VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2011 - Thèse n°

CRÉATION D'UN MODÈLE DE RUPTURE AIGUË DE LA BARRIÈRE CUTANÉE CHEZ LE CHIEN ET ESSAI DE QUANTIFICATION PAR LA MESURE DE LA PERTE INSENSIBLE EN EAU

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 28 novembre 2011
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

SCHAFFO Armelle
Née le 8 juillet 1985
à Besançon (25)

ENSEIGNANTS DU CAMPUS VETERINAIRE DE VETAGRO SUP

NOM	Prénom	Grade	Unité Pédagogique
ALOGNINOUWA	Théodore	Professeur 1ere cl	Pathologie du bétail
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences hors cl	Gestion des élevages
ARCANGIOLI	Marie-Anne	Maître de conférences cl normale	Pathologie du bétail
ARTOIS	Marc	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
BECKER	Claire	Maître de conférences cl normale	Pathologie du bétail
BELLI	Patrick	Maître de conférences associé	Pathologie morphologique et clinique
BELLUCO	Sara	Maître de conférences cl normale	Pathologie morphologique et clinique
BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences cl normale	Equine
BENOIT	Etienne	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
BERNY	Philippe	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
BOULOCHER	Caroline	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
BOURDOISEAU	Gilles	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
BRUYERE	Pierre	Maître de conférences Contractuel	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
BUFF	Samuel	Maître de conférences cl normale	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
BURONFOSSE	Thierry	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
CACHON	Thibaut	Maître de conférences Contractuel	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
CADORE	Jean-Luc	Professeur 1ere cl	Pathologie médicale des animaux de compagnie
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
CAROZZO	Claude	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
CHABANNE	Luc	Professeur 1ere cl	Pathologie médicale des animaux de compagnie
CHALVET-MONFRAY	Karine	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
COMMUN	Loic	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
DEMONT	Pierre	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
DESJARDINS PESSON	Isabelle	Maître de conférences Contractuel	Equine
DJELOUADJI	Zorée	Maître de conférences stagiaire	Santé Publique et Vétérinaire
ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences cl normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie
FAU	Didier	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
FOURNEL	Corinne	Professeur 1ere cl	Pathologie morphologique et clinique
FRANCK	Michel	Professeur 1ere cl	Gestion des élevages
FRIKHA	Mohamed-Ridha	Maître de conférences cl normale	Pathologie du bétail
GANGL	Monika	Maître de conférences Contractuel	Equine
GARNIER	François	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
GENEVOIS	Jean-Pierre	Professeur cl ex	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur 2eme cl	Biologie Fonctionnelle
GONTHIER	Alain	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
GRAIN	Françoise	Professeur 2eme cl	Gestion des élevages
GRANCHER	Denis	Maître de conférences hors cl	Gestion des élevages
GREZEL	Delphine	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
GUERIN	Pierre	Professeur 2eme cl	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
GUERIN-FAUBLEE	Véronique	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
HUGONNARD	Marine	Maître de conférences cl normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie

ENSEIGNANTS DU CAMPUS VETERINAIRE DE VETAGRO SUP

NOM	Prénom	Grade	Unité Pédagogique
JUNOT	Stéphane	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
KECK	Gérard	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
KODJO	Angeli	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
LACHERETZ	Antoine	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
LAMBERT	Véronique	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
LE-GRAND	Dominique	Maître de conférences hors cl	Pathologie du bétail
LEBLOND	Agnes	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Maître de conférences cl normale	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
LEPAGE	Olivier	Professeur 1ere cl	Equine
LOUZIER	Vanessa	Maître de conférences cl normale	Biologie Fonctionnelle
MARCHAL	Thierry	Maître de conférences hors cl	Pathologie morphologique et clinique
MIALET	Sylvie	Inspecteur de la santé publique vétérinaire (ISPV) faisant fonction de MC	Santé Publique et Vétérinaire
MOUNIER	Luc	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
PEPIN	Michel	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
PIN	Didier	Maître de conférences cl normale	Pathologie morphologique et clinique
PONCE	Frédérique	Maître de conférences cl normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie
PORTIER	Karine	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
PROUILLAC	Caroline	Maître de conférences cl normale	Biologie fonctionnelle
REMY	Denise	Professeur 2eme cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
ROGER	Thierry	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
SABATIER	Philippe	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
SAWAYA	Serge	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
SERGENTET	Delphine	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
THIEBAULT	Jean-Jacques	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
VIGUIER	Eric	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
VIRIEUX-WATRELOT	Dorothée	Maître de conférences Contractuel	Pathologie morphologique et clinique
ZENNER	Lionel	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire

REMERCIEMENTS

Aux membres de notre jury de thèse, pour l'honneur qu'ils nous ont fait de participer à ce jury.

A Monsieur le Professeur Jean-François NICOLAS,
De la Faculté de Médecine de Lyon,
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Avec toute notre gratitude et nos hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur Vétérinaire Didier PIN,
Du campus vétérinaire de VetAgro Sup,
Qui nous a fait l'honneur d'accepter de nous encadrer, de nous corriger et de nous conseiller lors de l'élaboration de ce travail,
Pour son aide et sa précieuse relecture,
Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect les plus sincères.

A Monsieur le Docteur Thierry MARCHAL,
Du campus vétérinaire de VetAgro Sup,
Qui nous a fait l'honneur d'accepter de participer à notre jury de thèse.

A Madame le Docteur Vétérinaire Emilie VIDEMONT,
Du campus vétérinaire de VetAgro Sup,
Pour son implication dans ce travail, sa disponibilité, son aide et ses conseils avisés,
Sincères remerciements.

Aux techniciens de l'Institut Claude Bourgelat et aux techniciennes du laboratoire d'hématologie et d'histologie,
Du campus vétérinaire de VetAgro Sup,
Qu'ils soient remerciés pour leur travail.

A mes parents.

A mon frère.

A toute ma famille.

A mes amis.

A toutes les personnes qui ont participé et qui participent encore à ma formation.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX 13
LISTE DES FIGURES 14
LISTE DES ABREVIATIONS 15
INTRODUCTION 17
1ère PARTIE: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 19
I. Structure et fonctionnement de la peau saine 20
1. Rappels anatomiques et histologiques 20
a. L'épiderme 20
i. La couche basale 20
ii. La couche épineuse 21
iii. La couche granuleuse 22
iv. La couche claire 22
v. La couche cornée 22
b. La jonction dermo-épidermique 24
c. Le derme 24
d. L'hypoderme 24
2. Processus de kératinisation et de desquamation 25
a. La kératinisation 25
b. La desquamation 26
II. Notion de barrière cutanée 27
1. Principales fonctions de la barrière cutanée 27
a. La barrière imperméable 27
b. La barrière antimicrobienne 27
c. La barrière contre les allergènes environnementaux 28
2. Eléments constitutifs de la barrière 28
a. Le stratum corneum 28
i. Les cornéocytes 28
ii. Les lipides 31
iii. Les cornéodesmosomes 38
iv. L'organisation du stratum corneum et ses différents modèles 39
b. Les couches nucléées 39
3. Homéostasie et réparation de la barrière cutanée 40
a. Les différentes étapes de la réparation de la barrière 40
b. Les signaux régulateurs 41
c. Les facteurs influençant la restauration de l'épiderme 43

III. La perte insensible en eau 43
1. Le rôle de l'eau dans la couche cornée 43
2. Définition de la perte insensible en eau 44
3. La fonction barrière et la perte insensible en eau 45
4. Mesure de la perte insensible en eau 47
a. Les différents appareils 47
i. Appareils à chambre ouverte 47
ii. Appareils à chambre fermée 48
iii. Comparaison des deux types d'appareils 49
b. Facteurs de variation 49
i. Variations dues à l'appareil 49
ii. Influence de l'environnement 50
iii. Facteurs individuels 51
iv. Recommandations 53
c. Applications 53
d. Quelques résultats expérimentaux 54
i. Homme 54
ii. Souris 55
iii. Chien 55
IV. Méthodes de rupture de la barrière cutanée 59
1. Présentation 59
2. Intérêts et exemples d'applications 59
3. Méthode dite de « tape stripping » 60
a. Bref historique de la méthode 60
b. Description 61
c. Applications 61
d. Facteurs de variations 62
i. Facteurs intrinsèques 62
ii. Facteurs extrinsèques 63
iii. Recommandations 63
e. Quelques données 64
i. L'homme 64
ii. La souris 64
iii. Le chien 65
2ème PARTIE: ETUDE EXPERIMENTALE 69
I. Introduction 70
II. Matériel et méthode 70
1. Animaux 70
2. Protocole expérimental 71

3. Suivi de la restauration de la barrière cutanée 72
a. Examen dermatologique 72
b. Examen histopathologique 72
c. Immunohistochimie 72
d. Mesures de la perte insensible en eau 73
III. Résultats 74
1. Evaluation clinique 74
2. Observations histopathologiques 74
3. Résultats immunohistochimiques 77
a. Etude de la prolifération cellulaire 77
b. Etude de l'infiltrat inflammatoire 77
4. Mesures de la perte insensible en eau 78
IV. Discussion 82
1. Rupture de la barrière cutanée 82
2. Examens cliniques 82
3. Observations histologiques et immunohistochimiques 83
a. Rétablissement de la couche cornée 83
b. Multiplication cellulaire 83
c. Réponse inflammatoire 84
4. La perte insensible en eau 85
a. Application à l'espèce canine et choix d'un appareil 85
b. Variabilité et reproductibilité des mesures 86
c. Evolution de la perte insensible en eau au cours de la restauration 87
CONCLUSION ..... **Erreur ! Signet non défini.**
BIBLIOGRAPHIE 93
ANNEXES 99
I. Compléments d'information sur les autres types cellulaires de l'épiderme 99
1. Les cellules de Merkel 99
2. Les mélanocytes 99
3. Les cellules de Langerhans 99
II. Compléments d'information sur les différentes jonctions cellulaires 100
III. Tableau regroupant les valeurs brutes de perte insensible en eau 101

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Avantages et inconvénients des différents types d'appareils de mesure de la perte insensible en eau……52

Tableau II : Synthèse des études évaluant la perte insensible en eau dans l'espèce canine……56-57

Tableau III : Récapitulatif des études ayant utilisé la méthode de « tape stripping » chez des chiens……66

Tableau IV : Moyennes et écarts types des mesures de la perte insensible en eau en $g.m^{-2}.h^{-1}$……78-79

Tableau V : Valeurs brutes de perte insensible en eau en $g.m^{-2}.h^{-1}$ et moyennes, écarts types, variances, coefficients de variation et pourcentages de récupération associés……101-102-103

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de l'épiderme, adaptée de (35)……23

Figure 2 : Assemblage de l'enveloppe cornée, d'après (25)……31

Figure 3 : Structure des céramides libres mis en évidence dans le *stratum corneum* de l'homme (ancienne et [nouvelle nomenclature]), d'après (35)……33

Figure 4 : Formation de la barrière cutanée, d'après (6)……35

Figure 5 : Processus de formation de la matrice lipidique lamellaire, d'après (15)……36

Figure 6 : De la rupture à la restauration de la barrière cutanée……42

Figure 7 : Schéma d'une chambre de mesure ouverte, d'après (70)……48

Figure 8 : Mise en place d'un morceau de cellophane adhésive……71

Figure 9 : Réalisation des mesures sur les chiens……74

Figure 10 : Aspect macroscopique des sites aux différents temps……74

Figure 11 : Coupes histologiques, centrées sur l'épiderme, des biopsies réalisées à différents temps……76

Figure 12 : Coupes histologiques, centrées sur le derme, des biopsies réalisées 18 heures et 48 heures après la rupture mécanique……76

Figure 13 : Immunomarquage à l'aide de l'anticorps anti-Ki-67 de la peau biopsiée une heure et 48 heures après le « tape stripping »……77

Figure 14 : Immunomarquage à l'aide l'anticorps anti-BLA 36 de la peau biopsiée une heure, 18 heures, 48 heures et 72 heures après le « tape stripping »……78

Figure 15 : Evolution des valeurs moyennes de perte insensible en eau ($g.m^{-2}.h^{-1}$)……80

Figure 16 : Agrandissement du début du suivi des valeurs moyennes de perte insensible en eau ($g.m^{-2}.h^{-1}$)……81

Figure 17 : Evolution du pourcentage de récupération en fonction du temps pour chaque chien……81

Figure 18 : Pourcentages moyens de récupération en fonction du temps suite à une rupture aiguë……88

Figure 19 : Représentation schématique d'un desmosome……101

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- AMPc : 3',5'-Adénosine Monophosphate cyclique
- ARNm : Acide Ribonucléique messager
- Ca^{2+} : ion calcium
- °C : degré Celsius
- *et al.* : *et alii*
- g : gramme
- h : heure
- HMG-CoA réductase : Hydroxy-Méthyl-Glutaryl-Coenzyme A réductase
- IL : Interleukine
- kDa : kiloDalton
- m : mètre
- µm : micromètre
- mm : millimètre
- nm : nanomètre
- NMF : Natural Moisturizing Factor
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- pH : potentiel hydrogène
- PIE : Perte Insensible en Eau
- s : seconde
- SD : Standard Deviation
- TEWL : Transepidermal Water Loss
- TNF : Tumor Necrosis Factor

INTRODUCTION

La peau est, non seulement, l'organe le plus étendu du corps mais, également, le plus complexe. En effet, ce n'est pas moins de cinq types cellulaires différents qui contribuent à sa structure, sans compter les cellules issues du système immunitaire et de la circulation sanguine.

Les fonctions de la peau sont nombreuses et variées. Celle-ci participe au maintien de l'homéostasie interne et protège l'organisme contre les agressions extérieures, qu'elles soient chimiques (irritants, caustiques, radicaux libres…), physiques (traumatismes, ultraviolets…), microbiologiques (pathogènes de toutes sortes), ou immunologiques (haptènes et antigènes divers). C'est aussi un lieu de stockage (électrolytes, eau, graisses, vitamines, protéines, hydrates de carbone…), de production des annexes (griffes, poils…) et de thermorégulation par le biais du pelage, de la circulation sanguine superficielle et des glandes sudoripares. Le système immunitaire y est bien développé. C'est également un organe sensitif qui contient divers récepteurs permettant la sensibilité tactile, la proprioception et la nociception. Son élasticité et sa souplesse permettent la réalisation des mouvements tout en conservant la forme de l'organisme. D'autres fonctions de la peau, plus mineures, peuvent être citées telles que ses fonctions endocrines (synthèse de la vitamine D, conversion de certaines pro-hormones…), son rôle dans la vie sociale (signaux visuels, expression des émotions) et dans la reproduction (caractères sexuels secondaires, production de phéromones) (2, 12).

Indispensable à la survie en milieu terrestre, la barrière entre l'individu et l'environnement introduit la notion d'homéostasie assurée, pour la plus grande part, par l'épiderme. Ainsi, la fonction barrière est « la raison d'être » de l'épiderme (35).

Cette fonction barrière cutanée semble impliquée dans de nombreux troubles dermatologiques, notamment chez le chien (62). En outre, il est maintenant admis que des modifications de la barrière épidermique perturbent l'écosystème cutané et peuvent entraîner, secondairement, l'apparition de dermatoses (4).

Le *stratum corneum* est l'élément majeur de la barrière épidermique. Son étude est, donc, un des éléments clés dans la compréhension des phénomènes régissant cette dernière.

Il s'avère que les moyens d'exploration du *stratum corneum* sont fiables et facilement reproductibles chez l'homme. Face à ce constat, nous pouvons nous demander ce qu'il en est dans l'espèce canine.

L'objectif de ce travail est triple.

Nous allons, dans un premier temps, tenter d'altérer mécaniquement la barrière cutanée du chien par la méthode dite de « tape stripping ». L'efficacité de cette rupture sera, alors, évaluée cliniquement, histopathologiquement et par la mesure de la perte insensible en eau.

Dans un second temps, nous nous intéresserons à la réponse de la peau suite à cette rupture de la barrière cutanée et à la restauration de celle-ci grâce au suivi des observations macroscopiques et microscopiques et des valeurs de la perte insensible en eau.

Enfin, nous essayerons de corréler le statut de la barrière cutanée et la perte insensible en eau.

La première partie de cette thèse sera consacrée à une mise au point sur les connaissances actuelles concernant la barrière cutanée et la perte insensible en eau.

Après quelques rappels sur l'organisation et le fonctionnement de la peau saine, nous approfondirons la notion de barrière cutanée en commençant par un aperçu de quelques fonctions de cette barrière. Puis, nous détaillerons les éléments la constituant et, enfin, nous étudierons son homéostasie et sa réparation. Ensuite, nous aborderons le phénomène de perte insensible en eau en nous intéressant au rôle de l'eau dans la couche cornée, à la perte insensible en eau, à sa relation avec la fonction barrière et à sa mesure. Pour finir, nous présenterons les différentes méthodes de rupture de la barrière cutanée et leurs application avant de nous attarder sur la technique consistant en des applications répétées de morceaux de cellophane adhésive.

La seconde partie est le compte-rendu d'une étude expérimentale originale visant à élaborer un modèle de rupture aiguë de la barrière cutanée chez le chien et à suivre la restauration de cette barrière par différents moyens.

Après avoir exposé les manipulations réalisées, les résultats obtenus et leur analyse, une discussion clôturera cette étude.

1ERE PARTIE: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DE LA PEAU SAINE

1. *RAPPELS ANATOMIQUES ET HISTOLOGIQUES*

La peau se compose des différentes structures que sont l'épiderme, le derme, l'hypoderme et les annexes épidermiques qui regroupent les follicules pileux, les glandes sébacées et les glandes sudoripares (65).

L'épaisseur de la peau varie selon les individus, le sexe, la race, l'âge et les zones anatomiques. Chez le chien, la peau est plus épaisse sur la ligne supérieure du corps et s'affine vers les parties ventrales pour le tronc et de la partie distale vers la partie proximale pour les membres. C'est le derme qui contribue à donner à la peau son épaisseur (2).

a. L'épiderme

L'épiderme est la structure la plus superficielle. C'est un épithélium malpighien kératinisé composé d'environ 85% de kératinocytes. Le reste se compose de cellules non épithéliales résidentes dont à peu près 5% de mélanocytes, 3 à 8% de cellules de Langerhans et 2% de cellules de Merkel.

L'épiderme peut être divisé en quatre couches de cellules que l'on différencie en fonction de leur morphologie et de leur stade de différentiation. En allant de la profondeur vers la surface, on trouve la couche basale (*stratum basale*), la couche épineuse ou massif de Malpighi (*stratum spinosum*), la couche granuleuse (*stratum granulosum*) et la couche cornée (*stratum corneum*). Au niveau des coussinets et de la truffe, il existe une couche supplémentaire intercalée entre les deux dernières : c'est la couche claire (*stratum lucidum*). Cependant, cette dernière couche semble, en fait, correspondre à la partie compacte du *stratum corneum*. En effet, la couche cornée étant très développée dans certaines régions, sa partie compacte l'est donc également ce qui la rend plus visible (59, 65).

De manière générale, le chien et le chat possèdent un épiderme composé de trois à cinq couches de cellules nucléées ce qui explique sa finesse (0,1 à 0,5mm). L'épiderme des carnivores domestiques est plus fin que celui de l'homme et ceci peut être relié à la présence du pelage. C'est au niveau des coussinets et de la truffe que l'épiderme est le plus épais et peut atteindre 1,5 mm (59).

i. La couche basale

Trois types cellulaires peuvent être observés dans l'assise germinative : les kératinocytes, les cellules de Merkel qui jouent le rôle de mécanorécepteurs à adaptation lente et les mélanocytes qui vont conférer à la peau sa pigmentation (59). Seuls les kératinocytes vont nous intéresser pour comprendre la suite. Pour plus de détails sur les deux autres types cellulaires, se reporter aux annexes.

Les kératinocytes

Ils forment une couche monocellulaire de cellules, de forme cuboïde à cylindrique, avec un rapport nucléocytoplasmique élevé et un cytoplasme nettement basophile. Ils sont solidement ancrés à la jonction dermo-épidermique grâce aux hémidesmosomes et aux filaments de kératines qui s'y attachent. Deux types de kératines sont exprimés par les cellules basales, ce sont les kératines K14 et K5.

C'est la seule couche dans laquelle les kératinocytes se divisent en situation normale (32, 41). Cette multiplication permet le renouvellement des kératinocytes qui sont repoussés vers la surface tandis qu'ils subissent une transformation aboutissant à la formation de cellules cornées qui vont desquamer.

Une même cellule possède différentes jonctions impliquées dans l'adhésion et la communication cellulaire. Se référer aux annexes pour de plus amples explications concernant ces structures.

Le cytosquelette des kératinocytes se compose de trois types de filaments cytoplasmiques : les filaments intermédiaires (kératines principalement), les filaments d'actine et les microtubules. Leurs rôles sont variés. Ils interviennent dans la forme, la structure, la mobilité, la résistance mécanique, l'élasticité, l'orientation, la polarisation des cellules et la transduction des signaux (59).

ii. La couche épineuse

La couche épineuse est constituée par les cellules filles de la couche basale. Ces dernières sont polygonales et s'aplatissent progressivement vers la surface (32). Le nombre de strates cellulaires qui la composent est variable selon la région anatomique mais c'est la couche la plus épaisse. Ceci est particulièrement marqué au niveau des coussinets, de la truffe et des jonctions cutanéo-muqueuses où l'on peut dénombrer jusqu'à vingt couches cellulaires (59).

L'aspect épineux de cette couche tient à la présence de très nombreux desmosomes qui sont à l'origine d'artéfacts à l'examen histologique. Leur observation donne l'impression d'avoir de multiples « ponts » entre les cellules qui font penser à des épines. En réalité, ces déformations résultent du processus de fabrication des coupes histologiques. Ces multiples jonctions permettent une très grande résistance mécanique à l'étirement et à la pression de cette partie de l'épiderme.

Les corps lamellaires, également appelés corps d'Odland, commencent à apparaître dans les couches les plus « anciennes » et donc les plus superficielles. Ils sont de taille variable, entre 0,2 et 0,5 µm de diamètre, et sont formés d'une membrane renfermant des « disques » assemblés parallèlement les uns aux autres et composés majoritairement de lipides (phospholipides, céramides, acides gras libres et stérols) et d'enzymes (41).

C'est au sein de cette couche que résident les cellules de Langerhans. Toutefois, elles peuvent aussi se trouver dans la couche basale. Ce sont des cellules dendritiques non pigmentées, présentatrices d'antigènes, capables de présenter de manière primaire

les antigènes aux lymphocytes. Elles forment un réseau de surveillance dans l'épiderme. Pour plus d'informations, se reporter aux annexes.

iii. La couche granuleuse

La couche granuleuse est fine et discontinue chez le chien et le chat. Le nombre d'assises cellulaires varie selon les zones anatomiques (une ou deux, voire même, aucune couche). Les kératinocytes qui la composent sont aplatis parallèlement à la surface de la peau et renferment un noyau pycnotique et des grains de kératohyaline qui apparaissent denses et très basophiles. Ceci explique le nom donné à cette couche. Ces grains ne possèdent pas de membrane et sont, en fait, des agrégats insolubles constitués majoritairement de profilaggrine mais aussi de loricrine et de protéines riches en résidus cystéine. Ils interviennent dans le processus de kératinisation et dans la fonction de barrière.

La profilaggrine est un précurseur de la filaggrine qui donnera environ dix molécules de filaggrine. Ces molécules sont responsables de la vitrification du cytoplasme des kératinocytes et sont une source d'acides aminés libres impliqués dans l'hydratation du *stratum corneum*. Les mutations du gène de la filaggrine sont à l'origine de l'ichtyose vulgaire de l'homme et d'environ la moitié des cas de dermatite atopique.

La loricrine est synthétisée en association avec les grains de kératohyaline et est impliquée dans la formation de l'enveloppe cornée et l'ancrage des filaments de kératine dans l'enveloppe cornée (59).

Une autre caractéristique inhérente à cette couche est la présence de plus en plus importante de corps lamellaires tandis que l'on s'approche de la couche cornée. Ils continuent de se former au sein du cytoplasme et se regroupent en périphérie et à l'apex des kératinocytes. Leur contenu sera déversé entre les cellules, à l'interface entre les couches granuleuse et cornée, dont ils vont combler les espaces intercellulaires (41).

iv. La couche claire

C'est une fine couche, homogène et compacte, constituée de cellules mortes contenant de la kératine et des gouttelettes d'une substance lipidique appelée éléidine. Dans une peau normale, elle se trouve uniquement au niveau des coussinets et de la truffe et de manière moins développée dans cette dernière (59). Comme il a été dit dans la partie I.1.a., cette couche correspondrait au *stratum compactum* qui est décrit comme une fine couche brillante, compacte et très kératinisée.

v. La couche cornée

Les kératinocytes qui la constituent sont arrivés au terme de leur différentiation et prennent le nom de cornéocytes. Chez le chien, la couche cornée est constituée de 35 à 51 couches de cellules mortes, anucléées, aplaties et complètement kératinisées. Son épaisseur moyenne est de 13,3 µm (33). Cette couche est en constante desquamation mais ce phénomène est compensé par la prolifération des cellules basales qui maintient constante l'épaisseur de l'épiderme.

Le cytoplasme des cornéocytes consiste en une matrice compacte composée des filaments intermédiaires de kératines agrégés entre eux par la filaggrine et orientés parallèlement à la surface de la peau. Les cornéocytes possèdent une structure hautement spécialisée située sous la membrane plasmique : elle porte le nom d'enveloppe cornée.

Une matrice lipidique, à structure lamellaire, remplit les espaces intercornéocytaires. La cohésion de la couche cornée est assurée par les cornéodesmosomes (59). Cette organisation particulière, comparable à celle d'un mur de briques et de mortier, fait que les substances doivent se frayer un passage dans ce « labyrinthe » pour traverser la couche cornée. En effet, elles ne passent pas au travers des cornéocytes, du fait des propriétés imperméables de ces derniers, mais uniquement entre eux. C'est ce même passage que suivent les molécules d'eau lors de la diffusion passive en direction du milieu extérieur. Cette configuration augmente la difficulté du passage de substances à travers le *stratum corneum*.

Deux parties peuvent être distinguées : le *stratum compactum* qui se compose de cornéocytes encore jointifs grâce à la présence de cornéodesmosomes apparemment intacts et le *stratum disjonctum* dont les cellules sont en cours de desquamation et où les cornéodesmosomes subissent une dégradation lente (41).

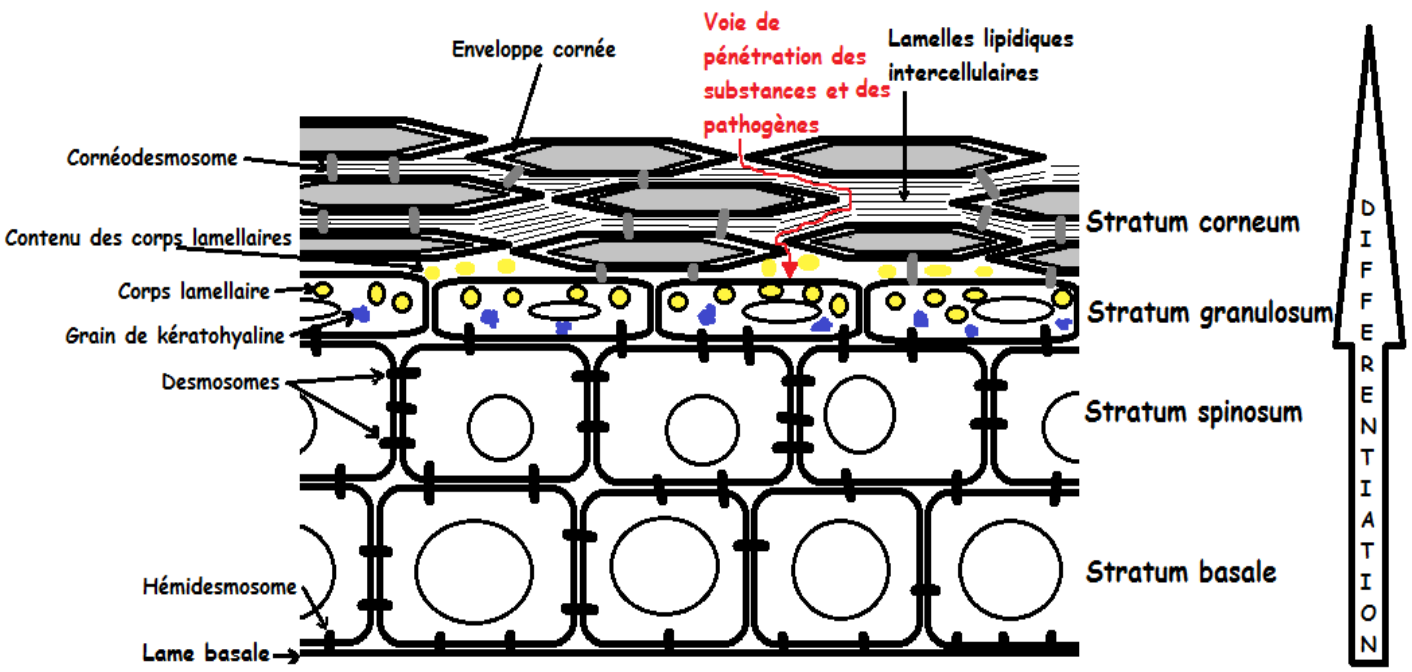

Figure 1 : Représentation schématique de l'épiderme, adaptée de (35).

b. La jonction dermo-épidermique

C'est une interface physico-chimique entre l'épiderme ou les autres structures cutanées (nerfs, vaisseaux, muscles lisses et follicules pileux) et le derme. Elle est plus développée dans la peau glabre et les jonctions cutanéo-muqueuses. Son renouvellement est constant.

