 2.7		88/2/2
	TrkB-Fc	0.18 ± 0.02	28.8 ± 2.1	721.8 ± 21.1	122.4 ± 11.4		
Ca ²⁺ activity in the RMS control						0.49 ± 0.0004	125/27/10
Application of GABA (10 μM)	Ctrl	0.41 ± 0.04	55.7 ± 2.9	262.0 ± 33.7	110.8 ± 10.6	0.42 ± 0.001	27/4/3 for Ca ²⁺ activity
	GABA	0.17 ± 0.04**	28.1 ± 5.1*	584.6 ± 16.1**	79.8 ± 7.9*	0.58 ± 0.001**	146/5/5 for migration
Application of bicuculline methochloride (100 μM)	Ctrl	0.24 ± 0.01	40.6 ± 1.8	255.0 ± 27.3	93.8 ± 3.9	0.52 ± 0.0007	53/7/5 for Ca ²⁺ activity
	Bic	0.35 ± 0.03*	51.5 ± 2.8*	168.0 ± 17.7*	135.3 ± 6.9*	0.32 ± 0.001*	130/7/5 for migration
Application of TrkB-Fc (1 μg/ml)–TrkB-Fc (1 μg/ml)	TrkB-Fc	0.19 ± 0.04	28.5 ± 5.8	814.0 ± 79.0	109.1 ± 2.5		67/2/2
Application of TrkB-Fc (1 μg/ml)–GABA (10 μM)	GABA	0.16 ± 0.06	25.5 ± 9.0	864.5 ± 281.0	114.3 ± 4.5		105/2/2
Application of GABA (10 μM)–TrkB-Fc (1 μg/ml)	GABA	0.14 ± 0.02	26.1 ± 4.7	704.6 ± 8.8	111.5 ± 11.6		71/2/2
	TrkB-Fc	0.11 ± 0.0001	19.9 ± 0.06	781.2 ± 9.8	109.1 ± 3.4		
Application of 2-APB (100 μM)	Ctrl	0.32 ± 0.05	48.4 ± 0.3	276.5 ± 16.2	120.5 ± 2.8	0.46 ± 0.048	40/4/4 for Ca ²⁺ activity
	2-APB	0.01 ± 0.001**	1.1 ± 1.1*	738.0 ± 37.9	87.5 ± 0.3*	0.08 ± 0.025***	45/2/2 for migration

Bic, Bicuculline; Ctrl, control; KO, knock out; WT, wild type.

Finally, we tested vasculature-associated neuroblasts migration in vitro, in a tissue-engineered 3D connective tissue made of fibroblasts and endothelial cells, in which a network of BDNF-expressing capillary-like tubes mimicking blood capillaries, is formed (Berthod et al., 2006) (Figure 6J). Coculturing of GFP+ neuroblasts with reconstituted capillaries showed that most of the migrating cells ($78.6 \pm 6.9\%$; $n = 52$ cells of 3 cultures) accumulate along the BDNF-expressing vessels (Figure 6K,L). Time-lapse video imaging of cell migration in culture revealed a twofold increase in the distance of migration for the neuroblasts located close to the capillaries compared with those cocultured with fibroblasts alone ($0.12 \pm 0.01 \mu\text{m}/15 \text{ s}$ in capillary culture, $n = 41$ cells of 4 cultures vs $0.05 \pm 0.01 \mu\text{m}/15 \text{ s}$ in fibroblasts cultures, $n = 15$ cells of 3 cultures; $p < 0.001$) (Figure 6M). Reducing BDNF expression in the endothelial cells of capillaries by siRNA (Figure 6M, inset) strongly reduced the proportion of capillary-associated migrating cells ($57.9 \pm 8.1\%$; $n = 32$ cells of 3 cultures) and the mean distance that neuroblasts propagate ($0.12 \pm 0.01 \mu\text{m}/15 \text{ s}$ in control siRNA, $n = 12$ cells of 3 cultures vs $0.08 \pm 0.01 \mu\text{m}/15 \text{ s}$ in BDNF siRNA, $n = 15$ cells of 3 cultures; $p < 0.001$) (Figure 6M). Blocking p75NTR receptors on neuroblasts with function-blocking antibodies also decreased the migration of neuronal precursors ($0.12 \pm 0.01 \mu\text{m}/15 \text{ s}$ in IgG–Fc, $n = 10$ cells of 3 cultures vs $0.08 \pm 0.01 \mu\text{m}/15 \text{ s}$ in p75NTR function-blocking antibodies, $n = 16$ cells of 3 cultures; $p < 0.001$) (Figure 6M).

Altogether, our in vitro data in the acute slices of the adult mouse forebrain as well as in the tissue-engineered capillaries clearly demonstrate that BDNF fosters neuronal migration in a p75NTR-dependent manner. But what is the role of astrocytes in the vasculature-associated neuroblasts migration, why BDNF is trapped by the RMS astrocytes, and why did conditional removal of TrkB in the astrocytes reduce the number of BrdU+ cells in the OB?