Cette jonction est impliquée dans la cohésion dermo-épidermique, le maintien d'un épiderme fonctionnel, la conservation de l'architecture tissulaire, la cicatrisation, le rôle de barrière sélective et la régulation de la relation trophique entre l'épithélium et le tissu conjonctif. Elle influence l'adhésion, l'organisation du cytosquelette, la migration et la différenciation des cellules.

Des anomalies de la jonction dermo-épidermique sont rapportées dans certaines dermatoses héréditaires, telles que les épidermolyses bulleuses héréditaires, ou acquises, telles que la pemphigoïde bulleuse.

La jonction dermo-épidermique se compose de quatre parties qui sont, de la surface vers la profondeur, la membrane cytoplasmique basale des kératinocytes de la couche basale, la lame claire puis la lame dense de la lame basale et enfin l'espace sous-membranaire. Elle peut être mise en évidence par coloration des coupes histologiques à l'acide périodique-réactif de Schiff. C'est, en fait, uniquement l'espace sous-membranaire qui apparaît (59).

c. Le derme

Le derme est un tissu conjonctif dense, riche en collagène, où se trouvent également les annexes épidermiques, les muscles arrecteurs des poils, les vaisseaux sanguins et lymphatiques et les nerfs. Il se compose de fibres, d'une substance fondamentale faite de macromolécules solubles, comme les protéoglycanes, et de cellules (fibroblastes principalement mais aussi mastocytes, lymphocytes et histiocytes). Les fibres sont représentées, majoritairement, par les fibres de collagène et l'élastine. Ces constituants lui confèrent élasticité et résistance mécanique. Chez les animaux, il peut être séparé en derme profond et derme superficiel. Ce dernier possédant des fibres de collagène beaucoup plus fines que celles du derme profond avec une substance fondamentale plus abondante, plus de fibroblastes et de vaisseaux.

La plupart des fibres et des constituants de la substance fondamentale sont synthétisés par les fibroblastes. Ces derniers répondent à divers stimuli, comme les facteurs de croissance, élaborés par les kératinocytes, les cellules inflammatoires et même les fibroblastes eux-mêmes (41, 58, 59).

d. L'hypoderme

Il fait la transition entre le derme et les tissus sous-jacents mais n'est pas toujours présent. En effet, dans certaines zones, le derme est directement en contact avec les fascias et les muscles.

Il est composé d'adipocytes regroupés en lobules séparés par des travées conjonctives en continuité avec le derme. Les triglycérides représentent environ 90% de son poids.

Ses fonctions sont diverses : réserve d'énergie, rôle dans la thermogenèse, couche protectrice, amortissante et isolante (59).

2. *PROCESSUS DE KERATINISATION ET DE DESQUAMATION*

Une kératinisation et une desquamation défectueuses sont à l'origine de maladies caractérisées par un squamosis (37). Ainsi, un contrôle adapté de ces deux processus et une régulation fine de la balance multiplication/différentiation des kératinocytes sont indispensables au maintien d'un épiderme sain (59).

a. La kératinisation

Egalement appelée cornification, c'est un processus continu de différenciation des kératinocytes au cours duquel les cellules sont poussées vers la surface cutanée. Cette évolution à travers les couches de l'épiderme s'accompagne de modifications morphologiques et métaboliques des kératinocytes. Les filaments de kératines s'ordonnent et s'assemblent, notamment, grâce à la filaggrine. Cette transformation aboutit à la formation de cornéocytes, éléments constitutifs de la couche cornée s'apparentant à des « lentilles de kératine », qui finiront par desquamer.

Des facteurs nombreux et variés interviennent dans la régulation et la modulation de ce processus (implication de seconds messagers, d'enzymes, d'hormones, de facteurs nutritionnels…).

Les quatre étapes majeures du processus de différenciation sont :
- la synthèse des principales protéines fibreuses des kératinocytes
- la synthèse des grains de kératohyaline contenant, entre autres, la profilaggrine
- la formation de l'enveloppe cornée du *stratum corneum* qui est riche en protéines
- le comblement des espaces intercellulaires par une matrice lipidique riche en lipides non polaires suite à la libération du contenu des corps lamellaires (phospholipides, céramides, acides gras, stérols et enzymes hydrolytiques) après fusion de leur membrane limitante avec la membrane plasmique cellulaire (59).

Les kératines et la filaggrine constituent 80 à 90% de la masse protéique de l'épiderme des mammifères (56). Les kératines sont des protéines fibreuses, très stables, contenant des ponts disulfures. Ce sont les principales protéines structurales synthétisées dans les kératinocytes. Elles participent au réseau de tension qui assure la cohésion de l'ensemble de l'épiderme. On en distingue différents types : les α-kératines qui sont présentes chez les mammifères, dont l'homme, et les β-kératines que l'on trouve chez les reptiles et les oiseaux. Chez les mammifères, il existe deux familles au sein des α-kératines : les cytokératines (ou kératines épithéliales) et les exokératines (celles qui forment les poils, les cheveux, les griffes…). Une vingtaine de cytokératines différentes ont été identifiées chez l'homme. Chaque famille se subdivise encore en deux types : les kératines acides (de type I) et les kératines basiques ou neutres (de type II).

Une kératine acide s'associe toujours avec une kératine basique (66, 72, 73). Son précurseur, la prékératine, est une protéine fibreuse synthétisée par les kératinocytes des couches basale et épineuse (59). Au cours de la différentiation épidermique, des kératines spécifiques sont synthétisées et leur expression varie selon la couche de l'épiderme. En effet, les kératines K5 et K14 sont exprimées dans les kératinocytes de la couche basale, les kératines suprabasales sont les kératines K1 et K10 et les kératines K6 et K16 sont retrouvées dans les couches suprabasales lors du processus de cicatrisation, ou de psoriasis chez l'homme. Le fait d'avoir deux types de kératines à chaque fois limite les conséquences d'une mutation de l'une d'elles (11). En outre, des modèles expérimentaux de rupture, aiguë ou chronique, de la barrière cutanée ont montré des modifications de l'expression des kératines lors de la restauration de la barrière cutanée (56).

La différentiation cellulaire s'accompagne d'un accroissement de la synthèse protéique mais aussi de la lipogenèse. Le nombre de corps lamellaires va augmenter jusqu'à atteindre une densité maximale (environ 20% du cytosol) au niveau de la partie la plus superficielle de la couche granuleuse (41).

b. La desquamation

Elle doit être régulée de manière à maintenir l'épaisseur optimale du *stratum corneum*. Pour qu'elle puisse avoir lieu, il faut que les forces qui maintiennent les cornéocytes entre eux soient réduites. Or, ce sont les cornéodesmosomes qui permettent la cohésion des cellules entre elles. La desquamation va donc faire intervenir des enzymes protéolytiques qui vont dégrader progressivement les cornéodesmosomes. Parmi ces protéases spécifiques, l'enzyme chymotrypsique du *stratum corneum,* une protéine de 27 kDa, est la plus connue (37).

De nombreuses protéases du *stratum corneum* ont un pH optimal de 7 ou plus. Autrement dit, leur activité est maximale à ce pH. Cependant, le pH du *stratum corneum* normal est aux alentours de 5 à 5,5 chez l'homme. A ce pH, les protéases possèdent toujours une activité mais celle-ci est beaucoup plus faible tout en étant suffisante pour assurer une desquamation normale du *stratum corneum*. Si le pH augmente, l'activité des protéases sera stimulée ce qui va entrainer une exacerbation de la desquamation des cornéocytes conduisant à l'apparition de squames (14).

Le sulfate de cholestérol est un métabolite mineur qui joue un rôle clé dans la régulation de la desquamation. S'il est en excès, ce processus est inhibé. Cependant, le mécanisme d'action est inconnu (on suspecte une inhibition de certaines enzymes impliquées dans la destruction des desmosomes, une altération de la structure et la fonction des bicouches lipidiques…) (35). De plus, il stimule la différentiation des kératinocytes, inhibe la synthèse de cholestérol et l'activité de la HMG-CoA réductase (Hydroxy-Méthyl-Glutaryl-Coenzyme A réductase, enzyme clé du métabolisme du cholestérol) dans les kératinocytes et a un effet négatif sur la barrière imperméable. Dans l'épiderme, le sulfate de cholestérol est synthétisé par la cholestérol sulfotransférase, dont l'activité augmente parallèlement à la différentiation des kératinocytes, et est hydrolysé en cholestérol par la stéroïde sulfatase (14).

II. NOTION DE BARRIERE CUTANEE

La peau est une barrière qui sépare l'organisme du milieu extérieur. Sans elle, la vie serait impossible en atmosphère sèche et son intégrité est essentielle au maintien de l'homéostasie du milieu interne. Cette barrière se compose d'un assemblage hautement ordonné d'éléments aux propriétés physico-chimiques particulières qui ont leur importance dans la réalisation des multiples fonctions de la peau.

La fonction barrière est souvent vue comme un obstacle à la pénétration de substances à l'intérieur d'un individu alors qu'elle joue également un rôle majeur visant à limiter la diffusion de l'eau hors de l'organisme.

Etant donné la finesse de la barrière cutanée (quelques micromètres d'épaisseur), même une lésion d'apparence peu profonde va altérer cette barrière et entrainer une perte d'eau au travers de cet épiderme lésé.

1. PRINCIPALES FONCTIONS DE LA BARRIERE CUTANEE

Parmi les nombreux rôles de la barrière cutanée, nous allons nous intéresser plus particulièrement à deux de ses fonctions qui ont toute leur importance pour la survie dans le milieu extérieur. Ce sont la régulation des mouvements d'eau et d'électrolytes par la barrière imperméable et la protection contre les pathogènes invasifs par la barrière antimicrobienne. Nous verrons une troisième fonction qui fait, aussi, l'objet de recherches du fait de son implication dans les dermatoses associées à des phénomènes d'hypersensibilité comme la dermatite atopique. Il s'agit de la fonction barrière contre les allergènes.

a. La barrière imperméable

Elle se situe essentiellement au niveau du *stratum corneum*. La restriction des mouvements d'eau et d'électrolytes à travers la peau tient en grande partie à la présence d'une matrice lipidique extracellulaire aux propriétés hydrophobes. Lors d'altérations importantes, une déshydratation marquée et une modification de l'équilibre électrolytique apparaissent. Cette barrière limite également la pénétration de substances potentiellement dangereuses provenant du milieu extérieur (15).

b. La barrière antimicrobienne

Elle repose sur différents moyens de défense contre les pathogènes. La structure normale, intacte, du *stratum corneum* est déjà une barrière physique. Elle est représentée par le *stratum corneum* mais aussi par les couches nucléées, notamment grâce aux jonctions entre les cellules et par le biais du cytosquelette associé. A ceci s'ajoute une barrière biochimique constituée par les lipides (acides gras libres, monoglycérides…), les enzymes hydrolytiques, les peptides antimicrobiens et un pH bas

qui réduisent la prolifération des pathogènes. Intervient également une barrière immunologique composée des éléments humoraux et cellulaires du système immunitaire (56). De plus, la constante desquamation limite l'ancrage des pathogènes en surface (37).

c. La barrière contre les allergènes environnementaux

De nombreuses observations révèlent qu'une couche cornée défectueuse sera plus susceptible de conduire au développement d'hypersensibilités.

Ainsi, chez l'homme souffrant de dermatite atopique et sur les modèles murins recréant des phénomènes allergiques impliquant les immunoglobulines E, de nombreuses données plaident en faveur du rôle prépondérant, joué par le *stratum corneum,* en tant que barrière contre les allergènes environnementaux.

Des chercheurs ont voulu déterminer si le rôle de la couche cornée était similaire chez le chien atopique. Il s'est effectivement avéré que les chiens atopiques, sur lesquels avait été créée une rupture de la barrière par retrait mécanique du *stratum corneum,* présentaient une sensibilité accrue aux allergènes exogènes (48).

2. *ELEMENTS CONSTITUTIFS DE LA BARRIERE*

a. Le stratum corneum

Le *stratum corneum* est le principal obstacle à la perte insensible en eau (5). Il représente évidement une barrière physique mais pas seulement.

Comme nous l'avons vu dans la partie sur la couche cornée, les cornéocytes « baignent » dans une matrice extracellulaire riche en lipides non polaires organisés en couches lamellaires (56).

La cohésion et l'intégrité du *stratum corneum* sont essentielles pour assurer les multiples fonctions de la barrière cutanée. C'est donc, en réalité, le *stratum compactum* qui assure la fonction de barrière cutanée au sein de la couche cornée puisque c'est la partie où les cellules sont encore jointives (15).

Le film hydrolipidique superficiel formé par le mélange du produit de sécrétion des glandes sébacées, des glandes sudoripares, des lipides de la matrice intercellulaire et des débris cellulaires fait office également de barrière physique et chimique. Grâce à certains acides gras libres, il possède un pouvoir antibactérien et antifongique. De plus, il abrite et nourrit la flore commensale (59).

i. Les cornéocytes

Ce sont des cellules mortes, aplaties, anucléées et dont les organites ont disparu. Elles sont hautement kératinisées. Leur agencement au sein du *stratum corneum* consiste en un empilement ordonné de multiples couches de cornéocytes. Ces cellules sont très fines : moins d'un micromètre d'épaisseur pour une surface d'environ 900 μm^2 (37). Leur différentiation très poussée aboutit à la formation d'une enveloppe cornée qui double la membrane plasmique (35).

L'enveloppe cornée

Elle est constituée d'une enveloppe protéique et d'une enveloppe lipidique. Elle représente 7% de la masse sèche du *stratum corneum*. Cette enveloppe est insoluble et très résistante aux enzymes protéolytiques les plus communes. Ceci tient à la présence de liaisons isopeptidiques de type Nε-(γ-glutamyl)-lysine catalysées par les transglutaminases dont l'activité est dépendante du calcium (25).

➢ *L'enveloppe protéique*

L'enveloppe protéique a une épaisseur de 10 nm (25). Elle est composée de différentes protéines structurales appartenant au complexe de différentiation épidermique dont font partie l'involucrine, la loricrine et de petites protéines riches en proline (35).

L'involucrine est la première protéine structurale à avoir été identifiée comme composant de l'enveloppe cornée. Elle est très riche en résidus chargés, se lie à la plupart des autres protéines et, est un substrat essentiel pour la liaison des céramides qui forment l'enveloppe lipidique. L'involucrine est exprimée dans les couches supra basales.

La loricrine, quant à elle, est extrêmement riche en résidus glycine.

L'envoplakine et la périplakine sont deux protéines qui ont un rôle important dans l'élaboration de l'enveloppe cornée mais qui ne font pas partie du complexe de différentiation épidermique. Elles appartiennent à la famille des plakines. Ces protéines s'associent aux filaments intermédiaires, aux microtubules et au cytosquelette d'actine. L'envoplakine est exprimée par les cellules épithéliales en fin de différentiation alors que la périplakine est plus largement exprimée. Ces deux protéines sont recrutées à la périphérie des cellules pendant les stades précoces de l'assemblage de l'enveloppe cornée (25).

Toutes ces protéines sont agencées sous forme d'un réseau très ordonné tapissant la face interne de la cellule grâce à la création de liaisons covalentes par des transglutaminases, essentiellement. La surface interne de cette enveloppe est reliée à l'ensemble des filaments de kératine qui remplissent le cytoplasme des cornéocytes (35).

➢ *L'enveloppe lipidique*

Elle est formée d'une couche de ω-hydroxycéramides, à très longue chaine, liés de manière covalente à la surface externe de l'enveloppe protéique (35). L'involucrine, l'envoplakine et la périplakine sont particulièrement impliqués dans cette liaison par le biais de résidus glutamine qui subissent une trans-estérification avec les esters linoléiques des céramides. L'enveloppe lipidique, ainsi formée, fait 5 nm d'épaisseur et recouvre la totalité de la surface externe de chaque cornéocyte. Les céramides, ainsi liés, interviendraient dans la coordination de la formation extrêmement ordonnée des lamelles lipidiques intercellulaires (25).

- ***Assemblage de l'enveloppe cornée***

C'est un processus très régulé qui est déclenché par une augmentation de la concentration intracellulaire en ions calcium suite aux signaux initiant la différentiation terminale dans les épithéliums stratifiés squameux. On peut distinguer trois étapes (figure 2).

Le stade terminal de différentiation des kératinocytes s'accompagne de l'expression d'envoplakine et de périplakine qui s'associent avec les filaments intermédiaires de kératines et les desmosomes. Tandis que la concentration en ions calcium augmente, l'envoplakine et la périplakine forment des hétérotétramères qui s'associent à la membrane plasmique. Ce processus d'auto-assemblage peut être facilité par la présence des annexines et d'autres protéines de liaison calcium-dépendante sur les membranes.

L'expression de la transglutaminase 1 et de l'involucrine commence peu de temps après et elles s'associent, également, spontanément avec la membrane. La concentration en calcium continuant d'augmenter, des liaisons peptidiques au sein des chaines d'involucrine se forment, ainsi que des liaisons interpeptidiques entre l'envoplakine et l'involucrine.

A ceci s'ajoute la réticulation d'autres protéines. Enfin, une couche constituée principalement d'involucrine et d'envoplakine commence à recouvrir la totalité de la surface interne de la membrane plasmique, formant ainsi une sorte d'échafaudage.

La deuxième étape, qui peut être synchrone à la première, consiste en la fusion des corps lamellaires avec la membrane plasmique. Ceci va permettre l'incorporation, dans cette dernière, des céramides qui composaient la membrane délimitant les corps lamellaires. De cette façon, les phospholipides de la membrane plasmique sont remplacés par des ω-hydroxycéramides.

La troisième étape consiste au renforcement de l'enveloppe cornée en cours d'élaboration. La loricrine et les petites protéines riches en proline vont s'accumuler jusqu'à atteindre près de 80% du poids total de l'enveloppe cornée. Elles entrent dans la formation de l' « échafaudage » tout comme les complexes kératines-filaggrines.

L'enveloppe cornée associée aux lamelles lipidiques intercellulaires d'un coté et aux filaments intermédiaires de kératines de l'autre, participe aux fonctions de barrières physique et hydrique de la couche cornée (25).

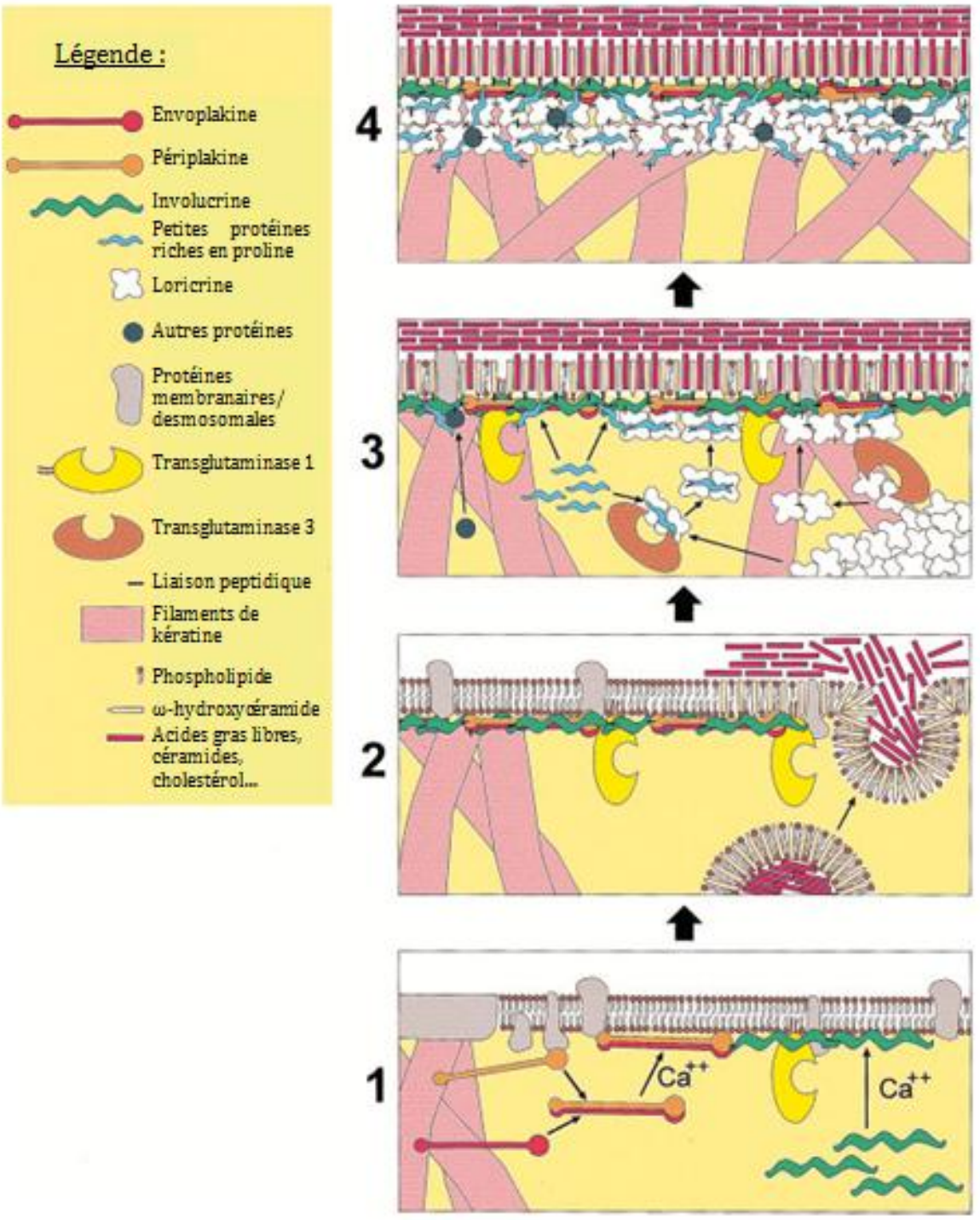

Figure 2 : Assemblage de l'enveloppe cornée, d'après (25).

ii. Les lipides

Bien que la quantité de lipides extracellulaires ne représente que 14% de la masse sèche de l'épiderme (25), leur rôle dans la barrière imperméable est essentiel et nécessaire à la vie terrestre.

En plus de leur implication dans l'élaboration et le maintien de la barrière imperméable, ils interviennent dans le mécanisme de défense contre les pathogènes du

fait de leurs propriétés hydrophobes et l'activité antimicrobienne de certains d'entre eux (15).

Ils ont, également, leur importance dans la cohésion et la desquamation des cornéocytes, ainsi que dans le contrôle de la prolifération épidermique et la différenciation (59).

Composition lipidique du *stratum corneum*

Les lipides qui constituent le *stratum corneum* sont différents de ceux produits dans l'épiderme. En effet, ce sont des lipides non-polaires qui forment la matrice lipidique alors que les kératinocytes synthétisent des lipides polaires (37). Nous verrons plus loin où et comment ces lipides sont transformés.

Chez l'homme, la matrice lipidique extracellulaire est composée de 45 à 50% de céramides par rapport à la masse lipidique totale du *stratum corneum*, de 25% de cholestérol, de 10 à 15% d'acides gras libres et moins de 5% d'autres lipides dont le sulfate de cholestérol (35). Un déficit de l'un de ces trois principaux types de lipides va conduire à des anomalies de la barrière caractérisées par une augmentation de la perte insensible en eau. Cela pouvant entrainer une hyperplasie de l'épiderme ainsi qu'une peau sèche et squameuse (41).

Il existe au moins neuf types de céramides épidermiques libres (figure 3) et trois types de céramides liés à l'enveloppe cornée protéique de manière covalente (56). Ils confèrent à la matrice lipidique une certaine fluidité qui a toute son importance dans les propriétés mécaniques du *stratum corneum* en permettant sa flexion et son étirement (59).

Dans une étude récente, Popa et ses collaborateurs se sont penchés sur la composition en céramides du *stratum corneum* chez le chien. Il s'est avéré que cette dernière est proche de celle observée chez l'homme. Des variations sont, tout de même, notées selon les individus.

Les céramides libres retrouvés chez le chien et leurs pourcentages respectifs sont les suivants : Cer EOS (1 à 13%), Cer NS (20 à 47%), Cer EOP (3 à 6%), Cer NP (10 à 28%), Cer AS (28 à 46%), Cer NH (1%), Cer AP (2 à 10%) et Cer AH (2 à 7%). Quant aux céramides liés aux protéines, les pourcentages sont les suivants : Cer OS (59 à 96%), Cer OP (4 à 33%) et Cer OH (8 à 12 %) (54).

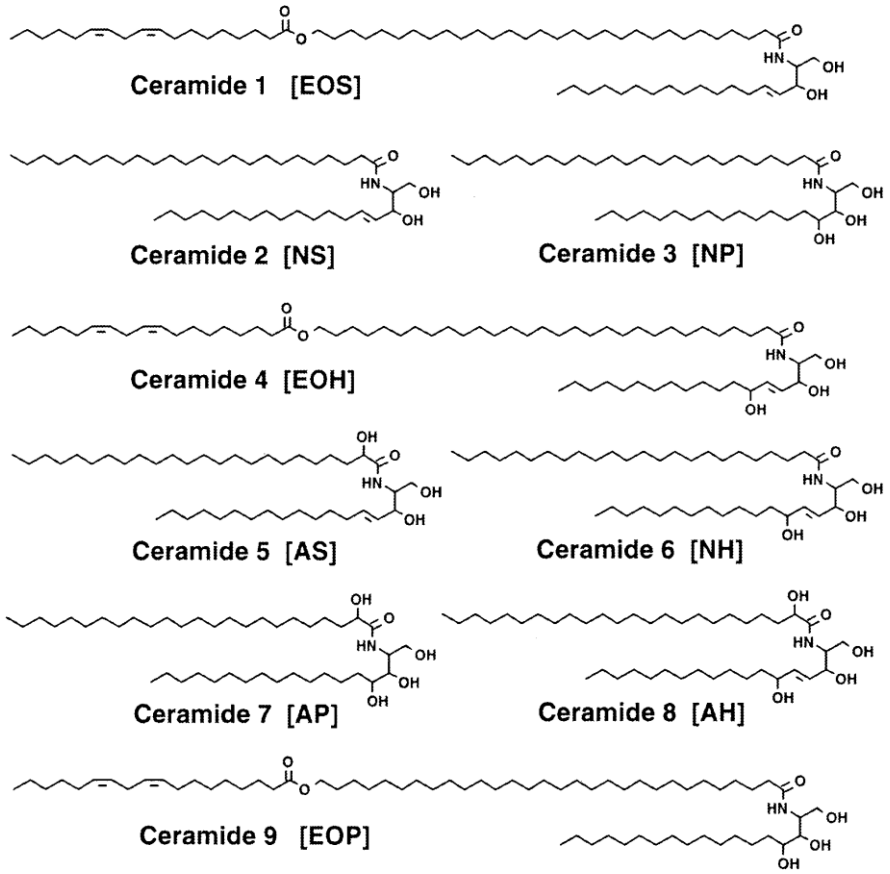

Figure 3 : Structure des céramides libres mis en évidence dans le *stratum corneum* de l'homme (ancienne et [nouvelle nomenclature]), d'après (35).