Role of astrocytes in the vasculature-associated migration of the adult neuronal precursors

BDNF secretion is a Ca^{2+} -dependent process (Goggi et al., 2003), and, in some brain regions, BDNF bound to cell-surface TrkB receptors on astrocytes can be released into extracellular environment (Rubio, 1997; Alderson et al., 2000). It is, thus, conceivable that, in the RMS, Ca^{2+} activity in astrocytes may induce secretion of BDNF or release BDNF from cell-surface TrkB receptors. Ca^{2+} activity has also been implicated in the trafficking of TrkB to the plasma membrane (Du et al., 2003), and it is possible that Ca^{2+} fluctuations in the astrocytes induce TrkB insertion at the cell surface and thereby restrict the amount of extracellular BDNF available to neuroblasts. These potential links between Ca^{2+} activity and BDNF level led us to test whether adult RMS astrocytes display Ca^{2+} fluctuations and, if so, whether they regulate BDNF level available to migrating neuroblasts.

We loaded acute slices of the adult mouse forebrain with membrane-permeable Ca^{2+} indicator Fluo4-AM. This indicator specifically enters astrocytes, but not neuroblasts, as revealed by the fact that, during the entire recording time (sometimes >2 h), none of the GFAP-expressing (data not shown) Fluo4-AM-loaded cells had migrated. Our Ca^{2+} imaging studies demonstrate that RMS astrocytes and their processes display spontaneous Ca^{2+} fluctuations (Figure 7A) (supplemental Videos 8, 9, available at www.jneurosci.org as supplemental material) with the mean frequency of 0.49 ± 0.004 peaks/min ($n = 125$ cells from 10 animals). Having shown spontaneous Ca^{2+} fluctuations in RMS astrocytes, we next asked, what triggers Ca^{2+} activity in these glial cells? Because (1) GABA depolarizes astrocytes and induces an increase in intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ (Fraser et al., 1995), (2) astrocytes in the SVZ and RMS express functional GABA receptors (Liu et al., 2005), and (3) migrating neuroblasts release GABA (Bolteus and Bordey, 2004), we hypothesized that migrating neuroblasts themselves control Ca^{2+} activity in the astrocytes via GABAergic signaling.