Origine des lipides

Les lipides des corps lamellaires qui formeront la matrice lipidique baignant les cornéocytes sont soit synthétisés localement, soit apportés à partir de sources extra cutanées.

L'épiderme est un site très actif de synthèse du cholestérol à partir d'acétate et des acides gras saturés et mono-insaturés. C'est, aussi, le lieu de production des céramides et des sphingolipides (15).

Les lipides peuvent aussi avoir une origine extra-cutanée, et parmi eux, certains ont une origine extra-cutanée exclusive. Les acides gras essentiels, par exemple, ne peuvent pas être synthétisés par les mammifères et sont donc obligatoirement d'origine alimentaire puis transportés par le sang jusqu'à la peau. Ces acides gras essentiels, et plus particulièrement l'acide linoléique, sont indispensables à la fonction barrière.

Des études ont montré la contribution significative des lipides ayant une origine extra-cutanée dans le maintien de l'homéostasie de la barrière imperméable. En effet, ces lipides viennent compléter le pool lipidique de l'épiderme et peuvent être une alternative lors de déficit en lipides provenant de l'épiderme. Plus spécifiquement, il s'avère que, chez le chien, la composition des acides gras dans le sérum et dans les tissus cutanés peut être modifiée par une supplémentation alimentaire. Ainsi, lors de

désordres cutanés, comme lors de dermatite atopique, une supplémentation alimentaire adaptée et bien équilibrée en acides gras est entièrement justifiée (14, 27).

Le cholestérol peut aussi provenir de la circulation mais en moindre quantité (56). Par contre, le mécanisme exact de transport des lipides jusqu'à l'épiderme est encore inconnu (15).

Formation de la matrice lipidique extracellulaire

En 1986, Landmann présenta un modèle pour expliquer la formation de la matrice lipidique comblant les espaces intercellulaires du *stratum corneum*.

Ce processus peut se décomposer en quatre étapes :

- élaboration des corps lamellaires qui dérivent du réseau trans-golgien des kératinocytes granuleux par le phénomène de bourgeonnement
- migration de ces corps d'Odland dans le cytosol pour atteindre la périphérie cellulaire, en partie haute du *stratum granulosum*
- fusion des corps lamellaires entre eux et avec la membrane plasmique apicale des cellules du *stratum granulosum* puis libération de leur contenu au niveau de l'interface entre les couches granuleuse et cornée
- fusion des disques lipidiques issus des corps lamellaires pour former la matrice lipidique multilamellaire (44).

- ***Importance des corps lamellaires***

Description

Les corps lamellaires vont jouer un rôle primordial dans l'élaboration de la matrice lipidique. Ce sont de petits organites sécrétoires, ovoïdes (0,2 x 0,3 µm), délimités par une membrane consistant en une bicouche lipidique. Ils sont présents, uniquement chez les mammifères, dans la couche granuleuse de l'épiderme ainsi que dans quelques autres épithéliums kératinisés et sont visibles en microscopie électronique.

Leur structure, très particulière, consiste en un empilement de lamelles, ou disques lipidiques, composés de phospholipides, de glucosylcéramides, de sphingomyéline et de sulfate de cholestérol qui sont les précurseurs des lipides intercellulaires du *stratum corneum*. De nombreuses enzymes telles que des hydrolases dont la β-glucocérébrosidase, la sphingomyélinase acide et la phospholipase A_2 sécrétoire, des lipases et des protéases, telles que les enzymes trypsique et chymotrypsique du *stratum corneum* et la cathépsine sont également présentes, ainsi que leurs inhibiteurs. Les protéases interviendraient dans la régulation de la destruction des desmosomes et, donc, dans la desquamation (14, 15, 35, 56).

Synthèse et sécrétion

Les corps lamellaires sont élaborés dans les kératinocytes en cours de différentiation. Ils sont présents en grand nombre dans la couche granuleuse où ils sont stockés.

Le mécanisme exact de formation des corps lamellaires n'est pas bien connu. Cependant, la mise en place des hydrolases et des protéases nécessite l'incorporation, préalable ou synchrone, des lipides dans les corps lamellaires. De plus, les lipides clés

doivent être présents en quantités appropriées et un excès ou un déficit en un lipide particulier peut perturber l'élaboration des corps lamellaires.

Ils dérivent de l'appareil de Golgi et, plus particulièrement, du réseau trans-golgien, d'où ils sont libérés par bourgeonnement. Leur migration à l'apex des kératinocytes les plus superficiels de la couche granuleuse puis leur fusion avec la membrane plasmique est sous la dépendance de signaux cellulaires.

C'est donc, grâce au phénomène d'exocytose, que les corps lamellaires vont déverser leur contenu hors des kératinocytes, au niveau de l'interface entre la couche granuleuse et la couche cornée (figure 4). Au cours de ce processus, la membrane de la cellule va, peu à peu, être remplacée par leur membrane riche en ω-hydroxycéramides à l'origine de l'enveloppe lipidique cornéocytaire.

En outre, une partie de ce contenu va se lier à l'enveloppe protéique située en face interne des kératinocytes. Les disques lipidiques, ainsi libérés, vont participer à la formation de la matrice lipidique extracellulaire.

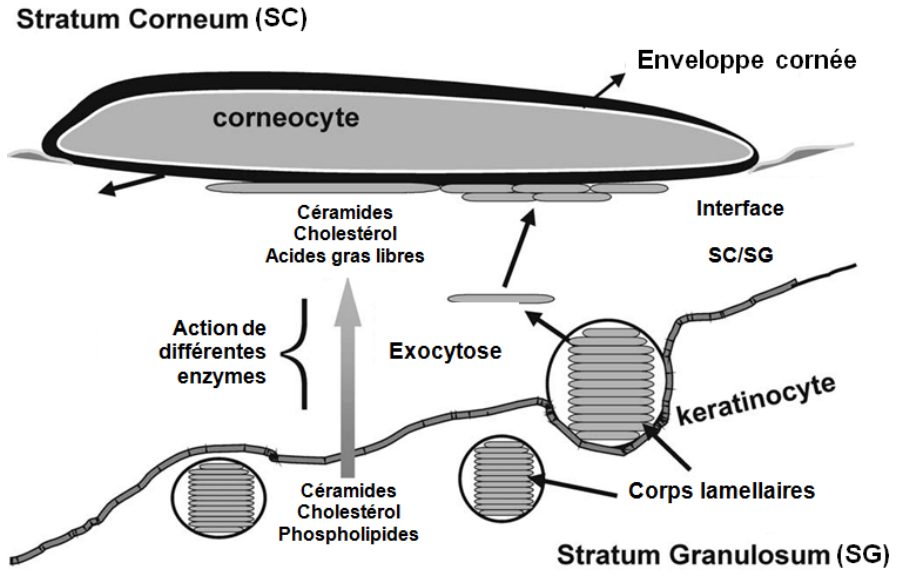

Figure 4 : Formation de la barrière cutanée, d'après (6).

La synthèse et la sécrétion de ces corps lamellaires sont stimulées quand la perméabilité de la barrière est altérée (14, 15, 35, 56).

➢ *Modifications enzymatiques extracellulaires et réorganisation structurale*

Suite à la fusion des corps lamellaires avec la membrane plasmique des kératinocytes, les lipides précurseurs, ainsi déversés, sont métabolisés par les enzymes provenant, elles aussi, des corps lamellaires. Les glucosylcéramides sont convertis en céramides par la β-glucocérébrosidase, la sphingomyélinase acide transforme la sphingomyéline en céramides et les phospholipides vont donner des acides gras libres et du glycérol après l'action des phospholipases (figure 5).

Il existe un pH optimum pour l'activité de ces enzymes, il est d'environ 5,5. Le pH normal de la surface cutanée, chez l'homme et les animaux, se situe aux alentours de 5 à 5,5, quoique certaines études rapportent un pH normal compris entre 5,5 et 7,5 chez le

chien. Les acides gras contribuent à l'acidification du *stratum corneum*. Le maintien d'un pH acide, contribuant au bon fonctionnement de la barrière, prend donc toute son importance. L'inhibition de la phospholipase A_2 empêche la conversion des phospholipides en acides gras libres. Cela conduit à une modification de l'activité des différentes enzymes, de la structure de la matrice lipidique et donc de l'homéostasie de la barrière imperméable (2, 14).

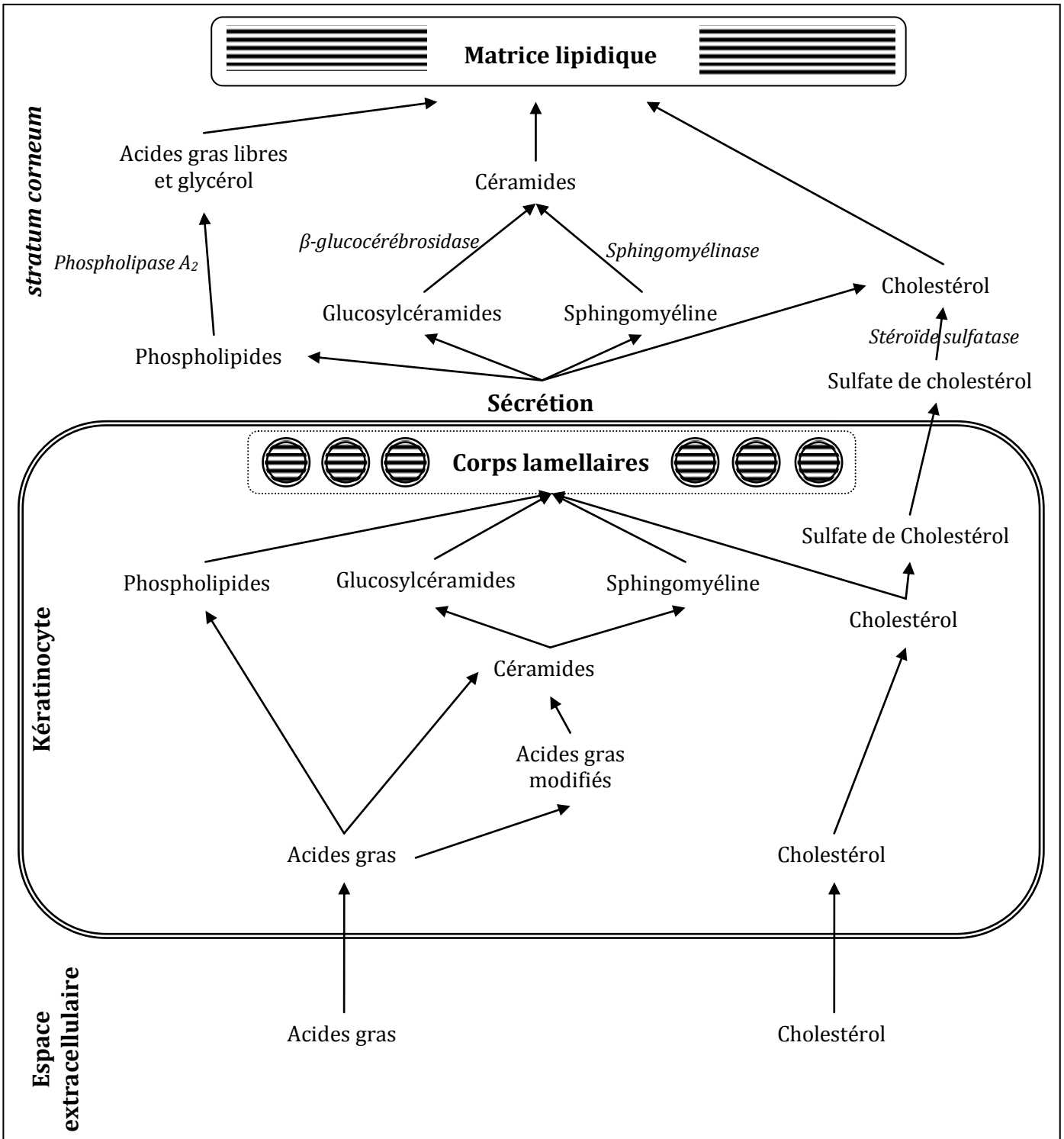

Figure 5 : Processus de formation de la matrice lipidique lamellaire, d'après (15).

Parallèlement aux modifications des lipides, il va se produire une réorganisation structurale en feuillets lamellaires parallèles à la surface des cellules, probablement par un mécanisme de fusion, grâce à l'intervention du calcium. La structure de la matrice lipidique a pu être observée grâce à la microscopie électronique et à la fixation de tétroxyde de ruthénium. L'arrangement des lipides de la matrice extracellulaire consisterait en un empilement de feuillets lipidiques les uns sur les autres.

Les acides gras libres ne sont pas ramifiés et ne présentent pas de doubles liaisons ce qui permet un agencement hautement ordonné, moins fluide et moins perméable que les membranes en bicouche phospholipidique. Le cholestérol va, tout de même, apporter une certaine flexibilité à cette structure (35).

Les corps lamellaires sont particulièrement riches en acylglucosylcéramides, lipides qui ne se retrouvent qu'au niveau des épithéliums kératinisés. Ces lipides particuliers auraient un rôle de rivet permettant la superposition et l'aplanissement des lamelles lipidiques au sein des corps lamellaires. Une fois le contenu de ces derniers libéré, les acylglucosylcéramides sont transformés en acylcéramides qui auraient ce même rôle de rivet pour les lamelles du *stratum corneum*. En cas de déficit en acides gras essentiels, l'acide linoléique est remplacé par l'acide oléique dans les acylglucosylcéramides et les acylcéramides. Cette substitution entraine une altération des propriétés biophysiques des lamelles du *stratum corneum* et une augmentation de la perméabilité à l'eau. Les acylglucosylcéramides sont également les précurseurs des ω-hydroxycéramides qui constituent l'enveloppe lipidique cornéocytaire (35). Les acides gras essentiels sont donc nécessaires au maintien de la structure et de la fonction de barrière imperméable du *stratum corneum* (14).

- ***Modèle alternatif de formation de la barrière cutanée : le « Membrane folding model » (modèle de la membrane pliante)***

Ces dernières années, grâce à l'utilisation de la cryo-microscopie électronique haute résolution, sur des coupes congelées de peau humaine, pour visualiser la formation et la structure de la matrice lipidique extracellulaire de la couche cornée, le mécanisme présenté par Landmann a été remis en cause.

Se basant sur ces nouvelles données, Norlén proposa un autre modèle reposant sur un processus permanent et extrêmement dynamique dans lequel la topologie des membranes reste constante. Autrement dit, les membranes subiraient des déformations spatiales par des transformations continues, c'est-à-dire sans rupture ni fusion membranaire. Ainsi, le réseau trans-golgien, les corps lamellaires et la matrice lipidique multilamellaire des espaces intercellulaires feraient parties d'une seule et même structure membranaire lipidique tridimensionnelle continue et cohérente.

La formation de la barrière cutanée serait, donc, le résultat du déploiement d'une phase lipidique présentant une structure de type cubique, avec une organisation en réseau, vers une structure lamellaire. Cette étape serait suivie d'un mécanisme de cristallisation et d'une réorganisation de la matrice lipidique extracellulaire sous une forme lamellaire.

Les principaux avantages et arguments en faveur de ce modèle, comparé à celui de Landmann, sont :
- un coût énergétique moindre puisqu'il n'y a ni fusion, ni bourgeonnement,

- une conservation de la continuité membranaire (important dans la fonction de barrière),
- une régulation plus fine,
- un processus plus rapide,
- l'identification d'une dynamique des membranes similaire à celle d'autres systèmes biologiques,
- l'existence de preuves expérimentales quant à la présence, au niveau de l'apex des kératinocytes granuleux les plus superficiels, d'un système membranaire extensif constitué de citernes tubulo-réticulaires,
- la possible explication de la grande hétérogénéité de forme, de taille, de nombre et d'apparence des corps d'Odland en microscopie électronique à transmission (44).

Toutefois, certains arguments sont en défaveur de ce modèle :
- à l'instar d'autres organites, comme les mitochondries, des corps lamellaires ont été isolés de préparations d'épidermes,
- lors de la maladie de Gaucher, qui se caractérise par l'absence d'une seule enzyme (la β-glucocérébrosidase), le processus de sécrétion des lipides est incomplet et entraine une structure lamellaire anormale qui, elle-même, conduit a une perte insensible en eau anormalement élevée,
- l'application topique d'inhibiteurs d'enzymes clés, dans le processus de formation, entraine des altérations similaires dans l'organisation des lipides,
- les techniques de microscopie électronique, qui ont été utilisées pour visualiser les corps lamellaires, sont les mêmes que celles qui ont permis de mettre en évidence les structures lipidiques cubiques d'autres systèmes biologiques. Il est, donc, peu probable que le même protocole, ayant servi pour la préparation des tissus, soit à l'origine d'artéfacts dans l'épiderme mais pas dans les autres types cellulaires (41).

iii. Les cornéodesmosomes

Ce sont des desmosomes spécifiques du *stratum corneum*. Ils ont un rôle essentiel dans la cohésion et l'intégrité de la couche cornée et, donc, dans la fonction barrière ainsi que dans la desquamation.

Les desmosomes sont modifiés par ajout de cornéodesmosine. Cette dernière est présente dans les corps lamellaires. Une fois libérée, lors de la fusion des corps lamellaires avec la membrane plasmique, elle s'insinue entre les différents composants extracellulaires des desmosomes. Les cornéodesmosomes subissent ensuite une dégradation protéolytique progressive lors du processus de desquamation permettant ainsi l'exfoliation des cornéocytes en surface.

L'activité des protéases doit être contrôlée très finement et, ceci est possible grâce à des régulateurs physiologiques. Il est aisé de comprendre que toute mutation de gènes codant les protéases, les anti-protéases ou la cornéodesmosine, va être à l'origine de troubles cutanés plus ou moins graves (41, 56).

iv. L'organisation du stratum corneum et ses différents modèles

De nombreuses études biophysiques portant sur la structure de la couche cornée ont été réalisées et sont à l'origine de différentes propositions de modèles pour expliquer la structure particulière du *stratum corneum*.

Le premier modèle de la barrière cutanée des mammifères, le modèle « brick and mortar » (brique et mortier), a été exposé par Michaels et son équipe en 1975 (45). La barrière cutanée était assimilée à un système inerte, séparé en deux parties, avec un compartiment protéique discontinu (les kératinocytes granuleux et les cornéocytes qui sont vus comme des «briques»), inclus dans une matrice lipidique homogène et continue (le «mortier» composé des lamelles lipidiques qui remplissent tous les espaces entre les cornéocytes). Ce modèle décrit bien l'aspect structurel mais ne prend pas du tout en considération l'activité et la réactivité de la barrière.

C'est, ainsi, que d'autres modèles ont été élaborés pour coller au mieux aux observations faites, tenir compte de cet aspect dynamique de la barrière et tenter de comprendre l'organisation des lipides composants la matrice lipidique.

Forslind présenta son modèle «domain mosaïc» (domaines en mosaïque) en 1994. Il repose sur la coexistence d'une phase cristalline et d'une phase gel. En 2000, Bouwstra *et al.* proposèrent le «sandwich model» (modèle sandwich) qui se base sur l'existence d'une alternance de couches de phases fluides et de phases cristallines. Un an plus tard, Norlén exposa le modèle «single gel phase» (phase gel unique) qui suppose une phase gel lamellaire unique et cohérente (35, 45).

D'autres propositions ont été faites et les recherches continuent dans ce domaine. Malgré les incertitudes scientifiques demeurant sur sa structure exacte, il s'avère que les particularités de la matrice lipidique extracellulaire contribuent grandement à la fonction barrière de la peau (35, 41, 45).

b. Les couches nucléées

L'épiderme nucléé possède, également, un rôle dans la barrière physique de l'épiderme en empêchant, à la fois, une perte d'eau excessive et la pénétration de substances délétères. En effet, la perte insensible en eau augmente lorsque le *stratum corneum* est retiré mais, ceci est encore plus marqué lorsque l'épiderme entier est enlevé. La fonction barrière est alors sévèrement perturbée. De plus, des maladies ou atteintes entrainant une perte de l'épiderme peuvent entrainer la mort de l'individu, par sepsis ou perte d'eau excessive, si elles concernent une grande surface corporelle.

En fait, le rôle essentiel de la partie vivante de l'épiderme est d'assurer la formation d'une couche cornée fonctionnelle. Albert M. Klingman l'a très bien résumé par la phrase suivante : « The raison d'être of the viable epidermis is to make a horny layer ; its specific biologic mission » (28).

En outre, de nombreuses structures d'adhésion y sont présentes et permettent la cohésion indispensable au rôle de barrière cutanée.

Les jonctions serrées y ont un rôle majeur. La synthèse des protéines qui les composent précède la formation du *stratum corneum* lors de la régénération de

l'épiderme. De plus, ces protéines et, notamment, les claudines, semblent importantes dans la fonction barrière.

Les jonctions adhérentes et les desmosomes sont essentiels à la réalisation de la fonction barrière.

Les jonctions Gap, quant à elles, sont impliquées dans la communication entre les cellules (56).

3. HOMEOSTASIE ET REPARATION DE LA BARRIERE CUTANEE

L'homéostasie de l'épiderme nécessite une régulation fine entre la multiplication et la différentiation des kératinocytes.

Une altération de la barrière cutanée, quelle qu'elle soit (par une action mécanique, chimique…), va entrainer une réponse visant à rétablir l'homéostasie dans les plus brefs délais.

Des études, menées chez l'homme, ont montré que la rupture de la barrière imperméable engendrait, au moins, deux types de réponses dans l'épiderme.

La première résulterait d'altérations affectant directement l'homéostasie de la barrière. La perte d'eau y jouerait un rôle important puisque cette réponse peut être inhibée par la mise en place d'une membrane imperméable sur la peau altérée. C'est le cas de la signalisation par le biais de la concentration en calcium.

La seconde ne serait pas liée directement à la perte d'eau puisque l'occlusion expérimentale du site lésé n'empêche pas sa réalisation. Elle nécessiterait l'intervention de différents facteurs dont la production de cytokines.

a. Les différentes étapes de la réparation de la barrière

Avant toute chose, il convient de remarquer que la majorité des données qui vont être présentées proviennent d'études réalisées chez la souris. Peu de recherches ont été menées chez l'homme car elles nécessitent la réalisation répétée de biopsies. En outre, il n'existe aucune donnée concernant l'espèce canine.

De plus, pour l'étude de la restauration de la barrière cutanée, les temps et les durées, cités ci-dessous, sont issus de diverses études expérimentales n'utilisant pas les mêmes modèles de rupture et ne présentant pas le même degré d'altération de la barrière. Or, la rapidité des processus mis en jeu dépend de la sévérité de la rupture créée. En effet, plus l'altération est importante et plus la récupération prend du temps (50).

La première étape de la réponse est la libération, en quelques minutes, du contenu des corps lamellaires. Lors d'altération sévère, 70 à 90% des corps lamellaires stockés dans les cellules du *stratum granulosum* vont être sécrétés. Leur rôle est essentiel dans le maintien de l'homéostasie de la barrière.

Cette étape s'accompagne, en parallèle, d'une élévation rapide et marquée de la synthèse des stérols et des acides gras, ainsi que des sphingolipides. Cette dernière étant retardée de six heures par rapport à la rupture. Des études sur la souris ont démontré,

qu'en cas de déficience de la synthèse de ces lipides, un retard de réparation de la barrière et la formation de corps lamellaires anormaux sont observés.

De plus, le niveau d'expression des ARNm et l'activité de certaines enzymes, engagées dans les différents processus liés à l'élaboration et la réparation de la barrière, vont être augmentés. Par exemple, l'activité de la β-glucocérébrosidase et de la sphingomyélinase acide, deux enzymes clé dans la formation des membranes lamellaires, est plus importante lors de perturbation de la barrière de l'épiderme. A contrario, bien que les glucosylcéramides soient essentiels à l'homéostasie de cette barrière, l'activité basale de la glucosylcéramide synthase semble suffisante pour faire face aux modifications subies.

A ceci, s'ajoute une stimulation de la prolifération et de la différenciation des cellules de l'épiderme. La synthèse protéique et la synthèse d'ADN sont également majorées. Cependant, cette dernière est différée de quelques heures par rapport à la rupture. Il a été démontré que des ruptures expérimentales de la barrière cutanée, sur des souris, modifiaient l'expression de différentes kératines.

Chez l'homme, après un traitement de la peau avec de l'acétone, la répartition de l'expression de l'involucrine se modifie, 24 heures après la rupture, et s'étend à l'ensemble des couches épineuse et granuleuse.

D'autres modifications métaboliques peuvent être notées mais leur rôle dans la barrière imperméable est secondaire.

Des corps lamellaires, nouvellement formés, commencent à apparaître dans les cellules du *stratum granulosum.* Cette sécrétion accélérée se poursuit jusqu'au rétablissement complet de la matrice lipidique du *stratum corneum* et de la fonction barrière. Ainsi, la régénération de cette dernière conduit à une normalisation, en 5 à 8 heures, de la synthèse des lipides de l'épiderme. En outre, l'arrangement particulier du système de sécrétion des corps lamellaires au sein des cellules granuleuses expliquerait cette capacité de sécrétion rapide pour maintenir l'homéostasie et rétablir la barrière imperméable.

En pratique, il a été montré que, chez la souris, la sécrétion des corps lamellaires est stimulée très rapidement (en 15 à 30 minutes) suite à une rupture de la barrière épidermique. De nouveaux corps lamellaires sont formés en deux à six heures, puis, sont expulsés à leur tour. Parallèlement, le processus de formation de la matrice lipidique va conduire au remplissage des espaces intercellulaires en allant du *stratum corneum* profond vers l'extérieur (11, 14, 15, 21, 35, 36, 40, 55, 56, 60).

b. Les signaux régulateurs

Ces phénomènes sont sous la dépendance de signaux (figure 6). Le calcium joue un rôle important dans l'établissement de la réponse homéostasique.

En effet, il existe un gradient de concentration en calcium dans l'épiderme : cette concentration est faible dans le *stratum corneum* et elle devient très élevée juste au dessus de la couche granuleuse. Une rupture de la barrière imperméable induit une accélération de la perte d'eau qui entraine les ions calcium et, par conséquent, réduit la concentration en calcium. Cette modification est à l'origine de l'exocytose du contenu des corps lamellaires à l'interface entre le *stratum corneum* et le *stratum granulosum*.

Le calcium a, également, un rôle dans la régulation de la synthèse protéique ainsi que dans la différentiation épidermique et l'adhésion des cellules entre elles.

Le potassium et d'autres ions interviennent dans le mécanisme de signalisation impliqué dans la restauration de la barrière cutanée.

Des signaux non ioniques, intracellulaires et extracellulaires, entrent également en jeu. L'expression des cytokines, comme les interleukines IL-1α et β ainsi que le TNFα (Tumor Necrosis Factor), est majorée lors de rupture de la barrière cutanée. Ceci a été prouvé expérimentalement, notamment chez des souris. Ceci est vrai quelque soit le modèle de rupture utilisé, aigu ou chronique (68). Par exemple, des souris déficientes pour ces cytokines voient leur barrière se restaurer plus lentement (56).

Ces signaux ne semblent pas agir directement sur la sécrétion des corps lamellaires mais, plutôt, sur la synthèse lipidique et la multiplication des cellules épidermiques.

D'autres messagers ont été mis en évidence. Certains, comme l'AMPc (3',5'-adénosine monophosphate cyclique), inhibent le processus de restauration de la barrière cutanée. Ainsi, les antagonistes de l'AMPc accélèrent cette réparation.