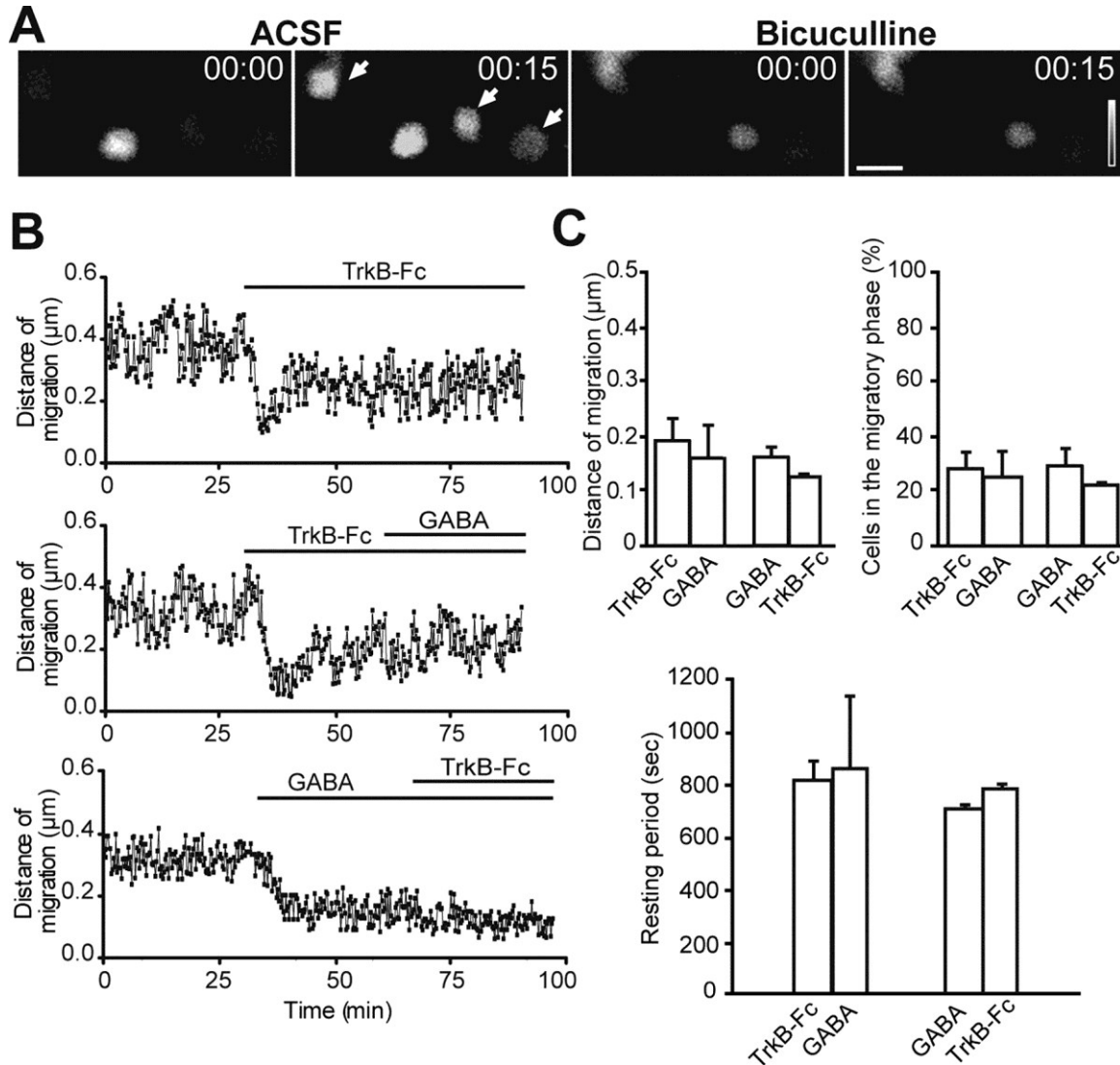


Figure 7. GABAergic signaling affects Ca^{2+} activity in astrocytes and migration of neuroblasts.

A, Application of GABA receptor antagonist bicuculline (Bic, 100 μM) diminishes spontaneous Ca^{2+} fluctuations in the astrocytes. Time-lapse video imaging illustrating changes in the fluorescent intensity under control conditions (left panels) and after application of bicuculline (right panels) over time (indicated in seconds in the top right corner of each photograph). Scale bar, 10 μm . B, Individual experiments demonstrating that bath application of GABA (10 μM) after application of TrkB-Fc (1 $\mu\text{g/ml}$) as well as TrkB-Fc application after GABA application do not affect the average distance that migrating cells propagate. The time periods for TrkB-Fc and GABA applications are shown by black lines. Each time point represents the average value for 20–30 cells. C, Summary graphs illustrating that bath application of GABA (10 μM) after application of TrkB-Fc (1 $\mu\text{g/ml}$) and bath application of TrkB-Fc (1 $\mu\text{g/ml}$) after application of GABA (10 μM) do not affect

the average distance that migrating cells propagate (per 15 s), the percentage of cells in the migratory phase, and the duration of stationary period.

To investigate the role of GABA in the triggering of Ca^{2+} activity in astrocytes, we applied GABA (10 μM) or the GABA_A receptor antagonist bicuculline methochloride (100 μM) to Fluo4-AM-loaded adult mouse forebrain slices and then performed combined real-time video imaging of Ca^{2+} fluctuations in astrocytes and neuroblasts migration. Application of GABA increased the frequency of Ca^{2+} fluctuations in astrocytes (Table 1) (supplemental Video 8, available at www.jneurosci.org as supplemental material) and decreased the average distance that migrating cells propagated, reduced the number of cells in the migratory phase, and increased the duration of the stationary period (Table 1). In contrast, bicuculline application drastically reduced the frequency of Ca^{2+} fluctuations in astrocytes (Figure 7A; Table 1) (supplemental Video 9, available at www.jneurosci.org as supplemental material) and increased the migration of neuronal precursors (Table 1). The application of bicuculline not only increased the rate of migration of neuronal precursors by $44.6 \pm 5.7\%$ (Table 1), as reported previously (Bolteus and Bordey, 2004), but also significantly augmented the average distance that migrating cells propagated, increased the number of cells in the migratory phase and decreased the duration of the stationary period (Table 1). The Ca^{2+} fluctuations in astrocytes were most likely mediated by IP3-sensitive intracellular Ca^{2+} stores, because preapplication of 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) (100 μM) abolished the effect of bicuculline and GABA on the Ca^{2+} activity in astrocytes (supplemental Figure 7, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Thus, manipulation with GABAergic signaling in the adult RMS affects Ca^{2+} activity in the astrocytes and neuronal precursor migration in the manner that is reminiscent of the BDNF signaling manipulation. We, therefore, decided to investigate whether effect of GABA on the migration of neuronal precursors involves the BDNF pathway. For this, we first blocked BDNF pathway by application of TrkB-Fc (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and then applied GABA (10 μM) (Figure 7B). Under these conditions, GABA had no effect on the migratory behavior of neuroblasts (Figure 7B,C; Table 1). Conversely, preapplication of GABA decreased the migration of neuronal precursors that was not possible to further reduce by application of TrkB-Fc (Figure 7B,C; Table 1). These experiments suggest that BDNF and GABA control cell migration via the same pathway.

We then asked whether GABA-induced Ca^{2+} fluctuation in astrocytes might regulate local delivery of BDNF to neuroblasts. To address this, we prepared cultures of astrocytes from the adult SVZ. These cultures contain mostly astrocytes, as verified by the labeling for GFAP, Tuj1, and receptor-interacting protein, markers for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes, respectively, and are immunopositive for TrkB (data not shown). To investigate whether Ca^{2+} activity in astrocytes induces BDNF release, we first preincubated these cultures with BDNF (10 ng/ml), washed extensively, and then treated with 10 μM GABA for 30 min. Activation of GABA receptors on astrocytes did not change the amount of secreted BDNF in these cultures ($92.7 \pm 5.9\%$ of control; $n = 3$), indicating that GABA does not induce release of BDNF from astrocytes.

We then tested whether GABA-induced Ca^{2+} fluctuation in astrocytes might regulate trafficking of TrkB receptors and thereby control the amount of extracellular BDNF available to neuroblasts. We incubated acute adult mouse forebrain slices with bicuculline (100 μM) or GABA (10 μM) for 1 h, extracted the RMS, and analyzed surface TrkB receptor level by cell-surface biotinylation of the dissociated cells. Incubation of slices with bicuculline reduced the amount of TrkB receptors located at the surface of RMS cells to $77.4 \pm 2.5\%$ of control levels ($n = 4$ animals; $p < 0.05$) (Figure 8A), whereas treatment with GABA (10 μM) increased their amount to $122.4 \pm 5.1\%$ ($n = 4$ animals; $p < 0.05$) (Figure 8A). Interestingly, blocking Ca^{2+} fluctuations in astrocytes by 2-APB (100 μM) reduced the amount of TrkB receptors located at the surface to $63.2 \pm 10.1\%$ ($n = 3$ animals; $p < 0.05$) (Figure 8A). It is also noteworthy that incubation of slices with BDNF (10 ng/ml) for 1 h decreased the amount of surface TrkB receptors to $77.9 \pm 6.5\%$ ($n = 3$ animals; $p < 0.05$) (Figure 8A).

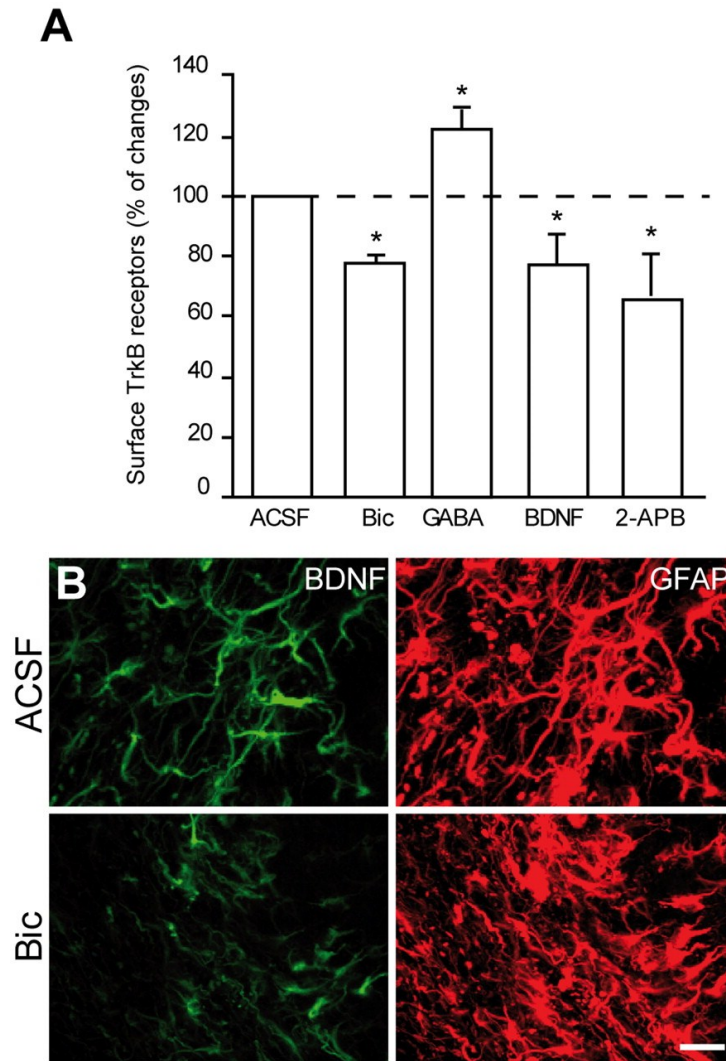


Figure 8. GABA induces insertion of TrkB receptors on membrane of astrocytes. A, Preincubation of slices with bicuculline (Bic; 100 μ M), BDNF (10 ng/ml), or 2-APB (100 μ M) for 1 h reduces amount of surface TrkB receptors. In contrast, treatment with GABA (10 μ M for 1 h) increases the amount of surface TrkB receptors. The cell-surface molecules of freshly isolated cells, extracted from RMS, were labeled with Sulfo-NHS-biotin. Cell lysates were precipitated with streptavidin-coated agarose beads and immunolabeled with TrkB antibodies. The amount of surface TrkB receptors was analyzed by ELISA. B, Incubation of acute slices of the adult mouse forebrain with bicuculline (100 μ M) decreases immunolabeling for BDNF in the adult RMS. Scale bar, 10 μ m.