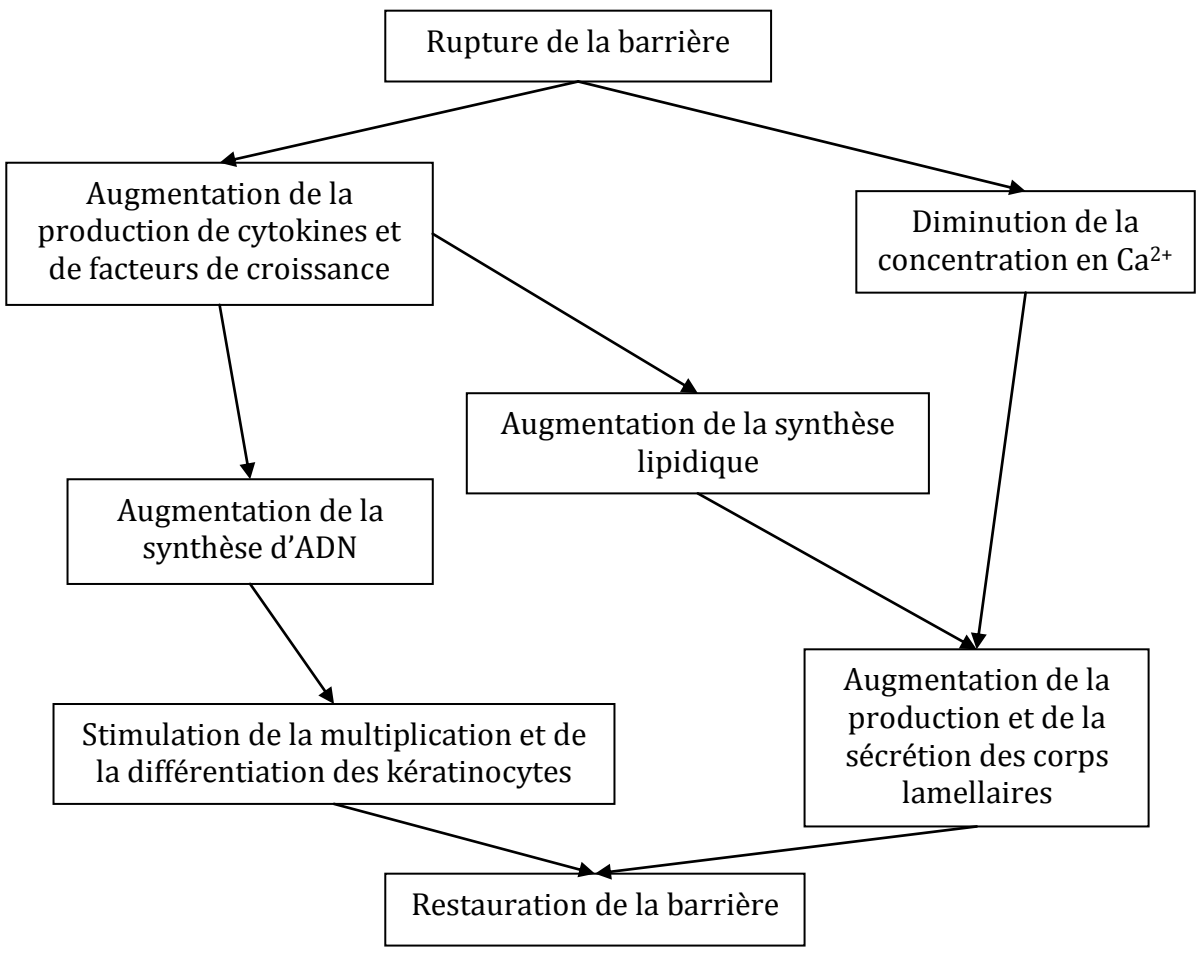

Figure 6 : De la rupture à la restauration de la barrière cutanée.

Nous pouvons donc conclure que la peau est capable de se « rendre compte » que sa barrière est altérée mais qu'elle ne « distingue » pas le type de barrière atteint (barrière imperméable, immunologique…). La réponse entraine, donc, la réparation de

toutes les barrières dans leur globalité : stimulation de la synthèse lipidique, de la pigmentation, du système immunitaire, des peptides antimicrobiens… (10, 35, 41, 43, 49, 56, 68).

c. Les facteurs influençant la restauration de l'épiderme

L'espèce et l'âge d'un individu sont deux paramètres intervenant dans le rétablissement de la barrière.

Selon les espèces, des variations peuvent être observées. Par exemple, pour une rupture similaire, le temps de réparation de la barrière est plus court chez la souris comparé à l'homme (24 heures contre 60 à 70 heures pour le modèle utilisé). On pourrait, donc, penser que le système de réparation est plus efficace chez la souris. Cependant, il faut aussi prendre en compte les différences morphologiques qui existent entre les espèces, que ce soit au niveau de l'épiderme dans son ensemble ou, plus particulièrement, au niveau du *stratum corneum,* et même, du pelage (41).

Au sein d'une même espèce, la réparation de la barrière est beaucoup plus rapide chez les sujets jeunes que chez les individus plus âgés. En témoignent les résultats d'une étude, chez l'homme, dans laquelle la récupération à 24 heures était de 50% chez des personnes jeunes alors qu'elle était de 15% chez des personnes plus âgées avec, chez ces dernières, un délai de récupération complète de six jours supplémentaires.

Des observations similaires sont rapportées chez la souris (20).

L'état émotionnel a aussi un rôle. En effet, la relation entre le stress et l'homéostasie de la barrière cutanée a été explorée suite au constat qu'un certain nombre de dermatoses semblent associées au stress chez l'homme.

Ainsi, il a été montré, dans des modèles expérimentaux de rongeurs, que le stress augmentait le temps nécessaire à la réparation de la barrière cutanée. En outre, l'utilisation de sédatifs supprimait ce retard (9).

Enfin, remarquons que l'utilisation de certains topiques accélère le rétablissement de la barrière (1, 47, 50, 69).

III. LA PERTE INSENSIBLE EN EAU

1. LE ROLE DE L'EAU DANS LA COUCHE CORNEE

L'épiderme vivant contient 70% d'eau alors que le *stratum corneum* en contient seulement 15% (37). Cependant, le rôle de l'eau au sein du *stratum corneum* est loin d'être négligeable. Elle participe aux processus enzymatiques nécessaires à la desquamation et à la production de substances ayant un pouvoir de rétention de l'eau. Ces dernières sont regroupées sous le terme de « Natural Moisturizing Factor » (facteur hydratant naturel) ou NMF. Le NMF regroupe, non seulement, des acides aminés et leurs dérivés, mais aussi des molécules comme l'acide lactique, l'urée et des sucres qui ont un

pouvoir hautement hygroscopique et qui agissent comme humectants endogènes. Les acides aminés dérivent de la dégradation de la filaggrine dans les couches supérieures du *stratum corneum*. Ainsi, la capacité des cornéocytes à retenir l'eau est influencée par le taux de protéolyse (35). De la même manière, le glycérol, issu du métabolisme des phospholipides, d'origine sébacée ou provenant de la circulation sanguine, permet le maintien d'une hydratation correcte du *stratum corneum* grâce à son pouvoir de rétention hydrique.

De plus, l'hydratation a son importance dans les propriétés physiques de la peau, comme sa souplesse (14). Chez le chien, des anomalies de l'équilibre hydrique du *stratum corneum* peuvent conduire à un squamosis du fait de la déshydratation qui en résulte (4).

La concentration en eau dans la couche cornée n'est pas homogène. En effet, cette concentration diminue à mesure que l'on se rapproche de la surface. Il existe, donc, un gradient d'hydratation à l'intérieur de la couche cornée (19).

Un modèle théorique de l'hydratation du *stratum corneum* a été proposé. Il différentie :

- l'eau dite « liée » qui correspond à 30% de l'eau présente dans la couche cornée. Elle comprend les molécules d'eau liées, plus ou moins fortement, aux protéines et lipoprotéines de la couche cornée. Elle participe à l'hydratation primaire de la peau et contribue à augmenter l'imperméabilité du *stratum corneum* par le biais de changements de conformation des protéines et par un renforcement de la stabilité des liaisons entre molécules d'eau voisines ;
- l'eau dite « libre » qui représente 70% de l'eau absorbée dans le *stratum corneum*. Elle contient de nombreux composés à l'état dissous tels que des ions, des acides aminés, de l'urée… qui font partie des NMF (2, 19).

La couche cornée possède la capacité de percevoir les changements des conditions d'ambiance et d'y répondre de manière adéquate par la mise en jeu d'un système de rétrocontrôle. Par exemple, lorsque l'humidité relative chute, des facteurs hydratants naturels sont produits par le biais de l'activation de protéases (41).

2. DEFINITION DE LA PERTE INSENSIBLE EN EAU

La barrière cutanée n'est pas absolue et il existe, physiologiquement, un mouvement d'eau à travers le *stratum corneum* en direction du milieu extérieur. L'eau peut traverser la peau de deux manières : par le biais des canaux excréteurs des différentes glandes cutanées, c'est le phénomène actif de transpiration, ou par diffusion transcutanée pour les zones non folliculaires. Le passage d'eau à travers le *stratum corneum* est passif mais les molécules circulent uniquement dans les espaces intercellulaires et non dans les cellules. Cette diffusion correspond à la perte insensible en eau ou « transepidermal water loss ». C'est l'existence d'un gradient de concentration en eau qui est le moteur de cette diffusion (35).

Néanmoins, d'autres paramètres interviennent. En effet, les molécules de la couche cornée vont entraver la mobilité des molécules d'eau par le jeu des interactions électrostatiques. Toutefois, plus la peau sera hydratée et plus les molécules d'eau seront

à distance des molécules attractives et seront, par conséquent, mobiles. L'évaporation transcutanée sera, donc, en théorie, plus facile et importante. Cependant, ceci est à nuancer, notamment, lors de dermatose. Ainsi, les mouvements d'eau à travers la peau sont susceptibles de varier (2).

Chez l'homme, au repos et en l'absence de turbulences, l'air ambiant immédiatement au contact de la surface cutanée forme une zone de transition de 7 à 10 mm d'épaisseur dans laquelle la vapeur d'eau est transportée de la peau vers le milieu extérieur (18).

Il faut tout de même noter que le *stratum corneum* est très efficace pour limiter les pertes ou les entrées d'eau au sein de l'organisme. Chez l'homme sain, c'est environ un demi-litre d'eau qui est perdue, par jour, sous forme de « perspiration insensible » (qui comprend l'eau perdue par évaporation transcutanée et celle perdue lors de la respiration) par rapport aux valeurs maximales, de deux à quatre litres, que peut atteindre la transpiration (18, 37).

Autrement dit, la quantité d'eau traversant le *stratum corneum* par diffusion passive est estimée entre 300 et 400 millilitres par jour dans des conditions normales, soit l'équivalent d'un dixième à un vingtième de la quantité perdue par la transpiration (19).

Remarquons que le chien transpire très peu par rapport à l'homme ou à d'autres animaux, comme le cheval, puisque qu'il ne possède des glandes sudoripares eccrines qu'au niveau des coussinets. Bien qu'il possède des glandes apocrines sur l'ensemble du corps, celles-ci ont plutôt un rôle dans la communication par le biais des phéromones.

3. *LA FONCTION BARRIERE ET LA PERTE INSENSIBLE EN EAU*

Chez l'homme, l'évaluation de la fonction barrière imperméable utilise les mesures de la perte insensible en eau. Ces dernières fournissent des informations sur le statut de la barrière, en conditions normales, expérimentalement altérées ou lors de maladies.

Une valeur élevée de la perte insensible en eau traduit une barrière épidermique déficiente chez l'homme. De plus, de nombreuses études ont montré qu'il existait des valeurs élevées de la perte insensible en eau dans des dermatoses comme la dermatite atopique, le psoriasis…

La perte insensible en eau est donc un paramètre très utile qui caractérise la fonction barrière cutanée chez l'homme (17, 62, 70).

Il semble que des perturbations de la barrière conduisent à des changements, dans la différentiation épidermique, qui modifient la capacité du *stratum corneum* à retenir l'eau. Ainsi, la perte insensible en eau peut être causée par une exposition, unique ou répétée à des substances irritantes, par détérioration des couches cornées supérieures (détergents, acides, bases, oxydants puissants), ou par des troubles de la formation de la couche cornée. Ces altérations conduisent, le plus souvent, à l'état de peau sèche.

C'est pourquoi les produits hydratants améliorent la fonction barrière de la peau (56).

Une augmentation de l'hydratation de la couche cornée entraine, en général, une augmentation de la perte insensible en eau d'une peau saine et non traitée par un agent

topique (hydratant ou autre) mais, pas forcément, dans le cas d'une peau traitée ou présentant un état pathologique. Dans ce dernier cas, des valeurs de perte insensible en eau élevées, révélant une perturbation de la barrière cutanée, sont souvent corrélées à une faible hydratation de la couche cornée. Ainsi, les valeurs de perte insensible en eau sont inversement proportionnelles à l'hydratation du *stratum corneum*.

La relation est donc complexe entre l'hydratation de la couche cornée et la fonction barrière, mesurée par la perte insensible en eau (19).

Néanmoins, quelques nuances sont à apporter. La barrière cutanée ayant comme rôle principal d'empêcher la perte d'eau (barrière de l'intérieur vers l'extérieur), elle est essentiellement caractérisée par la mesure de la diffusion d'eau au travers du *stratum corneum* et, donc, par les valeurs de la perte insensible en eau. Elle possède, également, d'autres fonctions, comme celle d'empêcher la pénétration de substances provenant de l'extérieur (barrière de l'extérieur vers l'intérieur). Cette fonction pouvant être objectivée par la pénétration de colorant à travers la peau.

Très rarement, et sous certaines conditions, il arrive que la perte insensible en eau ne soit pas un marqueur fiable de la barrière intérieur-extérieur. Par exemple, le traitement topique de lésions de dermatite atopique aux corticoïdes réduit la valeur de la perte insensible en eau alors qu'il n'y a pas eu de réparation de la barrière (56).

La corrélation entre la fonction barrière de la peau et la perte insensible en eau a été évaluée dans l'espèce canine. Shimada *et al.* se sont servis de la technique du « tape stripping » pour altérer la fonction barrière de la peau. Une corrélation positive entre le nombre de « strips » (qui sont des morceaux de cellophane adhésive appliqués sur la peau) et la perte insensible en eau, mesurée avec l'analyseur CC-01, a pu être mise en évidence. Plus le nombre de « strips » est élevé et plus les valeurs de la perte insensible en eau sont élevées. Ceci, couplé à l'étude, en parallèle, de la pénétration d'une substance fluorescente, a permis de conclure à l'existence d'une corrélation positive entre la rupture de la barrière cutanée et la perte insensible en eau. Ainsi, la mesure de la perte insensible en eau autorise l'évaluation quantitative de la fonction barrière chez le chien (62).

De nombreuses études, réalisées *in vivo*, *in vitro* et *ex vivo* chez différentes espèces, concluent à la corrélation entre le statut de la barrière imperméable et la perte insensible en eau (17).

Malgré une publication de Chilcott *et al*. ayant conclu à une absence de corrélation entre la perte insensible en eau et la fonction barrière de la peau *in vitro*, la perte insensible en eau est véritablement le reflet du statut de la barrière *in vivo* lorsque les mesures sont réalisées correctement. Ces résultats paradoxaux peuvent s'expliquer par l'absence de prise en compte des réponses biologiques du système cutané dans son ensemble (41).

Actuellement, en médecine humaine, il existe un consensus selon lequel la perte insensible en eau reflète le statut de la barrière cutanée.

4. *MESURE DE LA PERTE INSENSIBLE EN EAU*

Chez l'homme, la mesure de la perte insensible en eau, qui est un excellent indicateur de l'état fonctionnel du *stratum corneum*, est largement utilisée pour évaluer la fonction barrière (2, 4, 70).

a. Les différents appareils

Pour mesurer la perte insensible en eau, deux types d'instruments peuvent être employés : ceux ayant une chambre de mesure ouverte, les plus couramment utilisés pour évaluer la fonction barrière chez l'homme, et ceux ayant une chambre de mesure fermée, de mise au point plus récente (19, 70).

i. Appareils à chambre ouverte

Ils permettent la mesure de l'évaporation de l'eau à la surface de la peau. La conception de ce type d'appareil est basée sur l'application du principe de diffusion de manière à déterminer le flux de vapeur d'eau passant à travers la peau.

En effet, la perte insensible en eau correspond à un phénomène de diffusion passive de l'eau à travers la couche cornée et c'est le gradient de pression de vapeur d'eau de part et d'autre du *stratum corneum* qui en est le moteur. Cette diffusion suit la première loi de Fick qui dit que le flux (J en $g.m^{-2}.h^{-1}$) d'une molécule par unité de longueur (δ en mètre) est proportionnel au gradient de concentration (ΔC en $g.m^{-3}$) et au coefficient de diffusion (D en $m^2.h^{-1}$) de cette molécule. Cependant, à la différence d'une simple membrane inerte, le *stratum corneum* possède une certaine affinité pour l'eau qui doit être prise en compte dans la loi de Fick. C'est ainsi que le coefficient de partage K_m a été introduit dans la formule qui donne donc :

$$J = - K_m \times D \, (\Delta C / \Delta \delta)$$

Avec K_m = (concentration de l'eau dans le *stratum corneum* profond) / (concentration dans les espaces intercellulaires de l'épiderme vivant) ≈ 0,06

Le signe « - » indique que le flux est dirigé vers les concentrations les plus faibles. Ceci démontre la relation entre l'humidité relative de l'air ambiant et la perte insensible en eau. Ainsi, la perte insensible en eau est inexistante lorsque l'humidité relative extérieure est de 100% et elle est maximale lorsque l'humidité relative est de 0%. Une température basse, une humidité relative élevée et l'absence de flux d'air à la surface de la peau sont à l'origine d'une diminution de la perte insensible en eau.

Il faut bien noter que ce principe n'est applicable que dans le cas d'une aire de diffusion homogène. Les appareils de mesure construits sur ce principe sont constitués d'une sonde que l'on applique sur la peau et qui délimite une chambre cylindrique ouverte à l'air ambiant. Cette dernière contient deux détecteurs semi-conducteurs sensibles à l'humidité, chacun couplé à un thermistor et montés verticalement l'un au-dessus de l'autre (figure 7). Leur positionnement est tel qu'il permet d'évaluer, dans des conditions optimales, le gradient de vapeur d'eau se mettant en place entre la surface

cutanée et l'air ambiant. Lorsque la chambre cylindrique est placée sur la peau, dans un environnement stable, la différence de mesure de la vapeur d'eau entre les deux capteurs détermine la valeur du flux d'eau s'évaporant de la surface de la peau et passant dans la chambre. Le cylindre constitue approximativement une zone de diffusion homogène. La pression de vapeur d'eau est, elle-même, calculée en fonction de l'humidité relative mesurée par les semi-conducteurs et la pression à saturation calculée en fonction de la température. Ces mesures, enregistrées par les capteurs, permettent, donc, d'obtenir indirectement le gradient de pression résultant grâce à l'analyse par le microprocesseur inclus dans l'appareil (2, 4, 5, 19, 37).

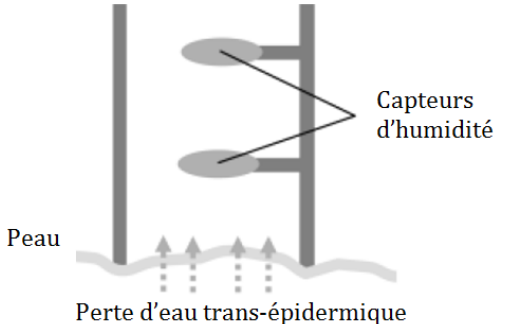

Figure 7 : schéma de la chambre ouverte, d'après (70).

Il existe différents appareils, qui sont largement utilisés chez l'homme, aussi bien dans le domaine de la recherche que dans le cadre de la pratique clinique. Parmi les appareils utilisant cette technique, on trouve, par exemple, l'Evaporimeter®, le Tewameter® et le DermaLab®. Diverses publications ont comparé ces appareils entre eux et il s'avère que les valeurs mesurées pour une situation particulière peuvent différer malgré une étroite corrélation. De plus, une altération de la fonction barrière peut entrainer des changements de valeurs qui ne sont pas identiques d'un appareil à l'autre.

Le principal inconvénient de cette méthode est sa sensibilité aux flux d'air ambiant qui peuvent perturber l'établissement du gradient de vapeur d'eau. Pour pallier cela, il est nécessaire d'établir un protocole rigoureusement standardisé, avec des conditions de mesures bien définies et, plus particulièrement, en ce qui concerne la climatisation. Dans cette optique, des recommandations très précises ont été publiées (19). Autre spécificité, la sonde doit être maintenue dans une position verticale lors des mesures, de manière à ce que le flux de vapeur d'eau passe à travers les deux capteurs (8).

Pour remédier à ces limites, d'autres types d'appareils ont été mis au point.

ii. Appareils à chambre fermée

Deux types d'appareils à chambre fermée existent :

- ceux utilisant la technique du « cylindre non ventilé », avec un capteur d'humidité placé dans une chambre cylindrique fermée d'un côté. L'autre côté est mis en contact avec la peau. L'évaporation est, alors, évaluée grâce à l'analyse de la cinétique de l'augmentation de l'humidité à l'intérieur du cylindre. Cependant, cela implique que l'air présent dans la chambre soit renouvelé entre chaque mesure. Le VapoMeter® fait partie de ce type d'appareils.

- ceux dit « à condensateur » pour lesquels le condensateur est refroidi à -7,65°C. Ce dernier va capter la vapeur d'eau à l'intérieur de la chambre et permettre des mesures continues sans obligation de renouveler l'air à l'intérieur du cylindre. L'AquaFlux® a été mis au point selon ce principe.

Là encore, des études comparatives montrent que l'obtention des valeurs est plus rapide lorsque les mesures sont réalisées selon la technique du « cylindre non ventilé » par rapport à la technique de la chambre dite « à condensation » mais la variabilité de ces valeurs est plus importante avec la première méthode (19).

Ces appareils permettent de s'affranchir des effets des mouvements d'air et des conditions environnementales lors des mesures et, ainsi, une utilisation plus facile et à plus grande échelle (19).

iii. Comparaison des deux types d'appareils

En comparant les appareils de mesure à chambre ouverte et ceux à chambre fermée, il apparaît que, malgré une bonne corrélation entre les deux méthodes de mesure, la méthode du « cylindre non ventilé » donne, en général, des valeurs trop élevées lorsque la perte insensible en eau est importante. En effet, dans ces conditions, la chambre de mesure se trouve saturée en vapeur d'eau et les mesures se révèlent donc peu fiables (19).

Cependant, les appareils à chambre fermée étant de développement plus récent, les améliorations apportées ces dernières années et les avantages de ce type d'appareils font, qu'actuellement, ils sont largement utilisés chez l'homme (19).

b. Facteurs de variation

La mesure de la perte insensible en eau peut être affectée par un certain nombre de paramètres. En effet, comme cette dernière dépend du gradient de vapeur d'eau à la surface de la peau, tout facteur, intrinsèque ou extrinsèque, ayant une influence sur l'épaisseur de cette couche de transition ou sur son gradient, modifie les valeurs mesurées.

De plus, les appareils de mesure étant très sensibles aux conditions environnementales, il est nécessaire de standardiser les conditions de mesure de façon rigoureuse.

Selon les appareils, les paramètres intervenant varient un peu mais, globalement, on peut distinguer les facteurs de variations dus à :

- l'instrument
- l'environnement
- l'individu (18).

i. Variations dues à l'appareil

Afin de limiter les facteurs de variation dus à l'outil de mesure, il est nécessaire de ne pas éteindre l'appareil entre deux mesures pour que le préchauffage de l'électronique soit suffisant, de contrôler la variation du zéro instrumental pendant la période de mesure, d'éviter les variations d'humidité et de température à l'intérieur de la sonde, d'effectuer régulièrement des étalonnages selon les recommandations du constructeur

et d'avoir un plan de mesure horizontal (18). Toutefois, ce dernier point est moins vrai concernant les appareils à chambre fermée, d'où leur intérêt sur des animaux (31).

Enfin, le temps nécessaire à une mesure est important et dépend de l'appareil utilisé. Par exemple, il faut plus d'une minute avec un Tewameter® alors que 10 secondes suffisent avec le VapoMeter® (4, 17).

ii. Influence de l'environnement

L'homogénéité de la couche de diffusion au-dessus de la peau dépend des conditions environnementales. On comprend mieux la nécessité d'acclimater préalablement le sujet et d'avoir des conditions environnementales (température et humidité) constantes et reproductibles dans la pièce où se déroulent les mesures.

Les facteurs environnementaux sont, essentiellement, la température et l'humidité ambiantes ainsi que les flux d'air pendant la mesure.

Comme nous venons de le voir, la perte insensible en eau dépend de l'humidité relative. En outre, une variation de l'humidité relative va entrainer un changement concomitant de l'hydratation du *stratum corneum.* Sunwoo *et al*. ont mis en évidence une augmentation de la perte insensible en eau et une diminution de l'hydratation de la peau du visage lorsque des volontaires étaient soumis à une diminution de l'humidité relative (passage de 50 à 30% et de 50 à 10% d'humidité relative) (63). De Paepe *et al*. ont montré qu'une augmentation de l'humidité relative induisait une variation des valeurs de perte insensible en eau et changeait la température affichée sur le VapoMeter (52). Autre aspect, l'humidité relative semble affecter la durée de mesure requise pour certains instruments (comme le TEWL-analyzer® CC-01) sans modifier les valeurs affichées (70).

Avec certains appareils et pour des températures un peu extrêmes, des différences significatives peuvent être observées entre les mesures (17, 70). La température de la sonde peut aussi jouer (52).

L'ouverture d'une porte, d'une fenêtre ou, même, la respiration de la personne effectuant les mesures peuvent fausser la prise des valeurs. Cependant, ce dernier point ne concerne que les appareils possédant une chambre ouverte.

Pour minimiser l'influence des mouvements d'air, Watson et son équipe ont éduqué les chiens au « clicker » pour éviter qu'ils ne bougent pendant les mesures. Cependant, les résultats présentent une variabilité similaire à d'autres études où les chiens ne sont pas entrainés mais dont les manipulations douces permettent une restriction des mouvements (23, 31, 67).

Une température basse, une humidité relative élevée et l'absence de flux d'air à la surface de la peau sont à l'origine d'une diminution de la perte insensible en eau (2, 4, 5, 19, 70).

Enfin, la pression exercée sur la peau avec la sonde n'interfère pas directement avec les mesures mais peut perturber la circulation sanguine cutanée. De plus, un contact optimal est nécessaire pour une bonne évaluation de l'évaporation de l'eau (52).

iii. Facteurs individuels

Les facteurs individuels doivent également être contrôlés. Les deux paramètres majeurs, à prendre en compte lors de mesures sur l'homme, sont la transpiration du sujet et la température cutanée. Chez l'animal, des facteurs supplémentaires interviennent.

Le pelage va avoir une influence car un animal au pelage foncé va perdre plus d'eau qu'un animal au pelage clair (2). En outre, plus le pelage est dense et plus la perte est faible car le pelage sert d'isolant (2). Il est responsable d'un gradient d'humidité relative qui varie avec l'environnement extérieur (2).

Ainsi, dans l'espèce canine, la densité du pelage peut être considérée comme un facteur influençant la perte insensible en eau. Il en est de même pour la tonte qui peut affecter de manière importante le microclimat cutané et notamment la température et l'humidité relative. Le pelage peut, également, gêner l'établissement d'un contact optimal avec l'appareil de mesure (46).

Watson et son équipe ont mis en évidence une chute de la perte insensible en eau, de 44%, deux minutes après la tonte, en région lombaire. Ces valeurs faibles se maintiennent 24 heures avant de remonter, pour atteindre des valeurs normales, 48 heures après la tonte. Par contre, à longueur de poil équivalente, la coupe aux ciseaux n'induit aucune variation significative (67).

Dans une étude sur l'influence de la méthode de tonte, il s'est avéré qu'une tonte correcte, c'est-à-dire qui ne créé pas de lésions épidermiques, est indispensable à l'obtention de données fiables. En effet, les valeurs de la perte insensible en eau, mesurées trois minutes après la tonte, sont plus élevées lorsque la tonte n'est pas réalisée de manière conventionnelle (46).

Lau Gillard *et al*., quant à eux, n'ont pas montré de différence significative, entre les valeurs mesurées avant et deux minutes après la tonte, en région dorsale. Toutefois, ils n'ont pas réalisé de mesure au-delà de deux minutes. Ces résultats diffèrent donc de ceux obtenus par Watson *et al.,* mais cette apparente contradiction pourrait être due à un manque de pertinence biologique des valeurs relevées (31). De plus, Watson et son équipe ont utilisé un appareil à chambre ouverte alors que les deux autres études, plus récentes, ont été réalisées avec un appareil à chambre fermée, le VapoMeter. Or, l'humidité adsorbée par les poils résiduels, même après tonte du site de mesure, est détectée par les capteurs d'humidité des appareils à chambre ouverte et va influencer les valeurs mesurées (70).

En outre, cette dernière étude révèle une perte d'eau significativement plus marquée chez les chiens à poils longs que chez les chiens à poils courts (31).

Les valeurs de perte insensible en eau diffèrent entre les espèces.

De plus, chez le chien, l'effet race est significatif sur les valeurs de perte d'eau. Par contre, l'influence du sexe et de l'âge du chien n'a pas pu être mise en évidence de façon statistiquement significative mais cela est peut-être lié aux critères de choix utilisés pour classer un chien comme « jeune » ou « vieux » (31, 67).

En revanche, chez l'homme et la souris, Ghadiallly *et al*. ont remarqué que le taux basal de la perte insensible en eau est légèrement plus bas chez les individus âgés par rapport aux jeunes (20). Toutefois, dans une autre étude réalisée sur la peau du visage,

les auteurs ont mis en évidence une influence de l'âge variable sur la perte insensible en eau selon les différents sites (38).

Il faut également remarquer que, pour un même individu, des différences sont observées, selon la localisation anatomique des sites de mesure, que ce soit chez l'homme ou chez le chien (18, 23, 31, 46, 67).

Chez l'homme, il a été montré que la perte insensible en eau dépend du flux sanguin cutané, des phénomènes hémodynamiques locaux, du degré de formation des cornéocytes, de la composition lipidique de la couche cornée, de la distribution des glandes sudoripares, des divers états de la peau et des maladies (31, 46).

De plus, le rythme circadien entraine des variations mineures au cours de la journée qui ne sont pas toujours détectées par les appareils les moins sensibles (52).

Pour conclure, voici un tableau récapitulant les avantages et les inconvénients des appareils de mesure de la perte insensible en eau, notamment pour une utilisation sur des chiens. Les quatre principaux appareils employés sont le Tewameter®, l'Evaporimeter®, le VapoMeter® et le TEWL analyzer® CC-01. Une bonne corrélation est notée entre les valeurs obtenues par ces appareils.

Type d'appareil		Avantages	Inconvénients
Chambre de mesure ouverte	Tewameter®	Mesures en continu	Sensibilité aux flux d'air ambiant et à l'humidité adsorbée par les poils, influence de l'orientation de la sonde, appareil moins pratique et plus encombrant (sonde reliée à l'unité de mesure), temps de mesure (de 1 à 2 min)
	Evaporimeter®		
Chambre de mesure fermée	VapoMeter®	Simple d'utilisation (un seul bouton) et de manipulation, portable, utilisable dans n'importe quelle orientation (sauf dans une étude réalisée *in vitro*), insensible aux flux d'air et à l'humidité résiduelle adsorbée par les poils, temps de mesure (10 s)	Affichage de valeurs ponctuelles, saturation de la chambre de mesure en vapeur d'eau en cas d'évaporation importante d'où une moins bonne fiabilité et un retour au zéro plus long
	TEWL analyzer® CC-01	Mesures en continu, insensible aux flux d'air et à l'humidité résiduelle	Mesures plus longues en cas d'humidité relative élevée, influence d'une variation importante de la température, appareil moins pratique et plus encombrant

Tableau I : Avantages et inconvénients des différents types d'appareils de mesure de la perte insensible en eau (2, 13, 17, 23, 31, 52, 67, 70).

iv. Recommandations

Les facteurs dus à l'environnement et ceux dus aux sujets sont à l'origine des plus grandes variations.

En outre, le choix raisonné d'un appareil de mesure, en adéquation avec les contraintes inhérentes à l'étude réalisée, est essentiel et doit prendre en compte les avantages et les inconvénients de chaque instrument de mesure. Par exemple, il vaut mieux privilégier l'utilisation d'appareils à chambre fermée lorsque les manipulations se font sur des individus susceptibles de bouger et donc de créer des turbulences.

Lorsque la standardisation des conditions de mesure est assurée, les facteurs dus à l'appareil passent au second plan.

C'est ainsi que les recommandations suivantes ont pu être établies: effectuer les mesures dans une pièce climatisée, à température et humidité constante, éviter les mouvements d'air (couveuse, restriction des mouvements des chiens… mais ceci est surtout vrai pour les appareils à cylindre ouvert), exercer une pression légère sur la peau avec la sonde de manière à obtenir une certaine étanchéité de la chambre de mesure. Les individus doivent s'être préalablement adaptés aux conditions environnementales, tout stress doit être évité pour ne pas provoquer de transpiration importante. Pour la même raison, lorsque les mesures se font chez l'homme, il est recommandé de ne pas consommer d'aliments épicés avant les mesures (18).

De plus, de nombreux autres facteurs comme le milieu de vie, l'alimentation… vont contribuer aux variations individuelles, d'où la difficulté à établir des normes (31).

c. Applications

La mesure *in vivo* de la perte insensible en eau est utilisée pour apprécier de façon non invasive la fonction barrière de la peau. La perte insensible en eau reflète l'intégrité de cette barrière physiologique et sa mesure est devenue facile avec l'arrivée d'appareils pratiques et précis. Chez l'homme, elle reste la technique la plus sensible pour détecter une altération cutanée (19).

L'évaluation de la perte insensible en eau autorise la comparaison de la perméabilité cutanée, chez un même individu, en différentes régions corporelles. Chez l'homme, des mesures ponctuelles chez un même individu sont stables et bien reproductibles à un ou deux mois d'intervalle. Par contre, la comparaison entre les personnes est moins évidente en raison de grandes variations individuelles. La technique, chez l'homme, est fiable et suffisamment sensible pour la plupart des utilisations et les résultats sont similaires quelle que soit la méthode utilisée. Une attention particulière doit, cependant, être portée à l'étalonnage.

Les appareils de mesure sont largement utilisés en cosmétologie et en pharmacologie pour étudier la biologie cutanée, la pathogénie et le traitement des maladies de la peau. Ils permettent, plus particulièrement, l'étude de la fonction barrière de la peau par la mise en évidence d'un lien étroit entre la perte insensible en eau et la pénétration cutanée de certaines substances.

Cette procédure peut être utilisée pour la standardisation de diverses études dans lesquelles la fonction barrière est altérée ; pour la détection d'une irritation cutanée ou

d'une sensibilité à certains agents irritants, savons ou tensio-actifs ; pour l'évaluation de produits topiques (comme la mesure du pouvoir occlusif de l'excipient et la détermination de l'efficacité thérapeutique des produits appliqués sur des zones lésées ou irritées) ; pour déterminer la capacité de restauration du film lipidique lors d'altération de celui-ci…

Il en résulte de nombreuses applications cliniques possibles pour un suivi médical amélioré lors d'inflammation cutanée, pour le suivi de la cicatrisation ou de la régénération de la peau brûlée, des nouveau-nés, des traitements de différentes dermatoses comme la dermatite atopique, le psoriasis, les ichtyoses… C'est ainsi que la détermination de la perte insensible en eau a pris sa place dans le suivi des prématurés et des grands brulés (4, 18, 19, 37).

d. Quelques résultats expérimentaux

Plusieurs études ont étudié la pertinence des différents appareils de mesure de la perte insensible en eau dans l'évaluation de la barrière cutanée, chez diverses espèces, et les ont confrontés entre eux.

Ces tests ont été réalisés sur différents modèles (*in vivo, in vitro et ex vivo*) avec, parfois, une comparaison avec des méthodes alternatives pour évaluer la perte d'eau (utilisation de mesures gravimétriques par exemple). En général, les résultats concluent à une bonne fiabilité pour l'estimation de la perte insensible en eau et l'évaluation du statut de la barrière cutanée. Ils montrent, également, une bonne corrélation entre les différents appareils et avec les mesures gravimétriques. De plus, la reproductibilité des mesures chez l'homme est bonne. Toutefois, les appareils présentent une sensibilité variable. Ceci étant dû, probablement, aux différentes méthodes de mesure sur lesquelles est basé le fonctionnement des appareils (8, 13, 17, 52).

Selon les espèces, les valeurs varient de quelques $g.m^{-2}.h^{-1}$ à quelques dizaines de $g.m^{-2}.h^{-1}$.

i. Homme

Chez l'homme sain, une expérimentation a révélé des valeurs allant de 7,7 ± 2,6 $g.m^{-2}.h^{-1}$ sur le mollet à 22,4 ± 10,2 $g.m^{-2}.h^{-1}$ au niveau du front avec un Tewameter® TM 210 (16). Des valeurs similaires ont été rapportées avec d'autres appareils sur des sites différents ou identiques (13, 18, 52).

Des variations ont été observées selon l'âge des sujets : chez des hommes sains de plus de 80 ans, les valeurs s'élèvent à 4,43 ± 0,16 $g.m^{-2}.h^{-1}$ alors qu'elles sont de 6,41 ± 0,93 $g.m^{-2}.h^{-1}$ chez les moins de 30 ans. Les mesures ont été prises avec un Evaporimeter® sur l'avant-bras des sujets (20).

Chez les individus atopiques, les mesures atteignent, sur la joue, 70 ± 7 $g.m^{-2}.h^{-1}$ au niveau de lésions contre 38 ± 10 $g.m^{-2}.h^{-1}$ sur les zones non lésées. Les individus sains, au même endroit, présentent des valeurs de 10 ± 2 $g.m^{-2}.h^{-1}$ avec un Evaporimeter® (64).

ii. Souris

Chez la souris, la perte insensible en eau d'une peau saine est d'environ 9 $g.m^{-2}.h^{-1}$ avec le Tewameter® TM 210 (50, 57).

iii. Chien

Nous allons nous intéresser plus longuement au cas du chien et aux diverses études menées dans cette espèce pour déterminer la perte insensible en eau, la pertinence des appareils à estimer le statut de la barrière cutanée et l'influence de certains paramètres. Le tableau suivant synthétise les expériences menées.

Etudes (année)	Appareil utilisé (type)	Modèles employés et tests réalisés	Race et sexe	Age	Milieu de vie	Sites	Résultats
(4) (2000)	Tewameter® TM-210 (chambre ouverte)	*in vivo*, chiens sains non tranquillisés, sites tondus	5 beagles	Jeunes adultes	Même chenil	Abdomen, lombes droite et gauche, croupe et face interne du pavillon auriculaire gauche	Mesures non reproductibles, variations entre les individus et au cours du temps
(67) (2002)	Evaporimeter® EP-2 (chambre ouverte)	*in vivo*, chiens sains entrainés à ne pas bouger pendant les mesures, sites tondus	22 labradors (noirs)	De 2 à 12 ans	Non mentionné	Tête, queue, abdomen, entre les épaules, région lombaire et cuisse	Les valeurs obtenues avec les chiens entrainés sont plus fiables Validation de l'utilisation de l'EP-2 pour évaluer précisément la perte insensible en eau chez le chien
(23) (2004)	Tewameter® TM-300 (chambre ouverte)	*in vivo*, chiens sains, tonte des différents sites, suivis sur plusieurs semaines	9 femelles beagles et 15 mâles hounds	De 1,5 à 6,5 ans	Non mentionné mais alimentation identique 3 semaines avant les tests	Région inguinale gauche	Mise en évidence d'un effet race Les chiens n'ont pas été entrainés mais la variabilité des valeurs obtenues est similaire à celle des études où les chiens sont dressés Utilisation possible de cette méthode pour évaluer l'effet de traitements ou de l'alimentation sur la peau de chiens
(2) (2006)	Tewameter® TM-210 (chambre ouverte)	*in vivo*, chiens sains, différents sites, tonte selon la densité du pelage du site	5 labradors	3 ans	Non mentionné mais chiens habitués aux manipulations fréquentes	Flancs, thorax et pavillons auriculaires droit et gauche, ligne du dos, cou et ligne blanche	Valeur de perte insensible en eau variables selon les sites et les chiens
(70) (2007)	Tewameter® TM-300 (chambre ouverte) et TEWL-analyzer® CC-01 (chambre fermée)	*in vivo*, chiens sains	19 beagles (11 mâles et 8 femelles) et 2 femelles croisées	De 1 à 7 ans	Non mentionné	Tête, épaules, région lombaire, base de la queue, cuisse, aisselle et abdomen	CC-01 plus fiable que le TM-300, variations des valeurs selon le site

(62) (2008)	TEWL-analyzer® CC-01 (chambre fermée)	*in vivo*, chiens sains, utilisation du « tape stripping » et d'un colorant pour induire l'altération du *stratum corneum* et la mettre en évidence	2 beagles et 8 croisés	De 7 à 13 ans	Mêmes conditions environnementales et même nourriture	Régions lombaire et inguinale	L'importance de l'altération de la peau est proportionnelle au nombre de « strips » réalisés et l'augmentation de la perte insensible en eau reflète bien l'altération de la fonction barrière cutanée chez le chien
(46) (2009)	VapoMeter® (SWL-3) (chambre fermée)	*in vivo*, chiens sains, différents sites, test de l'effet de la tonte	5 beagles mâles	De 2 à 4 ans	Cages d'un même chenil et même nourriture 12 semaines avant les tests	Tête, bas et haut du dos et queue	Influence de la manière dont est réalisée la tonte et du site choisi
(31) (2010)	VapoMeter® (SWL-5) (chambre fermée)	*in vivo*, chiens sains, différents sites, test de l'effet de la tonte, de la longueur du poil essai pilote *in vivo*, homme sain, test de l'effet de l'orientation de l'appareil, des différents sites Mesures sur plusieurs jours	22 chiens (mâles et femelles) de 13 races différentes	De 10 mois à 14 ans	Conditions de vie différentes (chiens appartenant à différents propriétaires)	Tête, pavillon des oreilles, entre les épaules, thorax, abdomen, aisselles, croupe et cuisses	Pas de différence dans les mesures quelque soit l'orientation de l'appareil Variations entre les chiens, entre les sites et selon les jours d'où la nécessité de protocoles bien standardisés

Tableau II : Résumé des études évaluant la perte insensible en eau dans l'espèce canine.

Dans l'étude de 2000, menée par Beco et Fontaine et concluant à l'absence de reproductibilité des mesures, les chiens n'étaient pas tranquillisés et l'appareil utilisé était à chambre ouverte. Ces deux données peuvent expliquer que les auteurs ne soient pas parvenus à obtenir des valeurs reproductibles. En effet, le Tewameter® est sensible aux mouvements d'air et les chiens n'étaient pas entrainés à rester immobiles (4).

L'expérience de 2004, comparant deux races de chien (beagle et hound), a obtenu des valeurs de perte insensible en eau allant de 2,8 à 50,7 $g.m^{-2}.h^{-1}$ avec une moyenne de 8,9 $g.m^{-2}.h^{-1}$ et un coefficient de variation de 18% (la moyenne étant de 5,3 $g.m^{-2}.h^{-1}$ pour les beagles et de 10,7 $g.m^{-2}.h^{-1}$ pour les hounds avec des coefficients de variation respectifs de 21% et 17%). L'effet race est significatif dans cette étude. Les chiens n'ont pas été entrainés pour cette étude mais ont été délicatement immobilisés. La variabilité est similaire à celle obtenue dans l'étude sur des chiens dressés (23).

Dans l'étude de 2006, les auteurs ont transposé différentes méthodes de mesure, développées en médecine humaine, pour apprécier certaines fonctions de l'épiderme de la peau du chien afin de déterminer des valeurs physiologiques et de juger de l'intérêt de ces appareils en médecine vétérinaire. L'évaluation de la perte insensible en eau faisait partie des paramètres étudiés.

Les mesures ont été effectuées avec un appareil à chambre ouverte (Tewamètre TM 210), sur cinq labradors, mâles et femelles, de trois ans, à différents endroits (oreilles, flancs et thorax droit et gauche, dos, cou et ligne blanche) qui ont été tondus ou non, selon la densité du pelage, au niveau des sites de mesure. Des valeurs variables de la perte insensible en eau ont été obtenues avec une fourchette allant de 5,1 à 60,6 $g.m^{-2}.h^{-1}$ et une valeur moyenne de 17,95 $g.m^{-2}.h^{-1}$ (2).

En 2007, Yoshihara *et al.* se sont penchés sur l'utilité de l'analyseur CC-01, appareil à chambre fermée, avec chambre ventilée, pour la mesure de la perte insensible en eau chez le chien. Le choix de ce type d'instrument se justifie par le fait qu'il est beaucoup moins dépendant des turbulences pouvant être causées par les mouvements du chien. Il ressort de l'étude que les mesures effectuées sont plus fiables avec le CC-01 qu'avec le Tewameter® TM 300 (appareil à chambre ouverte). Ceci va dans le sens de l'hypothèse avancée pour expliquer les résultats obtenus par Beco et Fontaine. Les moyennes obtenues se situent entre 15 et 66 $g.m^{-2}.h^{-1}$ selon la région anatomique, la température et l'humidité. Dans cette étude, les chiens n'ont pas été éduqués à rester immobiles mais cela pourrait améliorer la fiabilité. Il n'y a pas de différence significative entre les mâles et les femelles mais il existe un effet lié au site anatomique (70).

L'étude de 2008 est intéressante dans le sens où elle démontre une corrélation entre l'altération de la peau et le nombre de « strips » réalisés et conclut que l'augmentation de la perte insensible en eau reflète bien l'altération de la fonction barrière cutanée chez le chien (62)

Comme chez l'homme, la perte insensible en eau est significativement plus élevée chez les chiens atopiques, que ce soit sur une peau lésée ou non lésée (respectivement 94,3 ± 38,8 $g.m^{-2}.h^{-1}$ et 28,8 ± 9,5 $g.m^{-2}.h^{-1}$), par rapport aux chiens sains (12,3 ± 2,3 $g.m^{-2}.h^{-1}$). Il existe une corrélation statistique entre la perte insensible en eau et la quantité relative de céramides chez les chiens présentant une dermatite atopique. Ceci suggère que, à l'instar de ce qui se produit chez les personnes souffrant de dermatite atopique, la

diminution de la quantité de céramides augmente la perte insensible en eau chez les chiens atteints de dermatite atopique (61).

IV. METHODES DE RUPTURE DE LA BARRIERE CUTANEE

1. *PRESENTATION*

De nombreuses méthodes ont été élaborées pour altérer la barrière de la peau. Elles ont été développées et mises en application principalement chez l'homme et les rongeurs. Peu de données sont disponibles chez le chien.

Ces techniques peuvent être différenciées ou modulées en fonction du degré d'atteinte de la barrière que l'on souhaite obtenir. Cela va de la rupture légère à la rupture sévère avec toute une gamme de variations entre ces deux extrêmes. Il est, également, possible de faire une distinction entre les méthodes permettant de réaliser une rupture aiguë, ponctuelle, et les modèles de rupture chronique de la barrière.

Parmi les modèles d'altération aiguë, la rupture mécanique, par applications séquentielles de morceaux de cellophane adhésive sur la peau, à été largement utilisée chez l'homme et la souris alors que seules trois études ont été menées chez le chien (3, 7, 9–11, 13, 16, 20, 30, 34, 36, 39, 43, 47, 50, 55, 60, 64, 68, 69). Les solvants, comme l'éther et, surtout, l'acétone (9–11, 16, 20, 21, 36, 40, 43, 49, 55, 68, 69), ainsi que les détergents, dont le SDS (dodécylsulfate de sodium), sont également employés (11, 13, 26, 52, 69).

Différents modèles de rupture chronique ont été élaborés. Ils comprennent, par exemple, les applications successives et répétées sur plusieurs jours de morceaux de cellophane adhésive, ou d'acétone, sur une même zone cutanée (10, 39), le traitement topique sur plusieurs jours avec la lovastatine, un inhibiteur de la synthèse du cholestérol (55), ou l'utilisation d'une alimentation carencée en acides gras essentiels chez les souris (55, 68).

Selon la méthode choisie, la réponse de l'épiderme à la rupture ne sera pas exactement la même. En témoigne une étude sur la production de chimiokines par les cellules épidermiques. En effet, la réponse des cellules variait selon les modalités de rupture. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une rupture mécanique va permettre de retirer les cornéocytes et la matrice lipidique alors qu'une rupture chimique va plutôt altérer les bicouches lipidiques lamellaires (49).

C'est un des critères de choix des modalités d'altération de la barrière épidermique.

2. *INTERETS ET EXEMPLES D'APPLICATIONS*

Ces différentes procédures sont employées dans diverses études pour étudier le *stratum corneum,* d'une manière générale, et, plus particulièrement, pour examiner les effets physiques et physiologiques d'une rupture de la barrière sur l'épiderme (3, 10, 34), mieux comprendre la fonction barrière de la peau et son lien avec la perte insensible en eau (17, 21, 62), avoir un aperçu de sa réparation en suivant différents paramètres

comme la mesure de la perte insensible en eau, le pH et l'hydratation cutanée sur une période donnée (16)… Des chercheurs se sont servis de ces techniques pour étudier, plus spécifiquement, certaines modifications se produisant suite à une détérioration de la barrière. Ils se sont intéressés à la synthèse d'ADN (55), à l'expression de certains gènes (60) ou protéines (11), aux lipides et à leur métabolisme (36), à la formation et à la sécrétion des corps lamellaires (22, 40), à la réaction du système immunitaire (43, 49), à l'excrétion de substances endogènes (30), à la production de cytokines (68)…

Cette méthode peut également être utilisée pour obtenir une peau plus réactive et plus sensible, par exemple avant l'application d'un irritant ou d'un allergène (34, 48). Il est ainsi possible d'élaborer des modèles comme, par exemple, celui reproduisant la lichénification qui se produit chez l'homme atteint d'eczéma chronique (39).

Une fois que la fonction barrière est altérée, on peut tester l'efficacité de certains produits ou traitements sur la restauration de celle-ci (47, 50, 69), comparer la capacité des différents appareils de mesure de la perte insensible en eau à détecter des perturbations de la barrière (13, 17)…

Cette liste des applications possibles n'est pas exhaustive et ne reflète qu'une partie de l'ensemble des travaux réalisés.

3. *METHODE DITE DE « TAPE STRIPPING »*

Nous allons nous intéresser plus précisément à la rupture mécanique de la barrière cutanée utilisant des morceaux de cellophane adhésive ou « strips ». Cette technique est appelée « tape stripping » par les anglophones.

a. Bref historique de la méthode

Les premières utilisations de morceaux de cellophane adhésive pour étudier la couche cornée remontent à 1940. Wolf montra qu'une couche de cellules cornées adhère sur la cellophane adhésive lorsqu'elle est appliquée sur la peau. Le morceau de cellophane pouvant ensuite être observé au microscope une fois collé sur une lame (53).

Un peu plus tard, entre 1951 et 1956, Pinkus reprend cette méthode tout en ayant l'idée de répéter les applications sur une même zone cutanée pour retirer la totalité du *stratum corneum*. Il peut, ainsi, estimer le nombre de couches de cornéocytes chez l'homme et obtenir des données quantitatives sur la régénération de l'épiderme humain (24, 53).

La procédure de «tape stripping» a ensuite été très largement utilisée notamment dans le cadre de recherches dans le domaine de la dermatologie.

En 2008, Shimada et son équipe ont utilisé la méthode de « tape stripping » chez le chien pour montrer que, à l'instar de ce qui se passe chez l'homme, l'application répétée de morceaux de cellophane adhésive altère la fonction barrière de la peau. Ceci a pu être

mis en évidence par le suivi de la pénétration d'un colorant fluorescent à travers la peau (62).

b. Description

La procédure consiste à presser un morceau de cellophane adhésive sur la peau puis à le retirer. Les couches superficielles du *stratum corneum* adhèrent à la cellophane adhésive et peuvent éventuellement être récupérées pour des recherches plus approfondies sur les kératinocytes ou la matrice lipidique extracellulaire (7).

L'application de l'adhésif doit être réalisée uniformément de manière à ce que la répartition du matériel retiré soit homogène sur le morceau de cellophane adhésive. Pour cela, le site choisi doit être le plus lisse et le plus régulier possible, les poils doivent être tondus précautionneusement et la peau ne doit pas avoir été préalablement lavée pour ne pas enlever les couches superficielles du *stratum corneum*. Différents types de cellophane adhésive peuvent être utilisés selon les objectifs et les contraintes de l'étude. L'important étant que la couche adhésive soit de composition et de distribution uniforme et que le film adhésif soit compatible avec la peau. Pour appliquer les morceaux toujours au même endroit, il est préférable de matérialiser les sites à l'aide d'un marqueur ou d'utiliser un pochoir dont l'ouverture correspond à la zone que l'on veut étudier. La pression exercée sur l'adhésif peut-être réalisée grâce à différents instruments (spatule, rouleau, poids constant ou même avec le pouce du manipulateur) et doit être reproductible. La vitesse de retrait doit être constante sous peine d'entrainer des variations au niveau de la répartition de ce qui va adhérer sur la cellophane (30).

C'est une technique simple et facile à mettre en œuvre mais il est nécessaire de bien standardiser la procédure pour en limiter la variabilité et éviter l'introduction de biais (34). Elle est, fréquemment, utilisée chez l'homme dans le domaine de la dermatologie, et ceci, depuis des décennies (7).

c. Applications

Les applications générales sont les mêmes que pour les autres méthodes d'altération de la barrière cutanée mais la possibilité d'étudier le matériel retiré par chaque morceau de cellophane adhésive élargit le champ d'application. En effet, il est envisageable d'étudier la quantité et la composition de la fraction de la couche cornée qui adhère sur chaque morceau. Il est, ainsi, possible de déterminer les profils d'absorption percutanée de diverses substances topiques puisque les adhésifs retiennent les cornéocytes et la quantité correspondante de la substance qui a pénétrée. Cette dernière étant évaluée par des méthodes d'analyse chimique classiques. Il faut, cependant, prendre garde de rapporter la quantité de la formulation détectée à la profondeur et non au nombre de morceaux d'adhésif utilisés puisque le nombre de cellules retirées à chaque manipulation varie, entre autres, avec la formulation.

Il est également possible d'étudier les lipides épidermiques en les récupérant à partir des « strips » (54).

C'est donc une méthode simple et efficace dans l'évaluation de la qualité et de l'efficacité de formulations cosmétiques et dermatologiques (3, 30).

d. Facteurs de variations

La rupture de la barrière cutanée par la méthode de «tape stripping» est soumise à l'influence de divers paramètres qu'il est nécessaire d'identifier afin de pouvoir mieux standardiser les protocoles pour qu'ils soient plus fiables et éviter, ainsi, dans la mesure du possible, l'introduction de biais qui pourraient s'ajouter aux variations dues aux propriétés intrinsèques de la couche cornée. Ces différents facteurs vont affecter le résultat de la rupture de la barrière, la régénération de la fonction barrière de l'épiderme et la quantité de *stratum corneum* retiré.

Selon les études, l'impact des différents facteurs de variation sur la rupture de la barrière est objectivé par des moyens variés. La détermination de la quantité de *stratum corneum* retirée peut être réalisée par la pesée (différence avant/après), par la quantification des protéines (grâce à la méthode de Bradford par exemple), par l'utilisation de la spectroscopie, de la microscopie (plus abordable en terme d'équipement nécessaire mais plus chronophage) et de la mesure de différents paramètres comme la perte insensible en eau, l'hydratation cutanée, le pH, la couleur de la peau...

La quantité de *stratum corneum* retirée par une seule application d'un adhésif dépend de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques (7, 30, 34).

i. Facteurs intrinsèques

Les différences de structure et de composition de la barrière cutanée vont être à l'origine d'une susceptibilité variable à la rupture mécanique. Les paramètres à prendre en compte sont le nombre de couches cellulaires, les cornéocytes et leur taille, l'épaisseur du *stratum corneum*, la composition et la quantité de lipides. Ils dépendent eux-mêmes de l'espèce, de la race, de la localisation anatomique, de l'âge et de la saison.

En effet, des différences ont été mises en évidence selon les sites anatomiques, dans les études réalisées chez l'homme et le chien, notamment. Notons, par exemple, que les zones exposées au soleil et, en particulier, celles riches en lipides comme le front chez l'homme sont plus sensibles aux effets du « tape stripping ».