These data suggest that modulation of Ca^{2+} fluctuations in astrocytes by endogenous GABAergic signaling is required for plasma membrane insertion of TrkB receptors and that binding of BDNF to this receptor induces its internalization. If endogenous GABAergic signaling induces the insertion of TrkB receptors on the plasma membrane, then blocking GABA receptors with bicuculline should decrease trapping of BDNF by astrocytes. Indeed, BDNF immunostaining in slices previously incubated with bicuculline (100 μM) for 1 h induced a twofold reduction in BDNF labeling ($51.05 \pm 0.4\%$ decrease; data were normalized for GFAP immunostaining; $n = 3$ animals) (Figure 8B). These results suggest that GABAergic signaling from neuroblasts facilitates insertion of TrkB on the plasma membrane of RMS astrocytes. The newly inserted TrkB receptor is then able to bind to BDNF and therefore might act to reduce BDNF availability for migrating neuronal precursors. Through this pathway, neuroblasts might control the periodicity of their migratory and stationary phases and thus their own migration.

Discussion

The present study has demonstrated that blood vessels provide structural organization and molecular cues important for neuroblast migration in the adult brain. Our data reveal that vasculature parallels the migratory stream of neuronal precursors and guides them toward and into OB. We also discovered the underlying mechanism of vasculature-associated migration of neuronal precursors. Our data suggest that the endothelial cells of blood vessels constitutively synthesize BDNF, which is released within the extracellular space and fosters neuronal migration via p75NTR expressed by these migrating cells. We hypothesize that migrating neuroblasts control their own migration by regulating the amount of free extracellular BDNF. GABA released from neuronal precursors induces Ca^{2+} -dependent insertion of high-affinity TrkB receptors into the plasma membrane of astrocytes that ensheath migrating neuroblasts and contact blood vessels. This leads to trapping of extracellular BDNF and, therefore, might foster the entry of migrating cells to the stationary phase. Together, our data highlight an unexpected organization of blood vessels in the adult migratory stream and provide a functional and mechanistic explanation for the long-distance saltatory migration of neuronal precursors from the posterior (SVZ) to the most anterior (OB) parts of the adult brain (for a model, see Figure 2H).

Blood vessels as a substrate for a long-distance migration of newborn cells in the adult brain

The mechanisms of long-distance migration of neuronal precursors in the adult brain have remained elusive. Neuronal precursors were generally assumed to course from the SVZ toward and into the OB in response to chemoattractive molecules, whereas chemorepellent cues were thought to keep these cells in the migratory stream and impede their invasion of neighboring territories. Although *in vitro* studies suggested the existence of such chemoattractive cues (Ng et al., 2005; Paratcha et al., 2006), surgical removal of the OB *in vivo* did not affect migration of neuronal precursors (Jankovski et al., 1998; Kirschenbaum et al., 1999). With regard to the chemorepellent molecules, it has been demonstrated that the septum (Wu et al., 1999) and the choroid plexus (Sawamoto et al., 2006) secrete Slit, a

molecule that repels neuronal precursors from the posterior parts of the brain. The gradient of Slit is created by the beating of cilia of the ependymal cells bordering lateral ventricle (Sawamoto et al., 2006). Although this gradient is important for the navigation of migrating cells in the SVZ (Sawamoto et al., 2006), it is difficult to imagine how the unidirectional vectorial gradient of a single molecule might explain the complex-shaped curvature migration of newborn cells in the RMS. For newborn cells to remain in the RMS and migrate through various brain regions toward and into OB, all RMS-neighboring territories would have to secrete chemorepellent guidance cues. However, because the adult migratory stream has a very complex curvature architecture, gradients of many different chemorepellent molecules would be required to ensure faithful migration of newborn cells (Figure 2H). The vasculature-guided migration hypothesis proposed here offers a much simpler and cogent explanation of the functional organization of the long-distance journey of newborn cells from caudal to the most rostral parts of the forebrain (for a model, see Figure 2H). This hypothesis allows us to envisage the organization of the migratory pathway in the adult forebrain without a requirement for myriad chemoattractive, chemorepellent, and chemopmissive cues. In the context of newborn cells migrating along blood vessels, a single repellent molecule might be sufficient to push cells away from the posterior parts of the brain (Wu et al., 1999; Sawamoto et al., 2006), with vasculature providing local cues (BDNF and likely many others) to keep migrating precursors in the RMS and guide them in the adult forebrain. In such a perspective, the major difficulty for migrating cells is to “jump” in the core of the OB from the blood vessels oriented parallel to the tangentially migrating cells to the ones that are oriented perpendicularly and start thereafter radial migration. It seems that this is indeed a difficult task for migrating cells because many of them become lost and detached from vasculature in the core of OB. However, the cells that succeed in exiting from the RMSOB and start their radial migration do this along blood vessels. In accordance with our results are observations showing close association of radially migrating cells in the OB with blood vessels (Bovetti et al., 2007).