En outre, la peau des individus âgés est plus facilement altérée par les moyens expérimentaux de rupture de la barrière cutanée. Parallèlement à cette observation, il est rapporté que, chez la souris âgée, la teneur en lipides de la couche cornée est diminuée d'environ 30% avec une matrice lipidique moins importante et une diminution de la sécrétion du contenu des corps lamellaires.

A noter que les paramètres cutanés tels que la perte insensible en eau et le pH vont aussi varier selon ces facteurs.

De plus, le processus de desquamation spontané est également soumis à variation. Cela entraine des différences de cohésion au sein de la couche cornée et, donc, une susceptibilité au «tape stripping» différente. Il faut, donc, bien noter que la peau ne

possède pas exactement les mêmes propriétés biomécaniques selon l'espèce, les régions du corps et les individus (3, 16, 20, 30).

ii. Facteurs extrinsèques

Les paramètres extrinsèques qui ont une influence sur les effets du «tape stripping», incluent la méthode d'application de l'adhésif qui peut se faire avec différents outils, la durée et la valeur de la pression exercée, l'adhésif lui-même et le lieu de l'application. Par exemple, plus le temps d'application est grand et plus la perte insensible en eau augmente pour un nombre de manipulations plus réduit. L'explication tiendrait au fait que l'adhésion aurait le temps de mieux se faire et la rupture serait donc plus efficace. L'effet d'une pression plus élevée serait le même. En outre, le type d'adhésif choisi expliquerait les différences d'affinité pour les composants de la couche cornée.

D'autres paramètres entrent en compte comme le fait de couvrir préalablement le site de test. Il faut également faire attention à l'influence que peuvent avoir les traitements topiques appliqués avant la réalisation des manipulations.

Enfin, notons que de moins en moins de cornéocytes adhèrent au fil des manipulations successives. Comme la fraction de la couche cornée retirée dépend, à la fois, de la force d'adhésion de la cellophane et de la force de cohésion du *stratum corneum* et que cette dernière augmente avec la profondeur alors que l'adhésif est normalement le même au cours d'une expérience donnée, la quantité enlevée diminue. Ainsi, la fraction retirée par un morceau de cellophane adhésive dépend de ce qui a été enlevé par le morceau précédent et donc des paramètres intrinsèques et extrinsèques (3, 30).

iii. Recommandations

Suite à une étude réalisée chez l'homme, Breternitz *et al.* ont proposé une standardisation de la procédure avec une application uniforme de deux secondes exercée à l'aide d'un tampon avec une pression constante de deux newtons pour obtenir une légère irritation du site. Cela conduit à une augmentation linéaire des valeurs de perte insensible en eau et de la quantité de protéines retirée.

La manière de retirer l'adhésif joue également un rôle et la vitesse de retrait doit, donc, être constante. En effet, la quantité de matériel retiré diminue parallèlement à l'augmentation de la vitesse de retrait. La peau étant plus étendue lors d'un retrait lent par rapport à un retrait rapide, les cornéodesmosomes subissent donc une plus grande contrainte à l'origine d'une rupture plus efficace du *stratum corneum*.

Certains auteurs préconisent l'utilisation d'un rouleau pour étirer la peau et ainsi éviter l'influence des sillons et rides cutanés. Pour la même raison, l'emploi d'un adhésif très flexible est conseillé. De plus, quelques conditions sont indispensables à l'obtention

de résultats les plus homogènes possibles : utilisation d'un adhésif adapté, sites lisses et réguliers, glabres ou tondus avec précaution et matérialisés (3, 7, 30, 34).

e. Quelques données

Plusieurs études ont été conduites, dans différentes espèces, dans le but de monter que la technique de « tape stripping » conduit au retrait du *stratum corneum* et à l'altération de la barrière.

Expérimentalement, il y a deux manières de procéder : soit on réalise une rupture en fixant un nombre d'applications successives de morceaux de cellophane adhésive, soit on se fixe la valeur de perte insensible en eau que l'on veut atteindre.

i. L'homme

De nombreuses recherches sur l'homme concluent que les applications répétées de morceaux de cellophane adhésive entrainent un retrait progressif de la couche cornée. Ceci s'accompagne d'une augmentation instantanée de la perte insensible en eau. Cette dernière se normalise au fil des heures tandis que la réparation épidermique se produit en parallèle.

Chez l'homme, un nombre de « strips » de 45 ± 8 est nécessaire pour retirer la totalité de la couche cornée sur les avant-bras. Cependant, cette valeur dépend de facteurs qui ont été énumérés précédemment (60).

ii. La souris

Pour l'espèce murine, on peut citer, en particulier, une étude très intéressante visant à créer un modèle fiable, de rupture et de réparation de la barrière cutanée, pour évaluer l'efficacité d'un traitement topique.

Ainsi, cinq degrés de rupture de la barrière ont été créés par « tape stripping ». Les valeurs de perte insensible en eau oscillaient entre 9 $g.m^{-2}.h^{-1}$ pour une peau intacte et 79 ± 6 $g.m^{-2}.h^{-1}$ pour une peau dont la couche cornée a été entièrement retirée tout en gardant intact le reste de l'épiderme (un minimum de huit applications successives de morceaux de cellophane adhésive c'est révélé nécessaire, dans ce cas, pour retirer la totalité du *stratum corneum* sur les flancs, en zone dorsale). Ceci ayant été confirmé par les coupes histologiques. Le nombre de « strips » était défini en fonction du niveau de rupture souhaité avec un contrôle par la mesure de la perte insensible en eau. Dans ce cas, le nombre de « strips » allait de quatre à douze (même lorsque la totalité de la couche cornée est retirée, le fait de réaliser des « strips » supplémentaires augmente le degré de rupture).

La restauration de la barrière a été suivie macroscopiquement, histologiquement (sur les coupes issues des biopsies) et par la mesure de la perte insensible en eau au cours du temps.

Les auteurs ont observé une apparence normale pour une rupture modérée, un aspect brillant de plus en plus marqué et une rougeur de plus en plus intense conjointement au degré de sévérité.

L'observation microscopique a permis de suivre l'épaisseur et de vérifier l'absence de cornéocytes puis leur réapparition.

Le pourcentage de récupération était défini par la formule suivante :

(1 – (perte insensible en eau à un instant donné – perte insensible en eau moyenne d'une peau saine) / (perte insensible en eau tout de suite après la rupture – perte insensible en eau moyenne d'une peau saine)) x 100%)

A part pour le degré d'atteinte le plus sévère, le pourcentage de récupération de la peau au bout de 72 heures était de 95%. Pour le modèle le plus sévère, une croûte s'est formée et il a fallu cinq jours pour atteindre approximativement 90% de récupération avec le développement de cicatrices.

Cette étude démontre bien l'utilité de la technique de « tape stripping » chez la souris pour obtenir des modèles fiables de rupture et de réparation de la barrière cutanée. De plus, elle met en évidence la possibilité de moduler cette rupture afin d'avoir des modèles de sévérité variable (50).

Observations rapportées lors de la phase de restauration

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence un épaississement de l'épiderme suite à différentes méthodes de rupture de la barrière cutanée, aiguë ou chronique. Cet épaississement résulte, en fait, d'une hyperplasie associée à une hyperprolifération des cellules basales de l'épiderme (augmentation de l'index mitotique) conduisant à une acanthose, une hypergranulose et une hyperkératose. L'épaississement est proportionnel à la sévérité de la rupture de la barrière cutanée et à la durée d'induction de cette rupture (cette durée pouvant être de plusieurs jours dans les modèles chroniques).

Suite à une rupture de la barrière, le derme va présenter une inflammation. C'est le siège d'un infiltrat de cellules inflammatoires, d'un œdème et d'une angiogenèse accrue amenant à une augmentation du nombre et de la taille des vaisseaux sanguins.

Quelque soit la méthode d'altération, on peut noter une infiltration par des lymphocytes alors que l'infiltration par des polynucléaires éosinophiles semble plutôt liée à une rupture mécanique par « tape stripping » et non à une altération chimique par l'acétone. Lors de rupture aiguë, quelle soit chimique (acétone) ou mécanique (« strips »), un accroissement du nombre de cellules de Langerhans au sein de l'épiderme est également observé, ainsi qu'une stimulation des réponses immunitaires par l'intermédiaire des lymphocytes T (10, 39, 43, 49).

iii. Le chien

Seules trois études ont employé la technique de « tape stripping » chez des chiens. Le tableau suivant dresse un récapitulatif de ces expérimentations.

Etude (année)	Race	Age	Conditions de vie	Réalisation expérimentale de la technique de « tape stripping »	Cellophane utilisée	Sites	Méthode utilisée pour confirmer l'altération de la barrière	Résultats obtenus et conclusion
(62) (2008)	8 croisés et 2 beagles	De 7 à 13 ans	Même nourriture et hébergement dans une pièce avec air conditionné	Tonte puis chaque site est divisé en 5 parties dont chacune subira 0, 5, 10, 15 ou 20 « strips »	Nichiban®	Région lombaire droite et gauche et inguinale	Mesure de la perte insensible en eau avec le TEWL analyzer® CC-01, étude de la pénétration de la fluorescéine sur les biopsies cutanées prélevées dans chaque partie de chaque site et observations histologiques	Corrélation positive entre l'importance de la perte insensible en eau et le nombre de « strips » réalisés. Le *stratum corneum* est entièrement retiré au bout de 15 « strips ». Donc la technique de « tape stripping » altère la barrière cutanée des chiens ce qui permet la pénétration de la fluorescéine dans la peau.
(47) (2010)	3 beagles et 3 croisés, tous sains	De 1 à 5 ans	Chiens de laboratoire	Tonte puis « tape stripping » jusqu'à atteindre une valeur de perte insensible en eau de 80-100 $g.m^{-2}.h^{-1}$	Non mentionné	Abdomen droit et gauche	Mesure de la perte insensible en eau avec le Tewameter® TM300	L'eau douce ultrapure améliore la restauration de la barrière cutanée altérée expérimentalement sur des chiens sains
(48) (2010)	10 croisés bichon maltais/ beagle[1]	De 3 à 11 ans	Chiens de laboratoire	<u>Etude préalable :</u> application d'une goutte de fluorescéine puis réalisation de 0, 5, 10 puis 15 « strips ». Tonte 2 jours avant la réalisation de 10 « strips » sur 5 chiens puis application d'un allergène	Non mentionné	Aisselle droite et aine	<u>Etude préalable :</u> observation de la coloration résiduelle.	<u>Etude préalable</u> : 10 « strips » suffisent à retirer la fluorescéine et donc le *stratum corneum*. La technique de « tape stripping » a permis de sensibiliser expérimentalement ces chiens à l'allergène étudié

[1] chiens présentant une dermatose prurigineuse que les auteurs utilisent comme modèle très approximatif de dermatite atopique

Tableau III : Récapitulatif des études ayant utilisé la méthode de « tape stripping » chez des chiens.

L'étude, réalisée par Shimada *et al.*, a permis de conclure que, à l'instar de ce qui se passe chez l'homme, l'utilisation de la technique de « tape stripping » permet la rupture de la barrière cutanée et l'altération de ses fonctions. Ceci a été objectivé par le passage d'un colorant fluorescent à travers la peau. Il existe donc une corrélation positive entre la perte insensible en eau et le nombre de « strips ». Parallèlement à cela, une quantité de plus en plus importante de colorant va pénétrer (62).

D'autres auteurs ont confirmé cette observation lors d'une expérimentation pilote. Ils ont utilisé la fluorescéine pour monter que la réalisation de la méthode de « tape stripping » sur la peau des chiens conduisait au retrait de la couche cornée. En effet, la fluorescéine préalablement appliquée n'était plus visible sauf au niveau des infundibulums folliculaires au bout de dix applications successives et la réalisation d'applications supplémentaires ne permettait pas de retirer plus de colorant. Cette conclusion est en accord avec les résultats de l'étude précédente dans laquelle la confirmation a été faite grâce à l'utilisation de l'histologie (48, 62).

Si on continue les applications de cellophane adhésive alors que toute la couche cornée a été retirée, les valeurs de perte insensible en eau continuent d'augmenter quelque soit l'espèce considérée (50, 62).

2EME PARTIE: ETUDE EXPERIMENTALE

I. INTRODUCTION

Jusqu'à présent, seules trois études se sont penchées sur la rupture de la barrière cutanée du chien par la méthode de « tape stripping ». De plus, aucune information n'est disponible sur le suivi de la restauration de la barrière cutanée dans l'espèce canine. Or, les applications cliniques qui pourraient en découler ne sont pas négligeables.

Ce travail se propose donc de remplir trois objectifs.

Le premier consiste à retirer mécaniquement le *stratum corneum* du chien par la méthode dite de « tape stripping » de manière à altérer la barrière cutanée, dont l'évaluation est faite cliniquement, histopathologiquement et par la mesure de la perte insensible en eau.

Le deuxième est de caractériser la réponse de la peau, suite à cette rupture de la barrière cutanée, et de suivre la restauration de celle-ci grâce aux valeurs de la perte insensible en eau et aux observations macroscopiques et microscopiques.

Le troisième et dernier objectif est d'évaluer la pertinence de la mesure de la perte insensible en eau, dans l'espèce canine, lors d'atteinte de la barrière cutanée, et de tester une éventuelle corrélation entre le statut de la barrière cutanée et la perte insensible en eau.

II. MATERIEL ET METHODE

1. ANIMAUX

Les manipulations ont été réalisées sur cinq beagles mâles, âgés de dix-huit mois. Ils ont fait l'objet d'un examen clinique avant leur introduction dans l'étude. Ce sont des chiens sains, ne présentant aucune lésion cutanée et n'ayant aucun antécédent dermatologique. Ils n'ont reçu aucun traitement, qu'il soit topique ou systémique, durant les trois mois précédant l'inclusion dans l'étude.

Pendant toute la durée de l'étude, les chiens étaient logés en box individuel au sein du centre de recherche de VetAgro Sup Campus vétérinaire de Lyon : l'Institut Claude Bourgelat. La température y est maintenue constante autour de 23 – 25°C avec une humidité relative entre 40 et 60%. Les cages sont nettoyées deux fois par jour. Une semaine d'acclimatation préalable au début de l'expérimentation a été respectée de manière à ce que les chiens puissent s'habituer à ces conditions environnementales.

Tous les chiens ont reçu une alimentation physiologique identique sous forme de croquettes pendant douze semaines avant le démarrage des tests. Ils avaient également libre accès à de l'eau à volonté.

Pendant toute la durée de l'étude, les chiens portaient un collier Elisabéthain de manière à empêcher tout léchage des sites de mesure qui aurait pu interférer avec les résultats.

Le protocole expérimental élaboré pour cette étude a été approuvé par le comité d'éthique de VetAgro Sup Campus vétérinaire de Lyon sous le numéro 0966.

2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le principe de cette étude est de réaliser une rupture aiguë et complète de la barrière cutanée grâce à l'utilisation de la méthode de « tape stripping » qui consiste en des applications répétées de morceaux de cellophane adhésive sur la peau à des endroits bien définis.

Pour chaque chien, la face latérale droite du thorax est tondue, à l'aide d'une tondeuse électrique, 24 heures avant le début de l'étude afin de minimiser l'impact d'une tonte récente sur les résultats. De plus, comme il a été préconisé dans des études précédentes, la tonte est réalisée avec précaution pour éviter d'induire des lésions cutanées qui interféreraient avec les résultats et, notamment, les valeurs de perte insensible en eau (46). Pour chaque chien, six sites de 4 cm^2 sont matérialisés à l'aide d'un feutre sur la face latérale droite du thorax. Le nombre de sites correspond au nombre de biopsies pratiquées, à raison d'une par site. Le choix de cette zone anatomique se justifie par le fait qu'elle représente une surface idéale pour une orientation horizontale de l'appareil utilisé pour évaluer la perte insensible en eau, qu'elle suscite peu d'intérêt de la part du chien pendant les mesures et qu'elle est moins susceptible d'être léchée. En outre, la surface étant relativement plane, elle permet un contact optimal avec la sonde de l'appareil de mesure et une réalisation plus facile des biopsies.

Des morceaux de cellophane adhésive (Transparent Tape Scotch®, 19 mm, 3M France), d'environ deux centimètres de long, sont découpés puis appliqués, sur la zone matérialisée au feutre, en veillant à ce que les morceaux soient toujours appliqués au même endroit. Une pression constante est exercée, manuellement, du bout des doigts, pendant dix secondes sur toute la surface du site. Ensuite, la cellophane adhésive est retirée d'un mouvement unidirectionnel, rapide et fluide, de façon à obtenir un retrait homogène des cornéocytes (34). Cette manœuvre est répétée trente fois par site en prenant un nouveau morceau de cellophane adhésive à chaque fois. C'est le même opérateur qui réalise la manipulation pour limiter les variations indésirables.

Figure 8 : Mise en place d'un morceau de cellophane adhésive.

3. *SUIVI DE LA RESTAURATION DE LA BARRIERE CUTANEE*

a. Examen dermatologique

Chaque site fait l'objet d'une observation macroscopique évaluant la couleur, la présence éventuelle de croûtes, d'une exsudation, d'une desquamation ou d'une inflammation. Cet examen est pratiqué avant l'exécution du « tape stripping », tout de suite après et 18, 24, 48 et 72 heures après la réalisation de l'altération de la barrière cutanée. A ces différents temps et pour chaque chien, des photographies sont prises afin de garder une trace de cette évaluation macroscopique et pouvoir comparer l'aspect des sites entre eux, en fonction du temps, une fois que toutes les manipulations sont achevées.

b. Examen histopathologique

Des biopsies cutanées sont réalisées une, 3, 18, 24, 48 et 72 heures après le « tape stripping ». Le choix des temps repose sur les résultats de différentes études, menées chez l'homme et la souris, et dans lesquelles a été instauré un suivi de la reconstruction de la barrière cutanée (16, 50). Chaque site est l'objet d'une biopsie. Cette dernière est effectuée sous anesthésie locale (0,5 mL de lidocaïne 2% injectée en sous-cutané dix minutes avant) avec l'aide d'un trépan à biopsie de 6 mm. Elles sont, ensuite, fixées dans une solution neutre tamponnée de formol à 10% avant leur inclusion dans la paraffine. Des coupes de quatre micromètres sont réalisées, de façon standard, puis colorées avec l'hémalun-éosine. Les lames sont observées au microscope photonique afin d'étudier la restauration de la barrière cutanée au cours du temps et les modifications histologiques qui l'accompagnent, comme une variation de l'épaisseur du stratum corneum, une hyperplasie de l'épiderme, une modification des différentes couches (hyper/hypogranulose…), une inflammation du derme, la présence de zones de nécrose, de congestion, d'œdème...

L'emploi de la coloration de Luna a permis de visualiser et de dénombrer les polynucléaires éosinophiles présents sur les coupes.

c. Immunohistochimie

Différents immunomarquages ont été effectués. Pour ce faire, des coupes sériées de quatre micromètres d'épaisseur sont déparaffinées dans des bains de xylène et rincées à l'alcool absolu. L'activité de la peroxydase endogène est inhibée avec 0,5% de peroxyde d'hydrogène dans du méthanol pendant dix minutes. Les anticorps employés sont les anticorps anti-Ki-67 (marquage des cellules engagées dans le cycle cellulaire), -Mac 387 (marquage des macrophages), -CD3 (marquage des lymphocytes T), -CD21, -BLA36, -CD79α (marquage des lymphocytes B) et -CD208/DC-LAMP (marquage des cellules dendritiques). Les coupes tissulaires destinées à l'immunomarquage par l'anticorps anti-Mac 387 ont été incubées à 37°C dans une solution de trypsine à 0,1% pendant vingt minutes. Pour limiter les marquages non spécifiques, les lames ont été plongées, pendant dix minutes, dans une solution saline de tampon Tris avec 20% de sérum de lapin avant le contact avec les anticorps primaires. Après avoir été rincées, les lames ont été incubées trente minutes avec les anticorps secondaires biotinylés puis, de

nouveau, mises en contact trente minutes avec des complexes avidine-peroxydase biotinylée. L'activité peroxydase est révélée par un bain de dix minutes dans une solution de diaminobenzidine. L'hématoxyline de Gill est utilisée pour contre-colorer les préparations microscopiques. Un contact de deux minutes est réalisé dans cette solution de coloration avant de rincer, déshydrater, clarifier et monter les lamelles sur les lames.

L'index Ki-67 est exprimé en pourcentage et permet de rendre compte de la multiplication cellulaire. Il est estimé par comptage des cellules marquées, parmi deux cents cellules basales présentes sur cinq champs pris au hasard, au fort grossissement (x400).

d. Mesures de la perte insensible en eau

La mesure de la perte insensible en eau a pu être réalisée grâce à un évaporimètre à chambre fermée, le VapoMeter® (Delfin Technologies Ltd, Kuopio, Finland) prêté par le laboratoire Royal Canin. Le choix d'un appareil à chambre fermée est d'autant plus pertinent que cet appareil n'est pas sensible aux flux d'air ambiants et qu'il est capable de prendre des mesures quelque soit son orientation (31). Ces deux paramètres sont importants à prendre en compte lorsque l'on travaille avec des animaux non tranquillisés comme c'est le cas ici. De plus, c'est un appareil portatif fonctionnant sur batteries. L'écran digital affiche les mesures de perte insensible en eau sous forme de valeurs ponctuelles en $g.m^{-2}.h^{-1}$. Après le contact avec la peau, l'appareil affiche la température et l'humidité relative dans la chambre de mesure. Son utilisation est simple et facile : sa mise en marche est réalisée en appuyant sur l'unique bouton et, lorsqu'il est prêt, il suffit de placer la sonde directement sur la peau, perpendiculairement à elle. La pression appliquée sur la peau doit être juste suffisante pour permettre un contact optimal avec la peau et éviter la fuite ou l'entrée d'air dans la chambre de mesure. La durée de la mesure est déterminée par l'appareil et un signal sonore retenti une fois la valeur affichée. Les valeurs sont enregistrées manuellement puis transférées ultérieurement dans un fichier Excel.

Les mesures se font sur animal vigile et préalablement acclimaté à la salle de mesure pendant quinze à vingt minutes. L'activité physique des chiens a été limitée pendant l'heure qui précède les mesures. La température et l'humidité sont maintenues stables dans la pièce (25°C +/- 1°C, humidité relative 45% +/- 8%). Les animaux sont immobilisés avec douceur, si besoin, afin qu'ils ne bougent pas pendant les mesures pour ne pas fausser les valeurs obtenues. Pour chaque chien, une série de trois mesures successives, par site, est réalisée. Une série de mesure est faite avant la réalisation de la rupture mécanique, pour chaque chien, de manière à avoir des valeurs de référence, juste après la rupture de la barrière cutanée (soit deux minutes environ après la dernière application d'un morceau de cellophane, le temps que la perte d'eau se stabilise) puis avant la réalisation de chacune des biopsies cutanées, soit 1, 3, 18, 24, 48 et 72 heures après le « tape stripping ».

Le pourcentage de réparation de la barrière est calculé selon la formule donnée page 65.

Figure 9 : Réalisation des mesures sur les chiens.

III. RESULTATS

1. *EVALUATION CLINIQUE*

Suite à la réalisation des trente « strips », la peau prend un aspect brillant et érythémateux. En outre, elle semble plus lisse qu'une peau intacte. L'apparente brillance de la peau n'est plus observée au bout de 18 heures d'évolution. Quelques petites croûtes apparaissent sur la peau 48 heures après la création de la rupture de la barrière cutanée. L'érythème et l'inflammation disparaissent progressivement au fil des observations successives. La peau retrouve une apparence normale au terme des 72 heures et les poils ont également commencé à repousser (Figure 10).

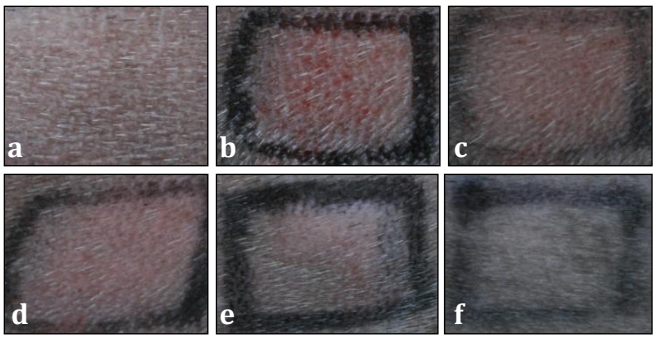

Figure 10 : Aspect macroscopique des sites : (a) peau saine tondue mais non altérée, (b) peau immédiatement après la rupture, (c) 18 heures, (d) 24 heures, (e) 48 heures et (f) 72 heures après la réalisation du « tape stripping ».

2. *OBSERVATIONS HISTOPATHOLOGIQUES*

La première chose à remarquer est que l'hypothèse selon laquelle la méthode de « tape stripping » permet de retirer le *stratum corneum* est vérifiée chez tous les chiens. En effet, la réalisation des trente applications successives de morceaux de Scotch® par site a bien abouti au retrait complet de la couche cornée comme nous avons pu le voir sur les coupes histologiques.

De plus, l'examen microscopique nous a permis de voir que l'épiderme sous-jacent était resté intact.

Si nous nous penchons sur le suivi de la restauration de l'épiderme, nous pouvons observer que la réponse est, globalement, la même malgré quelques variations individuelles (Figures 11 et 12).

Une heure après la rupture de la barrière, une inflammation du derme se met en place. L'intensité de cette inflammation augmente au cours du temps et s'accompagne du développement d'un œdème du derme de plus en plus marqué et d'une congestion des vaisseaux sanguins. En outre, une extravasation des érythrocytes issus des vaisseaux du derme s'installe progressivement.

Trois heures après la réalisation du « tape stripping », de petites zones multifocales (de 100 à 150 µm de long) d'épiderme nécrosé sont présentes.

Après 18 heures de restauration de la barrière, les lésions épidermiques sont plus étendues et plus marquées. Les zones de nécrose sont désormais recouvertes par de petites croûtes qui seront ensuite progressivement éliminées au bout de 48 heures.

Entre 18 et 24 heures après la rupture, l'intensité de l'inflammation est à son maximum puis décroît au fil du temps. Une évolution similaire est observée au sujet de l'infiltrat inflammatoire du derme.

Au bout de 24 heures, peu de différences sont visibles par rapport aux coupes issues des biopsies réalisées 18 heures après l'altération de la barrière. Selon les chiens, une acanthose commence à se développer alors que l'œdème et la congestion diminuent.

Au terme de 48 heures d'évolution, une acanthose nette est notée ainsi que la formation de petits bourgeons à la jonction dermo-épidermique. La couche cornée commence à faire sa réapparition de manière graduelle : une à deux couches de cornéocytes sont observées à cet instant. L'œdème et la congestion se sont résolus. Aucun signe d'inflammation aiguë n'est noté au-delà de 48 heures.

Une hyperplasie uniforme est présente après 72 heures de suivi. Cette hyperplasie peut être qualifiée de modérée à sévère. L'acanthose et les bourgeons sont toujours visibles et, dans la plupart des cas, le *stratum corneum* est entièrement restauré au terme des 72 heures. Le nombre de couches cellulaires varie de trois à plus de six.

Concernant l'infiltrat cellulaire, nous pouvons noter qu'il est assez diffus, une heure après le « tape stripping », et qu'il reste modéré à son paroxysme, avec une distribution périvasculaire à diffuse, et une extension du derme superficiel au derme moyen. Les polynucléaires éosinophiles représentent plus de 90% de l'infiltrat au début de son apparition. Ceci a pu être confirmé grâce à l'utilisation de la coloration de Luna.

Une fois le pic passé, l'infiltrat cellulaire décroît graduellement et se retrouve concentré essentiellement autour des vaisseaux du derme superficiel. 48 heures après la rupture mécanique, l'infiltrat cellulaire se compose d'un mélange de polynucléaires éosinophiles et de cellules mononucléées.

Finalement, au terme des 72 heures d'évolution, l'infiltrat cellulaire n'est plus très net et il se compose essentiellement de ces cellules mononucléées.