BDNF and mechanisms of vasculature-associated migration of newborn cells

BDNF plays an important role in the neuronal migration during development (Polleux et al., 2002; Marín and Rubenstein, 2003; Zhou et al., 2007). Here, by modulating the level of BDNF expression specifically in the adults, we show that vasculature-derived BDNF controls neuronal migration in the adult SVZ–OB pathway. Interestingly, the effect of BDNF is directly mediated by p75NTR present on the neuroblast. Several studies have examined the expression pattern of p75NTR in the SVZ and RMS of adult and young animals [postnatal day 7 (P7)] (Giuliani et al., 2004; Gascon et al., 2007; Young et al., 2007; Bath et al., 2008; Galvão et al., 2008). Although most of the p75NTR immunoreactivity in the adult SVZ was associated with a small fraction of proliferating nestin⁺ cells (Giuliani et al., 2004; Young et al., 2007), some of the migrating neuronal precursors have been also shown to express p75NTR (Young et al., 2007; Galvão et al., 2008). p75NTR is not observed in the RMS of young animals (P7) (Gascon et al., 2007), but, when neuronal precursors are cultured in vitro, they start to express high levels of this neurotrophic receptor (Gascon et al., 2005). Recently, it has been reported that, in the adult RMS, p75NTR is present on rapidly dividing C-type cells (Bath et al., 2008). This population of cells is, however, essentially undetectable in electron microscopic studies of the adult RMS (Doetsch et al., 1997; Gritti et al., 2002). Another study that has examined expression of p75NTR in the adult RMS has reported the presence of “immunoreactive cells assembled in the continuous chains and elongated in the direction parallel to the migratory stream” (Giuliani et al., 2004), consistent with the data reported here. Using immunolabeling with cell-type-specific markers, semiquantitative RT-PCR of FACS-purified neuroblasts and astrocytes, function-blocking antibodies for p75NTR, genetically engineered mice deficient for this receptor, and time-lapse video microscopy of cell migration, we demonstrated that p75NTR is expressed by migrating neuroblasts in the adult RMS and controls their migration in response to BDNF. It has been shown previously that p75NTR is involved in axonal growth, as well as the migration of glioma and Schwann cells (Anton et al., 1994; Johnston et al., 2007). Intriguingly, 28 d after BrdU injection, no differences in the number of BrdU⁺ cells was detected in the OB of p75NTR-deficient

animals (Bath et al., 2008). These data suggest that different survival rates of newly arrived neurons in the OB of p75NTR-deficient mice compared with wild-type littermates might be involved. Together with recently published data implicating this receptor in the neuroblasts production (Young et al., 2007), our data indicate that p75NTR plays a dual role in the adult OB neurogenesis by controlling the generation of neuronal precursors (Young et al., 2007) and their migration toward and into OB.

Our data also suggest that the migrating neuroblasts themselves might regulate the level of extracellular BDNF and, therefore, the duration of their migratory phase. GABA released from migrating neuroblasts induces Ca^{2+} fluctuations in astrocytes through activation of GABA receptors. This Ca^{2+} activity led to the insertion of high-affinity TrkB receptors on the plasma membrane of astrocytes and subsequently to the trapping of extracellular BDNF. We hypothesize that, through this mechanism, neuroblasts can control the periodicity of their migratory and stationary phases. Thus, the astrocytes that ensheath neuronal precursors (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002; Lledo and Saghatelian, 2005) and contact blood vessels play an important regulatory role in the vasculature-associated migration of neuronal precursors, because they regulate the amount of free BDNF available to migrating neuronal precursors. Our data, therefore, reveal a novel mechanism by which astrocytes regulate neuronal migration in the adult RMS. In agreement with this are our results showing that conditional removal of TrkB receptors on astrocytes drastically affects neuronal migration in the adult brain. It is conceivable that neuronal precursors undergo stationary periods to accumulate energy and receive additional signals for their migration. We hypothesize that removing this important regulatory cascade that ensures periodicity of migratory and stationary phases leads to the abnormal migration of neuronal precursors and, therefore, to reduced number of BrdU+ cells in the OB 5 d after BrdU injection. Our data are in line with recently reported reduction in the number of BrdU+ cells, 28 d after BrdU injection, in TrkB haploinsufficient mice (Bath et al., 2008). This effect was, however, attributed to the role of TrkB receptors expressed on neuroblasts (Chiaramello et al., 2007; Bath et al., 2008). Here, using acute slices prepared from the adult forebrain, we were not able to detect any effect of TrkB inhibitor on neuronal migration. In addition, application of BDNF or TrkB-Fc in the slices prepared from p75NTR-deficient mice and direct real-time monitoring of cell migration did not reveal any

differences in the migratory behavior of neuroblasts. These results are in line with the recently proposed role for TrkB receptors in the adult SVZ–RMS pathway (Galvão et al., 2008). Together, the mechanisms described here offer a simple and cogent explanation of long-range migration of neuronal precursors in the adult brain.

Acknowledgement

This work was supported by Canada Foundation for Innovation (CFI), Parkinson Society Canada, and Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grants (A.S.). A.S. is a recipient of a Canada Research Chair in postnatal neurogenesis. We thank Drs. S. Nakamura (National Institute of Neuroscience, Tokyo, Japan), E. Castren (University of Helsinki, Helsinki, Finland) for providing BDNF plasmids, Dr. M. Kojima (National Institute of Advanced Science and Technology, Ikeda, Japan) for providing BDNF–GFP plasmid, Dr. J. Lee (Harvard Gene Therapy Initiative, Harvard Medical School, Boston, MA) for providing defective retroviral vector pMMP–f2–IRES–EGFP, and Drs. Freda Miller, Alain Trembleau, and Isabelle Caille for the comments on a previous version of this manuscript.

References

1. Alderson RF, Curtis R, Alterman AL, Lindsay RM, DiStefano PS (2000) Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin- 4/5 by rat astrocytes and schwann cells in vitro. *Brain Res* 871:210–222.
2. Altman J, DasGD (1966) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol* 126:337–389.
3. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629–634.
4. Anton ES, Weskamp G, Reichardt LF, Matthew WD (1994) Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2795–2799.
5. Anton ES, Ghashghaei HT, Weber JL, McCann C, Fischer TM, Cheung ID, Gassmann M, Messing A, Klein R, Schwab MH, Lloyd KC, Lai C (2004) Receptor tyrosine kinase ErbB4 modulates neuroblast migration and placement in the adult forebrain. *Nat Neurosci* 7:1319–1328.
6. Bath KG, Mandairon N, Jing D, Rajagopal R, Kapoor R, Chen ZY, Khan T, Proenca CC, Kraemer R, Cleland TA, Hempstead BL, Chao MV, Lee FS (2008) Variant brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) alters adult olfactory bulb neurogenesis and spontaneous olfactory discrimination. *J Neurosci* 28:2383–2393.
7. Bédard A, Parent A (2004) Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Brain Res Dev Brain Res* 151:159–168.
8. Belvindrah R, Hankel S, Walker J, Patton BL, Müller U (2007) Beta1 integrins control the formation of cell chains in the adult rostral migratory stream. *J Neurosci* 27:2704–2717.
9. Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D, Goldman SA (2001) Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci* 21:6718–6731.
10. Berthod F, Germain L, Tremblay N, Auger FA (2006) Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. *J Cell Physiol* 207:491–498.
11. Bolteus AJ, Bordey A (2004) GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 24:7623–7631.

12. Bovetti S, Hsieh YC, Bovolin P, Perroteau I, Kazunori T, Puche AC (2007) Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 27:5976–5980.
13. Chiaramello S, Dalmaso G, Bezin L, Marcel D, Jourdan F, Peretto P, Fasolo A, De Marchis S (2007) BDNF/TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur J Neurosci* 26:1780–1790.
14. Snapyan et al. • Vasculature-Derived BDNF Fosters Neuronal Migration *J. Neurosci.*, April 1, 2009 • 29(13):4172–4188 • 4187
15. Clary DO, Reichardt LF (1994) An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11133–11137.
16. Conover JC, Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Gale NW, Yancopoulos GD, Alvarez-Buylla A (2000) Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci* 3:1091–1097.
17. Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, Kraemer P, Scheff S, Barthels D, Rajewsky K, Wille W (1994) Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367:455–459.
18. Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046–5061.
19. Du J, Feng L, Zaitsev E, Je HS, Liu XW, Lu B (2003) Regulation of TrkB receptor tyrosine kinase and its internalization by neuronal activity and Ca²⁺ influx. *J Cell Biol* 163:385–395.
20. Fraser DD, Duffy S, Angelides KJ, Perez-Velazquez JL, Kettenmann H, MacVicar BA (1995) GABA_A/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 15:2720–2732.
21. Galvão RP, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008) Brain-derived neurotrophic factor signaling does not stimulate subventricular zone neurogenesis in adult mice and rats. *J Neurosci* 28:13368–13383.
22. Gascon E, Vutskits L, Zhang H, Barral-Moran MJ, Kiss PJ, Mas C, Kiss JZ (2005) Sequential activation of p75 and TrkB is involved in dendritic development of subventricular zone-derived neuronal progenitors in vitro. *Eur J Neurosci* 21:69–80.
23. Gascon E, Vutskits L, Jenny B, Durbec P, Kiss JZ (2007) PSA-NCAM in postnatally generated immature neurons of the olfactory bulb: a crucial role in regulating p75 expression and cell survival. *Development* 134:1181–1190.