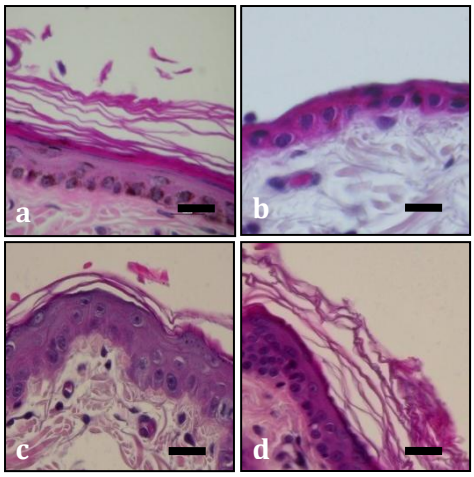

Figure 11 : Coupes histologiques, centrées sur l'épiderme, et obtenues à partir de biopsies réalisées (a) sur une peau normale, (b) une heure après le « tape stripping », (c) 48 heures et (d) 72 heures après la rupture mécanique. Noter l'absence de couche cornée après une heure puis sa réapparition progressive. Remarquer également l'hyperplasie de l'épiderme qui débute après 48 heures d'évolution.
L'échelle correspond à une distance de 20 µm.

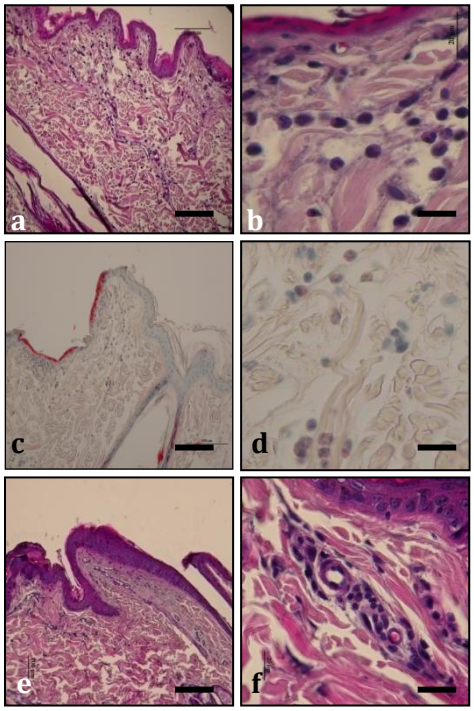

Figure 12 : Coupes histologiques, centrées sur le derme, et obtenues à partir de biopsies réalisées 18 heures après le « tape stripping » pour (a), (b), (c) et (d) et 48 heures après la rupture mécanique pour (e) et (f). Noter l'importance de l'infiltrat inflammatoire à 18 heures et la présence d'une grande majorité d'éosinophiles (confirmée par la coloration de Luna). Après 48 heures d'évolution, l'infiltrat est moins prononcé et composé essentiellement de cellules mononucléées.
(a), (b), (e) et (f) ont été colorées à l'hémalun-éosine et (c) et (d) par la coloration de Luna.
L'échelle correspond à une distance de 20 µm pour (b), (d) et (f) et de 100 µm pour (a), (c) et (e).

Si nous résumons l'évolution de la phase inflammatoire au cours du temps, nous pouvons dire qu'elle débute avec un œdème du derme, une congestion et une extravasation des globules rouges. L'inflammation atteint, rapidement, un pic en 18 à 24 heures et un infiltrat inflammatoire moyennement dense, périvasculaire à diffus et composé d'une majorité de polynucléaires éosinophiles se met en place. La réponse inflammatoire diminue progressivement au cours du rétablissement de la barrière et un changement concomitant de la nature et de la localisation de l'infiltrat se produit. Ce dernier devient alors plus discret et ce sont les cellules mononucléées qui deviennent prédominantes avec une distribution essentiellement périvasculaire.

3. *RESULTATS IMMUNOHISTOCHIMIQUES*

a. Etude de la prolifération cellulaire

L'index Ki-67, calculé grâce au dénombrement des cellules marquées, parmi deux cents cellules basales, présentes sur cinq champs pris au hasard au fort grossissement (x400), est resté stable jusqu'à 48 heures après le « tape stripping ». Il était alors proche de l'index observé dans une peau normale et variait de 5 à 15%.

48 heures après l'altération de la barrière, l'index Ki-67 a brusquement augmenté jusqu'à atteindre des valeurs allant de 70 à 90%. La majorité des cellules basales étaient, donc, en cours de multiplication (Figure 13).

Une décroissance marquée de cet index est visible après 72 heures. Il retombe alors à des pourcentages de 20 à 30%.

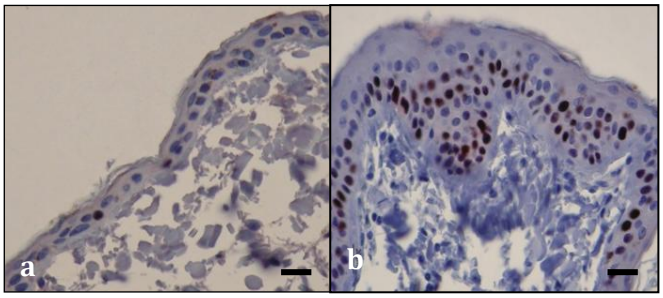

Figure 13 : Immunomarquage à l'aide de l'anticorps anti-Ki-67 sur la peau biopsiée (a) une heure et (b) 48 heures après le « tape stripping ».
La majorité des cellules basales et suprabasales sont en cours de prolifération à 48 heures.
L'échelle correspond à une distance de 50 µm.

b. Etude de l'infiltrat inflammatoire

Seuls les immunomarquages réalisés avec les anticorps anti-Mac 387 et anti-BLA 36 se sont révélés informatifs. En effet, aucune coloration significative n'a été observée sur les différentes coupes lorsque les anticorps contre DC-LAMP, CD3, CD21 et CD79α ont été utilisés.

L'immunohistochimie a donc permis de montrer que l'infiltrat dermique est composé de quelques cellules positives au marquage par l'anticorps anti-Mac 387 qui rend possible le repérage des histiocytes/macrophages et d'une majorité de cellules marquées par l'anticorps anti-BLA 36. Ces cellules possèdent une morphologie proche de celle des cellules dendritiques. Quelques cellules positives sont déjà observées une heure après le « tape stripping » mais leur nombre n'est significatif qu'entre 18 et 48 heures après la rupture (Figure 14).

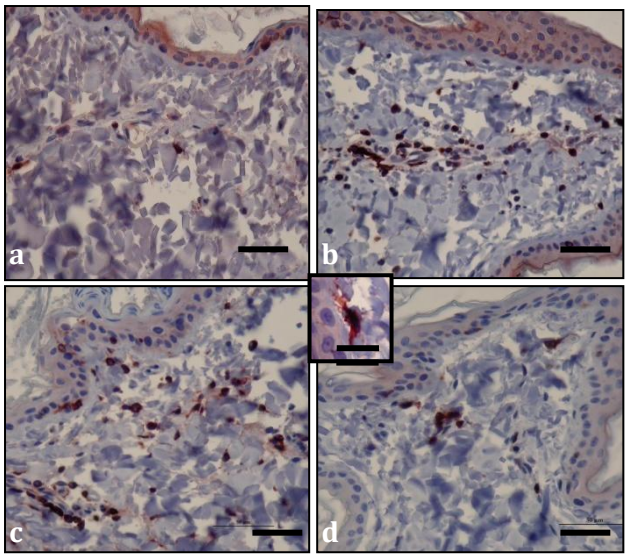

Figure 14 : Immunomarquage à l'aide de l'anticorps anti-BLA 36 sur la peau biopsiée (a) une heure, (b) 18 heures, (c) 48 heures et (d) 72 heures après le « tape stripping ».
Les cellules marquées par l'anticorps anti-BLA 36 apparaissent 18 heures après la rupture et leur nombre augmente jusqu'à 48 heures. Ces cellules possèdent une morphologie dendritique et sont principalement localisées en périvasculaire.
L'échelle correspond à une distance de 50 µm sauf pour l'agrandissement de (d) où l'échelle correspond à 2 µm.

4. *Mesures de la perte insensible en eau*

Toutes les valeurs brutes obtenues sont regroupées dans le tableau en annexe. Elles sont également accompagnées de leurs moyennes, des différents paramètres de dispersion qui les caractérisent et du pourcentage de récupération de la barrière cutanée pour chaque temps et chaque individu.

Le tableau ci-dessous récapitule les moyennes et écarts types des mesures de perte insensible en eau (en $g.m^{-2}.h^{-1}$) calculés pour chaque chien et à chaque instant.

	Chien A	Chien B	Chien C	Chien D	Chien E
Mesures avant rupture					
Moyenne	12,80	12,50	16,83	11,77	12,00
Ecart type	1,85	1,79	1,02	0,37	3,80
Mesures immédiatement après la rupture (T0)					
Moyenne	104,50	96,87	95,43	115,50	102,67
Ecart type	7,45	4,38	4,83	1,22	7,32
Mesures 1h après la rupture (T+1)					
Moyenne	105,33	69,77	88,03	106,80	139,33
Ecart type	0,94	1,88	1,42	9,69	11,12
Mesures 3h après la rupture (T+3)					
Moyenne	103,00	59,43	142,67	82,63	89,60
Ecart type	7,12	4,58	5,25	7,63	5,89
Mesures 18h après la rupture (T+18)					
Moyenne	125,67	49,83	153,00	170,67	126,00
Ecart type	4,19	0,98	3,56	2,05	3,56
Mesures 24h après la rupture (T+24)					
Moyenne	90,07	45,40	144,87	151,00	38,30
Ecart type	6,54	0,85	3,89	8,49	4,22

Mesures 48h après la rupture (T+48)					
Moyenne	15,37	27,83	119,33	113,67	21,67
Ecart type	1,72	1,93	7,41	4,78	2,30
Mesures 72h après la rupture (T+72)					
Moyenne	20,67	21,07	83,37	77,17	18,40
Ecart type	1,52	0,47	3,20	5,95	2,17

Tableau IV : Moyennes et écarts types des mesures de la perte insensible en eau en $g.m^{-2}.h^{-1}$.

Ainsi, les valeurs de perte insensible en eau sont assez homogènes entre les différents chiens avant la réalisation de la rupture de la barrière cutanée. Ceci est également visible sur la figure. En effet, les moyennes varient de 11,77 à 16,83 $g.m^{-2}.h^{-1}$ avec un écart type oscillant entre 0,37 et 3,8 $g.m^{-2}.h^{-1}$, ce qui montre la faible variation des mesures pour un même chien à l'instant T. De plus, nous pouvons noter que le chien C présente des valeurs un peu plus élevées que les autres chiens et si nous exceptons cet individu, les valeurs sont encore plus homogènes puisqu'elles se situent alors entre 11,77 et 12,8 $g.m^{-2}.h^{-1}$.

La technique de « tape stripping » conduit à une augmentation de la perte insensible en eau avec des valeurs moyennes allant de 95,43 à 115,5 $g.m^{-2}.h^{-1}$ selon les chiens lorsque les mesures sont effectuées immédiatement après la réalisation de la rupture de la barrière cutanée (Figures 15 et 16).

Ensuite, nous observons des différences dans l'évolution des valeurs de perte insensible en eau selon les chiens (Figure 16). Il est donc difficile de regrouper les données de tous les chiens pour fournir un schéma typique de la restauration de la barrière cutanée dans l'espèce canine.

Seul le chien B n'a présenté qu'un seul pic de perte insensible en eau avant de voir un retour progressif à des valeurs proches de celles de référence au terme de 72 heures d'évolution. Les autres chiens ont vu leurs valeurs augmenter puis stagner ou légèrement diminuer avant de remonter pour atteindre un pic 18 heures après la rupture. Ensuite, une diminution des valeurs est observée chez tous les individus mais selon deux types de décroissance : une que l'on pourrait qualifier de rapide puisque 48 heures après l'altération de la barrière, le pourcentage de récupération se situe déjà au-delà de 80% pour les chiens A, B et E et une plus lente puisque le pourcentage de récupération à 72 heures atteint seulement des pourcentages allant de 15 à 37% pour les chiens C et D (figure 17).

Pour un même sujet, à un temps donné, les mesures obtenues entre T0 et T+48 présentent un écart type (et donc une variance) un peu plus important que celles prises avant rupture ou à T+72.

Pour tous les chiens, une différence statistiquement significative est démontrée entre les valeurs de perte insensible en eau de la peau normale et les valeurs mesurées immédiatement, une heure, trois heures, dix-huit heures et vingt-quatre heures après la mise en œuvre de la technique de « tape stripping » (avec le test de Student et $p \leq 0,05$).

Au terme des 72 heures de suivi, la perte insensible en eau reste encore un peu élevée pour les chiens C et D (la perte insensible en eau étant respectivement de 83,37 et

77,17 g.m^{-2}.h^{-1}). Quant aux chiens A, B et E, les valeurs sont proches de celles mesurées avant la rupture (entre 18,4 et 21,07 g.m^{-2}.h^{-1}) et les écarts types sont de nouveau plus faibles (entre 0,47 et 2,17 g.m^{-2}.h^{-1}). Pour ces individus, aucune différence statistiquement significative n'est mise en évidence entre les valeurs de la peau normale et celle de la peau à T+72.

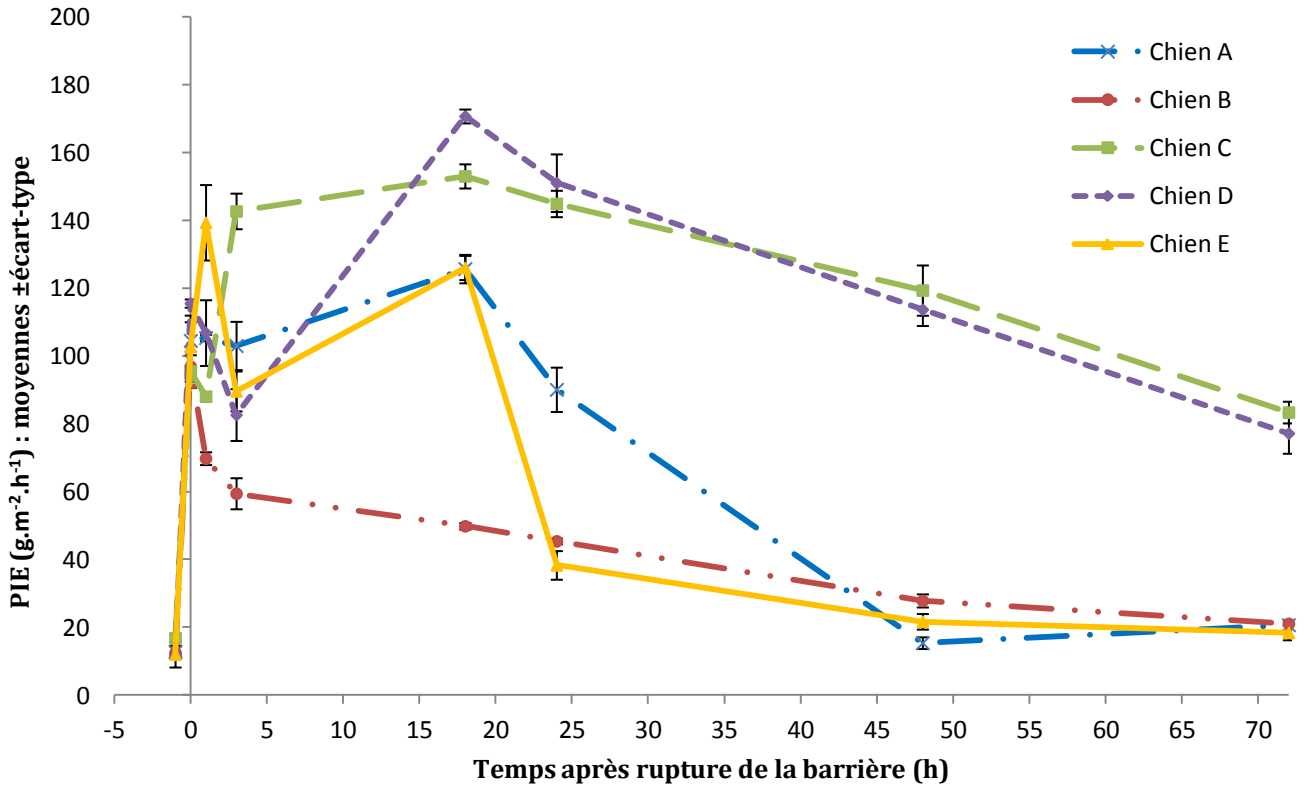

Figure 15 : Evolution des valeurs moyennes de perte insensible en eau (g.m^{-2}.h^{-1}).

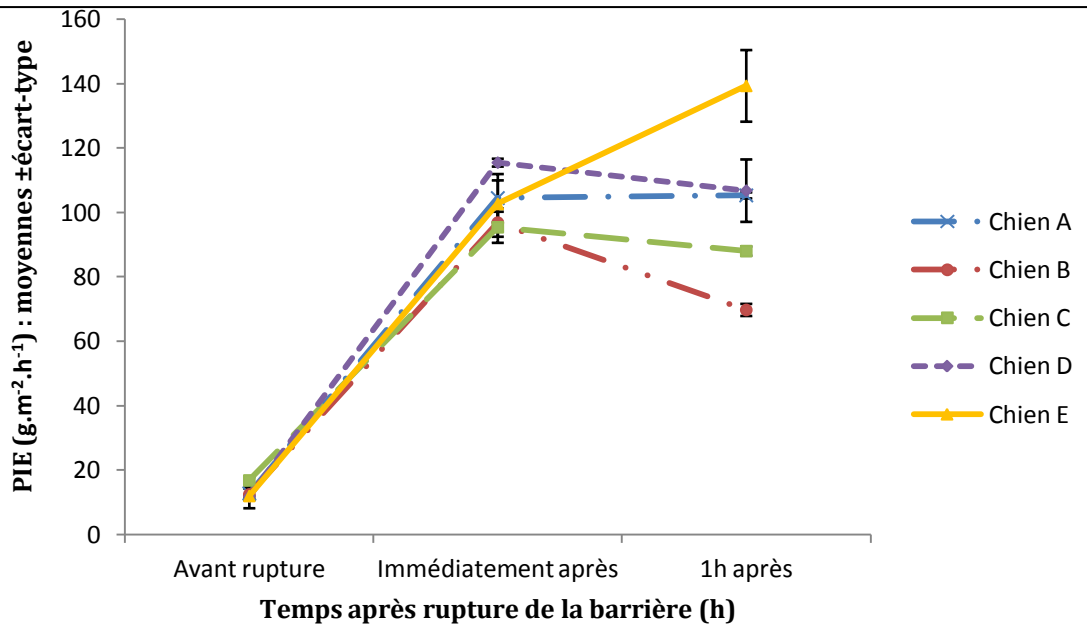

Figure 16 : Agrandissement du début du suivi des valeurs moyennes de perte insensible en eau ($g.m^{-2}.h^{-1}$).

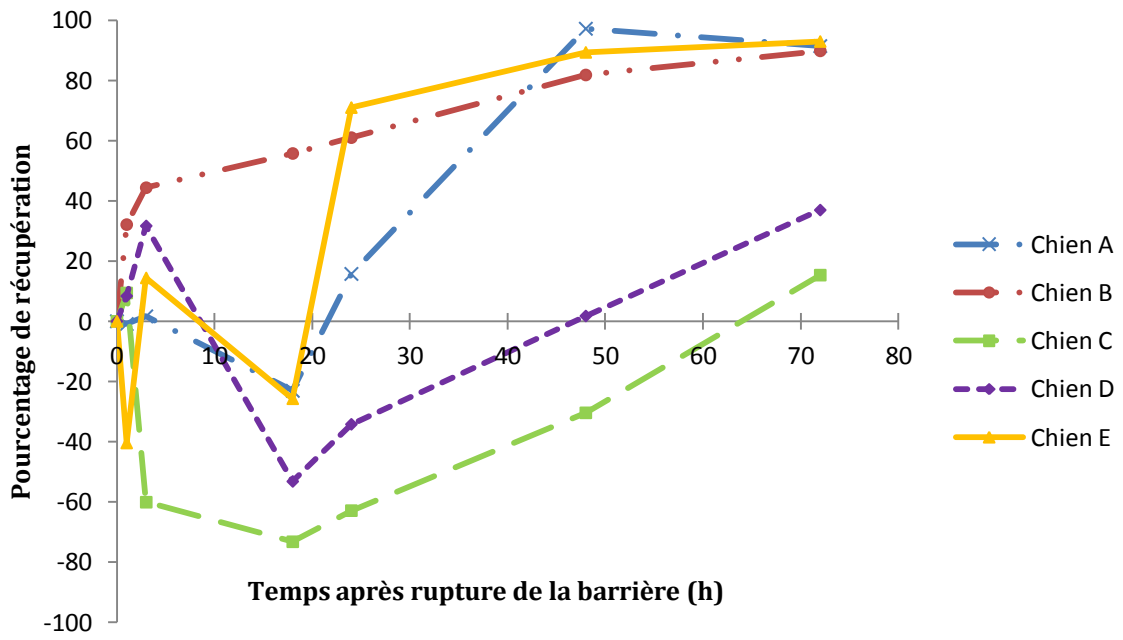

Figure 17 : Evolution du pourcentage de récupération en fonction du temps pour chaque chien.

IV. DISCUSSION

1. *RUPTURE DE LA BARRIERE CUTANEE*

Ce travail a permis de montrer que la réalisation de trente « strips » conduisait au retrait complet de la couche cornée avec une altération marquée de la barrière cutanée tout en gardant apparemment intactes les couches épidermiques sous-jacentes.

Cependant, deux études précédentes menées sur des chiens ont conclu que dix à quinze « strips » étaient suffisantes pour retirer la totalité du *stratum corneum*.

Compte-tenu des facteurs de variations impliqués dans la création d'une altération de la barrière cutanée et exposés dans la première partie de cette thèse, cette différence peut s'expliquer par le fait que la cellophane adhésive n'est pas la même et que donc la force d'adhésion qui lui est propre est différente. Le protocole exact de mise en œuvre de la technique de « tape stripping » va également influencer le résultat. La pression exercée, sa durée, la méthode employée et la façon dont a été réalisé le retrait sont autant de variables susceptibles d'influencer la quantité de cornéocytes retirés par un morceau de cellophane adhésive.

De plus, les zones anatomiques ayant fait l'objet de ces différentes manipulations ne sont pas les mêmes selon les auteurs. Dans notre cas, la zone d'intérêt est la face latérale du thorax alors que pour les autres expériences, ce sont les régions lombaires, inguinales et les aisselles qui ont subi l'altération mécanique. Or, nous avons vu plus haut que les propriétés du *stratum corneum* varient selon les régions anatomiques et que, par conséquent, leur sensibilité à la rupture mécanique est différente.

En outre, Olivry et son équipe ont basé leur conclusion sur la pénétration d'une substance fluorescente et non sur des observations histologiques comme dans l'étude dirigée par Shimada et celle présentée ici (48, 62).

Chez l'homme, Bashir *et al*. ont démontré une variabilité individuelle. Selon les sujets, la rupture de la barrière n'était pas la même pour un nombre identique de « strips » faits à l'aide d'un même type de cellophane adhésive (3).

Toutefois, ce travail montre bien que, à l'instar des études déjà menées chez l'homme, la souris et le chien, la technique de « tape stripping » est efficace pour créer une rupture mécanique de la barrière cutanée et qu'elle permet le retrait de cornéocytes tout en préservant les couches vivantes de l'épiderme.

2. *EXAMENS CLINIQUES*

Les observations macroscopiques réalisées sont cohérentes avec celles obtenues chez l'homme et la souris. Au fur et à mesure du retrait des cornéocytes, la peau apparaît de plus en plus brillante et érythémateuse tandis que le degré de sévérité de la rupture augmente (50, 53). De plus, il a été montré que de petites croûtes se formaient lors d'altérations importantes ou répétées (39, 50).

Cet aspect brillant semble lié à la perte d'eau induite par la rupture et l'érythème au processus inflammatoire résultant de l'altération et des modifications

homéostatiques qui en découlent. Ces phénomènes sont communs aux espèces ayant fait l'objet de telles études.

3. *Observations histologiques et immunohistochimiques*

a. Rétablissement de la couche cornée

Le rétablissement du *stratum corneum* se produit relativement rapidement. En effet, la réapparition d'une partie de la couche cornée se produit en 48 heures et le *stratum corneum* semblait s'être totalement reconstitué au terme des 72 heures.

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus chez des souris. En effet, au bout de 72 heures, la restauration complète de la couche cornée est généralement observée à condition que la rupture engendrée mécaniquement n'ait pas atteint un degré trop sévère (50).

Chez l'homme, peu de résultats sont disponibles étant donné que les suivis histopathologiques sont très rares.

b. Multiplication cellulaire

Nous avons également montré et confirmé, par le biais du calcul de l'index de prolifération Ki-67, que la rupture de la barrière avait entrainé une stimulation de l'activité proliférative des cellules basales de l'épiderme.

Dans cette étude, nous avons pu voir que l'index Ki-67 était à son maximum 48 heures après la réalisation du «tape stripping ». Des observations similaires ont été faites chez l'homme et la souris. Pinkus rapporte une augmentation de l'index mitotique 24 et 48 heures après la réalisation d'une altération mécanique de la peau humaine (l'index étant beaucoup plus élevé à 48 heures) (53). La stimulation intense de la prolifération des cellules épidermiques résulterait des effets des cytokines (55).

Soixante-douze heures après la mise en œuvre de la rupture et, en l'absence de manipulations supplémentaires, l'index de prolifération cellulaire retourne à des valeurs proches de celles d'une peau normale.

Proksch et son équipe ont démontré une augmentation de la synthèse d'ADN au sein de l'épiderme, plusieurs heures après altération de la fonction barrière, dans différents modèles de rupture, aiguë et chronique, chez des souris. Pour les auteurs, cette réponse hyperplasique pourrait représenter un mécanisme tardif permettant d'augmenter le pool de kératinocytes nécessaires à la réalisation des étapes finales de la réparation de la barrière. De plus, ces cellules supplémentaires pourraient également représenter une source additionnelle pour la synthèse des lipides nécessaires au rétablissement de la barrière (55).

c. Réponse inflammatoire

Ce travail a permis de souligner le développement précoce d'un phénomène inflammatoire suite au retrait total du *stratum corneum* par la technique de « tape stripping ».

Cette réponse inflammatoire, déclenchée par la rupture de la barrière cutanée, est caractérisée par un œdème et une congestion des vaisseaux mais, surtout, par un infiltrat inflammatoire. Au début de la réponse, ce dernier est principalement composé de polynucléaires éosinophiles. En effet, la coloration de Luna a permis de confirmer que plus de 90% des cellules composant l'infiltrat sont des polynucléaires éosinophiles.

Ce résultat est similaire à celui obtenu, avec un modèle de rupture de la barrière, chez des souris. Il a permis de démontrer que les polynucléaires éosinophiles sont les principales cellules impliquées dans la réponse à la rupture mécanique par « tape stripping ». Cependant, ceci n'est pas vrai lorsque l'altération de la barrière est réalisée de manière chimique par l'acétone. En outre, ce phénomène se produit sur une peau sans antécédent dermatologique et hors de tout contexte allergique ou parasitaire (49). Très récemment, Oyoshi *et al*. ont montré, chez des souris, que la technique de « tape stripping » agissait sur les cellules dendritiques de la peau de manière à engendrer une réponse immunitaire de type Th2 à l'origine de l'infiltration massive du derme par des polynucléaires éosinophiles (51). Ainsi, à l'instar des études réalisées chez la souris, il serait intéressant d'étudier les taux d'expression des ARNm des diverses cytokines représentatives des réponses de type Th1 et Th2 après « tape stripping » grâce à l'utilisation de la PCR quantitative en temps réel. Ces résultats seraient à mettre en relation avec ceux obtenus dans l'espèce murine et ce que nous avons observé chez le chien et permettraient, ainsi, de confirmer la surexpression des cytokines Th2 chez le chien.

Au cours de l'évolution de la réponse à la rupture, les polynucléaires éosinophiles, qui constituent l'infiltrat inflammatoire, sont peu, à peu remplacés par des cellules mononucléées. Quelques-unes sont marquées par l'anticorps anti-MAC 387. Ce sont, probablement, des histiocytes/macrophages du fait de leur morphologie et du marquage par l'anticorps anti-MAC 387 qui met en évidence ce type de cellule. Ces cellules sont éparpillées de manière homogène au sein du derme superficiel.