24. Giuliani A, D'Intino G, Paradisi M, Giardino L, Calza` L (2004) p75(NTR)-immunoreactivity in the subventricular zone of adult male rats: expression by cycling cells. *J Mol Histol* 35:749–758.
25. Goggi J, Pullar IA, Carney SL, Bradford HF (2003) The control of [125I]BDNF release from striatal rat brain slices. *Brain Res* 967:201–209.
26. Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL (2002) Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 22:437–445.
27. Guo S, Kim WJ, Lok J, Lee SR, Besancon E, Luo BH, Stins MF, Wang X, Dedhar S, Lo EH (2008) Neuroprotection via matrix-trophic coupling between cerebral endothelial cells and neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7582–7587.
28. Hack I, Bancila M, Loulier K, Carroll P, Cremer H (2002) Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat Neurosci* 5:939–945.
29. Hinds JW (1968) Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. II. Cell proliferation and migration. *J Comp Neurol* 134:305–322.
30. Hu H, Tomaszewicz H, Magnuson T, Rutishauser U (1996) The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* 16:735–743.
31. Jankovski A, Sotelo C (1996) Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *J Comp Neurol* 371:376–396.
32. Jankovski A, Garcia C, Soriano E, Sotelo C (1998) Proliferation, migration and differentiation of neuronal progenitor cells in the adult mouse subventricular zone surgically separated from its olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 10:3853–3868.
33. Johnston AL, Lun X, Rahn JJ, Liacini A, Wang L, Hamilton MG, Parney IF, Hempstead BL, Robbins SM, Forsyth PA, Senger DL (2007) The p75 neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion. *PLoS Biol* 5:e212.
34. Kirschenbaum B, Doetsch F, Lois C, Alvarez-Buylla A (1999) Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. *J Neurosci* 19:2171–2180.
35. Lee KF, Li E, Huber LJ, Landis SC, Sharpe AH, Chao MV, Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell* 69:737–749.

36. Leventhal C, Rafii S, Rafii D, Shahar A, Goldman SA (1999) Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Mol Cell Neurosci* 13:450–464.
37. Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A (2005) Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 8:1179–1187.
38. Lledo PM, Saghatelian A (2005) Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci* 28:248–254.
39. Lois C, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978–981.
40. Louissaint A Jr, Rao S, Leventhal C, Goldman SA (2002) Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron* 34:945–960.
41. Marín O, Rubenstein JL (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26:441–483.
42. Mason HA, Ito S, Corfas G (2001) Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents. *J Neurosci* 21:7654–7663.
43. Minichiello L, Korte M, Wolfer D, Kühn R, Unsicker K, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Lipp HP, Bonhoeffer T, Klein R (1999) Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 24:401–414.
44. Mori T, Tanaka K, Buffo A, Wurst W, Kühn R, Götz M (2006) Inducible gene deletion in astroglia and radial glia—a valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia* 54:21–34.
45. Murase S, Horwitz AF (2002) Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J Neurosci* 22:3568–3579.
46. Ng KL, Li JD, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG, Zhou QY (2005) Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science* 308:1923–1927.
47. Ono K, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U (1994) N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* 13:595–609.
48. Ono M, Yanagawa Y, Koyano K (2005) GABAergic neurons in inferior colliculus of the GAD67-GFP knock-in mouse: electrophysiological and morphological properties. *Neurosci Res* 51:475–492.

49. Paratcha G, Ibañez CF, Ledda F (2006) GDNF is a chemoattractant factor for neuronal precursor cells in the rostral migratory stream. *Mol Cell Neurosci* 31:505–514.
50. Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21:6706–6717.
51. Polleux F, Whitford KL, Dijkhuizen PA, Vitalis T, Ghosh A (2002) Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* 129:3147–3160.
52. Rubio N (1997) Mouse astrocytes store and deliver brain-derived neurotrophic factor using the non-catalytic gp95trkB receptor. *Eur J Neurosci* 9:1847–1853.
53. Saghatelian A, de Chevigny A, Schachner M, Lledo PM (2004) Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7:347–356.
54. Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla A (2006) New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311:629–632.
55. Wu W, Wong K, Chen J, Jiang Z, Dupuis S, Wu JY, Rao Y (1999) Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 400:331–336.
56. Young KM, Merson TD, Sothibundhu A, Coulson EJ, Bartlett PF (2007) p75 neurotrophin receptor expression defines a population of BDNF-responsive neurogenic precursor cells. *J Neurosci* 27:5146–5155.
57. Zhou P, Porcionatto M, Pilapil M, Chen Y, Choi Y, Tolias KF, Bikoff JB, Hong EJ, Greenberg ME, Segal RA (2007) Polarized signaling endosomes coordinate BDNF-induced chemotaxis of cerebellar precursors. *Neuron* 55: 53–68.