Elles sont beaucoup moins nombreuses que les autres cellules mononucléées marquées par l'anticorps anti-BLA 36. BLA 36 est une glycoprotéine de la membrane plasmique qui est, normalement, exprimée par les lymphocytes B chez l'homme et l'animal. Or, dans notre cas, les cellules marquées par l'anticorps anti-BLA 36 possèdent une morphologie dendritique et ne sont pas marquées par les autres anticorps spécifiques des lymphocytes B : CD21 et CD79α. Toutefois, il faut noter que certains auteurs rapportent que ce marqueur semble également se fixer sur les cellules dendritiques (29, 42). Malheureusement, nous n'avons pu confirmer l'origine dendritique de ces cellules car la coloration à l'aide des anticorps contre les protéines membranaires associées aux cellules dendritiques (DC-LAMP) ne s'est pas révélée informative. Il faut, tout de même, remarquer que ce marqueur est présent sur les cellules dendritiques matures mais pas sur les formes immatures comme les cellules de Langerhans (71).

4. *LA PERTE INSENSIBLE EN EAU*

a. Application à l'espèce canine et choix d'un appareil

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce travail, la mesure de la perte insensible en eau est très largement utilisée chez l'homme pour évaluer le statut de la barrière imperméable de manière fiable, non invasive et reproductible si l'on tient compte des facteurs de variation (18, 19).

Concernant les animaux, l'étude de la perte insensible en eau a été réalisée dans plusieurs expérimentations impliquant souvent des souris. Chez les chiens, les données sont rares comparativement à celles obtenues en médecine humaine. De plus, dans une étude visant à valider la technique d'évaluation de la perte d'eau insensible dans l'espèce canine, Beco et Fontaine ont conclu que la technique de mesure ne paraissait pas suffisamment reproductible pour être utilisée chez le chien (4). Cependant, les expériences ultérieures, conduites avec des conditions plus strictes, répondant aux recommandations établies pour mesurer la perte d'eau, et, pour une étude, avec des chiens entrainés à rester immobiles permettaient d'obtenir des résultats plus fiables (2, 23, 67).

Un réel progrès a été réalisé avec l'arrivée d'appareils à chambre de mesure fermée. En effet, jusqu'à présent les mesures se faisaient à l'aide d'appareils possédant une sonde ouverte des deux côtés. Les inconvénients de ce type d'appareils sont leur sensibilité aux flux d'air ambiants et à une humidité anormalement élevée en périphérie de la sonde, la durée relativement importante des mesures (par exemple, avec le Tewameter®, une stabilité imparfaite de la mesure est observée après 90 à 120 secondes (4)), l'encombrement de l'appareil et de sa sonde et, enfin, le fait que les mesures ne peuvent se faire qu'avec une certaine orientation de la sonde.

Pour une utilisation sur des chiens, les deux principaux obstacles sont les turbulences induites par les mouvements de l'animal et l'humidité adsorbée par les poils résiduels, même après la tonte du site de mesure. Cette humidité est détectée par les capteurs d'humidité et est donc susceptible d'entrainer des variations au niveau des valeurs mesurées. Le problème dû aux mouvements des chiens peut être limité par un entrainement de ceux-ci à rester tranquilles même si, selon les études, certains auteurs ne mettent pas en évidence de différence concernant la variabilité des résultats (23, 67). La sédation des chiens n'est pas souhaitable, malgré les avantages qu'elle pourrait apporter, car elle peut entrainer une modification de la physiologie cutanée. Il a été démontré qu'une tranquillisation à la médétomidine réduit la perfusion cutanée de 70 à 90% chez le chien (2).

En 2007, Yoshihara *et al*. ont comparé, pour la première fois chez le chien, ces deux types d'appareils. Les auteurs ont conclu que l'appareil de mesure à chambre fermée était plus fiable, que les méthodes conventionnelles, pour évaluer le statut de la fonction barrière (70). Depuis, la mesure de la perte insensible en eau est effectuée avec des appareils à chambre fermé chez le chien (31, 46, 62). Ceci a permis d'obtenir des résultats plus fiables, avec une moins grande variabilité, que ceux obtenus à l'aide des appareils à chambre ouverte dans l'espèce canine. En effet, les appareils à chambre fermée, d'apparition plus récente, sont beaucoup moins affectés par les conditions environnementales et sont plus simples d'utilisation (52).

b. Variabilité et reproductibilité des mesures

Des études ont été menées, pour évaluer la perte insensible en eau, chez des chiens atopiques, ou présentant un prurit, mais peu se sont penchées sur les variations liées à la mesure de la perte insensible en eau sur une peau saine (31, 46, 47, 61, 67). Un travail récent a mis en évidence une différence en fonction de l'origine des chiens qui appartenaient à différents propriétaires. Une variation a aussi été révélée selon les sites anatomiques (31). C'est pourquoi, il nous a semblé important de procéder à nos manipulations sur un groupe homogène d'individus et sur des sites identiques.

Si nous nous attardons sur les paramètres de dispersion, calculés à partir des valeurs acquises dans cette étude, et que nous les comparons à ceux obtenus dans les autres études réalisées sur des chiens, nous remarquons une bonne reproductibilité de nos trois mesures successives pour un même site et sur un même chien. En effet, l'écart type (ou Standard Deviation = SD) se situe entre 0,37 et 3,8 $g.m^{-2}.h^{-1}$ avec un écart type moyen pour l'ensemble des chiens de 1,76 $g.m^{-2}.h^{-1}$ (soit une variance moyenne de 4,44 $g^2.m^{-4}.h^{-2}$) pour les mesures réalisées avant la rupture. Ces valeurs sont meilleures que celles obtenues par Watson et son équipe pour lesquelles la variance moyenne du groupe des chiens entrainés était de 17,66 $g^2.m^{-4}.h^{-2}$ (67). Remarquons que les tests ont été faits sur des chiens d'expérimentation dociles et ayant l'habitude d'être manipulés. La conclusion est la même lorsque nous nous intéressons aux autres études en remarquant, toutefois, que, comme ces études portent sur une peau saine, la comparaison est faite avec les mesures avant rupture (23, 31, 46). Seules les valeurs relevées par Yoshihara et al. avec le TEWL analyzer CC-01 montrent une plus faible variabilité sur une peau normale (70). Cependant, avec ce même appareil et sur une peau altérée mécaniquement par « tape stripping », la variabilité des mesures est plus faible dans notre cas (62).

Lorsque des mesures répétées d'un paramètre biologique sont effectuées, le coefficient de variation peut être utilisé pour en évaluer la reproductibilité. Avec un paramètre tel que la perte insensible en eau, des fluctuations biologiques sont attendues et conduisent inévitablement à des coefficients de variation élevés lorsque les manipulations sont répétées. Pour Lau-Gillard *et al.*, un coefficient de variation moyen, compris entre 20 et 35%, semble acceptable selon l'individu et le site de mesure (31). Dans ce travail, les coefficients de variation oscillent entre 0,9% et 31,65% selon les chiens et les temps auxquels les mesures sont réalisées avec une très grande majorité de coefficients de variation inférieurs à 10% ce qui est très bien au regard de ce qui a été dit précédemment.

Nous pouvons, également, noter que la variabilité des mesures est un peu plus élevée sur une peau altérée et, notamment, en début de suivi, lors des trois premières heures après le « tape stripping ». Cela semble lié au fait que les valeurs de perte insensible en eau sont plus grandes, peut-être parce que la chambre de mesure se trouve plus vite saturée en vapeur d'eau, ce qui influe sur la fiabilité des mesures.

Le VapoMeter nous a donc permis de mesurer la perte insensible en eau avec une bonne reproductibilité sur un groupe de chiens, de même race, de même âge, hébergés dans les mêmes conditions et nourris avec des croquettes identiques.

c. Evolution de la perte insensible en eau au cours de la restauration

Les valeurs de perte insensible en eau, mesurées immédiatement après le « tape stripping », sont significativement plus élevées que celles mesurées avant. Il existe, donc, bien un lien entre le statut de la fonction barrière et la perte insensible en eau. Ces résultats sont cohérents avec ceux déjà obtenus chez l'homme, la souris et le chien (17, 62).

Ensuite, pendant la phase de récupération, des évolutions très différentes ont été observées.

Dans la plupart des cas, les valeurs de perte insensible en eau diminuent un peu avant de remonter jusqu'à atteindre un pic à 18 heures. Ceci pourrait être dû à une utilisation trop importante de lipides servant à la reconstitution de la barrière par rapport aux réserves et aux capacités du métabolisme lipidique. En effet, il a été montré, sur des souris, qu'une rupture de la barrière s'accompagnait d'une sécrétion rapide des corps lamellaires dans les espaces intercellulaires du *stratum corneum*. L'augmentation de la synthèse lipidique qui s'en suit contribue à la restauration complète de la barrière (40). La phase de latence avant la réapparition des lipides nouvellement synthétisés pourrait, donc, expliquer le pic observé à 18 heures.

Seul le chien B voit ses valeurs diminuer tout au long du suivi. Comme les chiens A, C, D et E présentent un pic à 18 heures, avec des valeurs plus élevées que celles relevées immédiatement après la rupture, il est normal que nous obtenions des pourcentages de récupération négatifs à certains temps et notamment 18 heures après la rupture. Seuls les chiens B et E ont un pourcentage de récupération supérieur à 50% au bout de 24 heures. Les chiens C et D présentent une courbe différente, avec une cinétique de récupération plus lente, puisqu'au terme des 72 heures, leur pourcentage de récupération est entre 15 et 37% environ. Le chien A voit sa courbe tendre vers celle des chiens B et E après 48 heures (figure 17).

Il semble, donc, y avoir deux schémas de récupération différents caractérisés par une vitesse d'évolution plus ou moins rapide. Cette variation, au niveau de la phase de récupération, serait probablement due à une variabilité dans la réponse inflammatoire, selon les chiens, au cours du rétablissement de la barrière. Un nombre de chiens plus important nous aurait, peut-être, permis de tirer des conclusions plus précises.

A noter, également, que, pour le chien D, l'examen des coupes, issues de la biopsie réalisée 72 heures après la rupture, a révélé une ré-aggravation des signes d'inflammation comme si une deuxième phase inflammatoire se mettait en place. Cette observation va dans le sens de ce qui vient d'être dit juste avant. Cependant, nous ne pouvons exclure la possibilité d'un léchage des sites qui aurait maintenu l'inflammation (objectivable lors de l'examen histopathologique) et empêché un retour de la perte insensible en eau vers des valeurs basales. Autre élément remarquable, l'étude montre bien le lien entre ce que nous avons pu observer au microscope et les valeurs de perte insensible en eau.

Si l'on s'intéresse aux pourcentages moyens de récupération à chaque temps (figure 18), en prenant en compte les cinq chiens, nous pouvons remarquer que ces pourcentages tendent à augmenter en fonction du temps, si l'on excepte la valeur obtenue à 18 heures. Comme nous l'avons souligné précédemment, les mesures obtenues chez le chien C se démarquent assez nettement des autres. Ceci nous a, donc, poussé à recalculer les pourcentages moyens de récupération en excluant les valeurs

issues de ce chien. La comparaison des deux courbes montre bien l'influence qu'avait ce chien sur le résultat moyen puisque les deux courbes présentent une évolution similaire au cours du temps mais, par contre, la courbe représentant les moyennes des chiens A, B, D et E voit ses valeurs clairement majorées par rapport à la courbe obtenue avec les moyennes des cinq chiens.

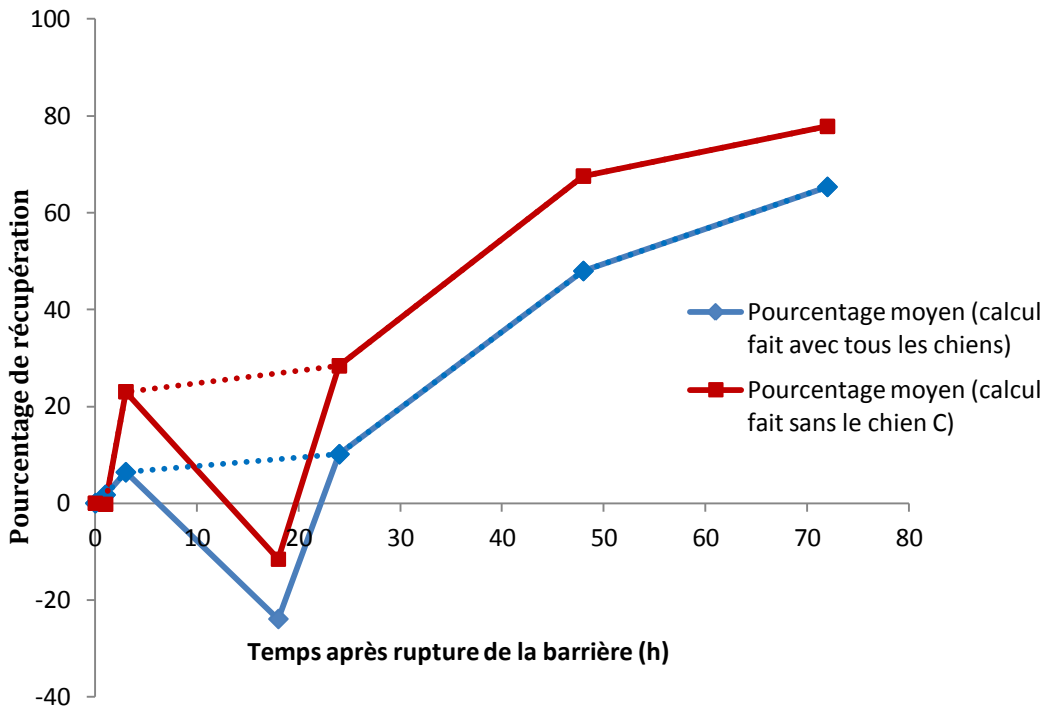

Figure 18 : Pourcentages moyens de récupération en fonction du temps suite à une rupture aiguë.

Remarquons que, dans les études réalisées chez l'homme ou la souris, aucune chute du pourcentage de récupération n'a été montrée : les courbes de récupération ne font qu'augmenter au cours du temps (16, 20, 21, 50). Ceci nous amène à envisager plusieurs hypothèses. La plus probable étant que cela n'a, tout simplement, pas pu être mis en évidence parce que les temps étudiés ne correspondaient jamais aux temps auxquels ce phénomène de chute du pourcentage de récupération se produisait. A ce propos, si l'on se penche sur les études réalisées chez l'homme, aucune mesure n'a été réalisée à 18 heures. De plus, même si cette « ré-aggravation » existe réellement chez les autres espèces, elle ne se produit pas forcement 18 heures après la rupture de la barrière, comme c'est le cas dans notre expérience chez le chien. Une autre hypothèse, beaucoup moins probable, serait que ce phénomène ne se produirait que chez le chien.

Lors d'une étude sur des souris, dont la barrière cutanée a été altérée chimiquement avec de l'acétone, la récupération de la barrière était proche de 60% au bout de six heures seulement et de 90% après 48 heures d'évolution (21).

Des résultats similaires ont été obtenus sur de jeunes souris ayant subit une rupture mécanique. Les souris âgées, quant à elles, ont présenté un schéma de récupération beaucoup plus lent (20).

Cependant, ces résultats sont à moduler en fonction du degré de rupture créé car, lors d'atteinte sévère, le rétablissement est beaucoup plus lent. En témoigne un temps de

récupération de plus de cinq jours pour une rupture aiguë sévère de la barrière cutanée (50).

Chez l'homme, que la rupture soit réalisée par tape stripping ou avec de l'acétone, la courbe de récupération est, à peu près, la même pour un degré d'altération identique évalué par la mesure de la perte insensible en eau.

La récupération est de 60% en 24 heures et est quasiment totale au bout de 96 heures. Là encore, ceci est valable chez des individus jeunes et le rétablissement se fait plus lentement chez des personnes plus âgées (20).

Ici encore, nous soulignons l'importance d'avoir des individus de même âge.

D'autres facteurs que l'âge influencent la restauration de la barrière : le site anatomique choisi, l'état de stress… (9, 16).

La comparaison entre les différentes espèces n'est pas aisée car les modèles de rupture ne sont pas toujours les mêmes et l'intensité de la rupture n'est pas non plus identique. Ceci est d'autant plus vrai que les valeurs basales de perte insensible en eau sont différentes selon les espèces et, donc, le critère de sévérité ne peut se baser sur la seule mesure de la perte insensible en eau.

Malgré les variations observées entre les chiens, la diminution de la perte insensible en eau correspond à la reconstitution du *stratum corneum* et à l'augmentation du nombre de cornéocytes le composant, comme nous avons pu le voir sur les coupes histologiques.

Ainsi, la mesure de la perte insensible en eau est un bon moyen pour évaluer le statut de la fonction barrière chez le chien lorsque le protocole est bien standardisé.

CONCLUSION

Dans cette thèse, nous avons souligné l'importance capitale du *stratum corneum* pour la fonction barrière de la peau. Son bon fonctionnement est assuré par l'intégrité de sa fraction lipidique, de ses cornéocytes et de son taux d'hydratation qui dépend lui-même, en grande partie, de l'intégrité des deux premiers constituants (2, 4).

L'évaluation du statut de la barrière cutanée de manière non invasive a été une grande avancée en médecine humaine, surtout en dermatologie, avec pour preuve la large utilisation des appareils permettant la mesure de la perte insensible en eau. La transposition de ces méthodes en médecine vétérinaire est promise à un bel avenir avec des domaines d'applications variés. Cependant, avant toute chose, il s'avère nécessaire de mettre au point et de valider ces méthodes.

Ce travail représente donc la première étude de la réponse homéostasique, évaluée par des examens cliniques et histopathologiques répétés, et de l'évolution de la perte insensible en eau, après la réalisation expérimentale d'une rupture mécanique de la barrière cutanée, dans l'espèce canine.

Ainsi, par le biais de ces manipulations, nous avons pu élaborer un modèle de rupture aiguë de la barrière cutanée par mise en œuvre de la technique de « tape stripping » chez des chiens sains.

Dans l'espèce canine, cette altération mécanique de la fonction barrière conduit à une réponse inflammatoire précoce, caractérisée par une infiltration massive du derme par des polynucléaires éosinophiles, qui se voient peu à peu remplacés par des cellules mononucléées, au cours de la phase de récupération. En outre nous avons pu observer une reconstitution relativement rapide du *stratum corneum.*

Une corrélation a pu être démontrée, entre la perte insensible en eau et le statut de la barrière cutanée, évalué cliniquement et histopathologiquement. La confrontation des différentes données nous a permis de montrer que la mesure de la perte insensible en eau peut être employée pour évaluer de manière non invasive la fonction barrière de la peau de chiens. De plus, une bonne reproductibilité des mesures a été mise en évidence avec l'appareil et le protocole utilisés dans cette étude.

Ce modèle standardisé et reproductible, de rupture aiguë de la barrière cutanée chez des chiens, pourrait contribuer à une meilleure compréhension de la pathogénèse de dermatoses, caractérisées par une fonction barrière défectueuse, comme la dermatite atopique.

Ce modèle pourrait également être utilisé pour étudier les effets de traitements, topiques et systémiques, ayant pour but de rétablir la fonction barrière. En effet, les avantages des modèles mis en œuvre chez des chiens, par rapport à ceux élaborés chez des souris, sont doubles. La restauration de la barrière se faisant plus lentement dans l'espèce canine, l'évaluation des effets des traitements se voit facilitée. De plus, la physiologie cutanée de l'homme est beaucoup plus proche de celle du chien que de celle de la souris.

Le Professeur responsable
VetAgro Sup campus vétérinaire

D. Pin.

Le Président de la thèse
Vu et permis d'imprimer
Lyon, le 17 NOV. 2011
Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,
Professeur F.N GILLY

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON I

Le Directeur général
VetAgro Sup

Par délégation
Pr F. Grain - DEVE
VetAgro Sup
Campus Vétérinaire

BIBLIOGRAPHIE

1- AMANO T., TAKEDA T., YANO H., TAMURA T. (2007) Olopatadine hydrochloride accelerates the recovery of skin barrier function in mice. *Br. J. Dermatol*. **156**, (5), 906-912.

2- AUGROS-TIZON C. (2006) Etude dans l'espèce canine, des principaux paramètres physiologiques de la surface cutanée : sébométrie, cornéométrie, TEWL et pH. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine, Nantes, 88 p.

3- BASHIR S.J., CHEW A.L., ANIGBOGU A., DREHER F., MAIBACH H.I. (2001) Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. *Skin Res Technol*. **7**, (1), 40-48.

4- BECO L., FONTAINE J. (2000) Cornéométrie et perte d'eau transépidermique : validation des techniques chez des chiens sains. *Ann Med Vet*. **144**, 329-333.

5- BLANK I.H. (1952) Factors which influence the water content of the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol*. **18**, (6), 433-440.

6- BOUWSTRA J.A., HONEYWELL-NGUYEN P.L., GOORIS G.S., PONEC M. (2003) Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog. Lipid Res*. **42**, (1), 1-36.

7- BRETERNITZ M., FLACH M., PRÄSSLER J., ELSNER P., FLUHR J.W. (2007) Acute barrier disruption by adhesive tapes is influenced by pressure, time and anatomical location: integrity and cohesion assessed by sequential tape stripping. A randomized, controlled study. *Br. J. Dermatol*. **156**, (2), 231-240.

8- COHEN J.C., HARTMAN D.G., GAROFALO M.J., BASEHOAR A., RAYNOR B., ASHBRENNER E., *et al.* (2009) Comparison of closed chamber and open chamber evaporimetry. *Skin Res Technol*. **15**, (1), 51-54.

9- DENDA M., TSUCHIYA T., HOSOI J., KOYAMA J. (1998) Immobilization-induced and crowded environment-induced stress delay barrier recovery in murine skin. *Br. J. Dermatol*. **138**, (5), 780-785.

10- DENDA M., WOOD L.C., EMAMI S., CALHOUN C., BROWN B.E., ELIAS P.M., *et al.* (1996) The epidermal hyperplasia associated with repeated barrier disruption by acetone treatment or tape stripping cannot be attributed to increased water loss. *Arch. Dermatol. Res*. **288**, (5-6), 230-238.

11- EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE S., ASCHAUER H., SCHMOOK F.P., JENSEN J.M., MEINGASSNER J.G., PROKSCH E. (1998) Expression of epidermal keratins and the cornified envelope protein involucrin is influenced by permeability barrier disruption. *J. Invest. Dermatol*. **111**, (3), 517-523.

12- ELIAS P.M., FEINGOLD K.R., FLUHR J.W. (2003) Skin as an organ of protection. *Dans*: *Fitzpatrick's Dermatology in General Medecine*. New York, McGraw-Hill, 107-118.

13- FARAHMAND S., TIEN L., HUI X., MAIBACH H.I. (2009) Measuring transepidermal water loss: a comparative in vivo study of condenser-chamber, unventilated-chamber and open-chamber systems. *Skin Res Technol*. **15**, (4), 392-398.

14- FEINGOLD K.R. (2007) Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J. Lipid Res*. **48**, (12), 2531-2546.

15- FEINGOLD K.R. (2009) The outer frontier: the importance of lipid metabolism in the skin. *J. Lipid Res*. **50 Suppl**, S417-422.

16- FLUHR J.W., DICKEL H., KUSS O., WEYHER I., DIEPGEN T.L., BERARDESCA E. (2002) Impact of anatomical location on barrier recovery, surface pH and stratum corneum hydration after acute barrier disruption. *Br. J. Dermatol*. **146**, (5), 770-776.

17- FLUHR J.W., FEINGOLD K.R., ELIAS P.M. (2006) Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent in vivo and ex vivo models. *Exp. Dermatol*. **15**, (7), 483-492.

18- GABARD B. (2000) Mesure de la perte insensible en eau. *Dans: Traité EMC: Cosmétologie et dermatologie esthétique*. Paris, Elsevier Masson.

19- GABARD B., BAREL A.O. (2008) Dynamique de l'hydratation cutanée. *Dans: Traité EMC: Cosmétologie et dermatologie esthétique*. Paris, Elsevier Masson.

20- GHADIALLY R., BROWN B.E., SEQUEIRA-MARTIN S.M., FEINGOLD K.R., ELIAS P.M. (1995) The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J. Clin. Invest*. **95**, (5), 2281-2290.

21- GRUBAUER G., ELIAS P.M., FEINGOLD K.R. (1989) Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function. *J. Lipid Res*. **30**, (3), 323-333.

22- HACHEM J.-P., HOUBEN E., CRUMRINE D., MAN M.-Q., SCHURER N., ROELANDT T., *et al*. (2006) Serine protease signaling of epidermal permeability barrier homeostasis. *J. Invest. Dermatol*. **126**, (9), 2074-2086.

23- HESTER S.L., REES C.A., KENNIS R.A., ZORAN D.L., BIGLEY K.E., WRIGHT A.S., *et al*. (2004) Evaluation of corneometry (skin hydration) and transepidermal water-loss measurements in two canine breeds. *J. Nutr*. **134**, (8 Suppl), 2110S-2113S.

24- HUNTER R., PINKUS H., STEELE C.H. (1956) Examination of the epidermis by the strip method. III. The number of keratin cells in the human epidermis. *J. Invest. Dermatol*. **27**, (1), 31-34.

25- KALININ A.E., KAJAVA A.V., STEINERT P.M. (2002) Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays*. **24**, (9), 789-800.

26- KATSUTA Y., YOSHIDA Y., KAWAI E., KOHNO Y., KITAMURA K. (2003) Urokinase-type plasminogen activator is activated in stratum corneum after barrier disruption. *Journal of Dermatological Science*. **32**, (1), 55-57.

27- KIRBY N.A., HESTER S.L., BAUER J.E. (2007) Dietary fats and the skin and coat of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. **230**, (11), 1641-1644.

28- KLIGMAN A.M. (1964) The biology of the stratum corneum. *Dans*: *The epidermis*. New York, Montagna W., Lobitz W.C. Jr, 387 - 434.

29- KNIGHT C., FAN E., RIIS R., MCDONOUGH S. (2009) Inflammatory myofibroblastic tumors in two dogs. *Vet. Pathol*. **46**, (2), 273-276.

30- LADEMANN J., JACOBI U., SURBER C., WEIGMANN H.-J., FLUHR J.W. (2009) The tape stripping procedure--evaluation of some critical parameters. *Eur J Pharm Biopharm*. **72**, (2), 317-323.

31- LAU-GILLARD P.J., HILL P.B., CHESNEY C.J., BUDLEIGH C., IMMONEN A. (2010) Evaluation of a hand-held evaporimeter (VapoMeter) for the measurement of transepidermal water loss in healthy dogs. *Vet. Dermatol*. **21**, (2), 136-145.

32- LEVER W.-F. (1969) Histopathologie de la peau. Masson, 754 p.

33- LLOYD D.H., GARTHWAITE G. (1982) Epidermal structure and surface topography of canine skin. *Res. Vet. Sci*. **33**, (1), 99-104.

34- LÖFFLER H., DREHER F., MAIBACH H.I. (2004) Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal. *Br. J. Dermatol*. **151**, (4), 746-752.

35- MADISON K.C. (2003) Barrier function of the skin: « la raison d'être » of the epidermis. *J. Invest. Dermatol*. **121**, (2), 231-241.

36- MAO-QIANG M., ELIAS P.M., FEINGOLD K.R. (1993) Fatty acids are required for epidermal permeability barrier function. *J. Clin. Invest*. **92**, (2), 791-798.

37- MARKS R. (2004) The stratum corneum barrier: the final frontier. *J. Nutr*. **134**, (8 Suppl), 2017S-2021S.

38- MARRAKCHI S., MAIBACH H.I. (2007) Biophysical parameters of skin: map of human face, regional, and age-related differences. *Contact Derm*. **57**, (1), 28-34.

39- MATSUNAGA Y., OGURA Y., EHAMA R., AMANO S., NISHIYAMA T., TAGAMI H. (2007) Establishment of a mouse skin model of the lichenification in human chronic eczematous dermatitis. *Br. J. Dermatol*. **156**, (5), 884-891.

40- MENON G.K., FEINGOLD K.R., ELIAS P.M. (1992) Lamellar body secretory response to barrier disruption. *J. Invest. Dermatol*. **98**, (3), 279-289.

41- MENON G.K. (2002) New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv. Drug Deliv. Rev*. **54 Suppl 1**, S3-17.

42- MUELLER R.S., WEST K., BETTENAY S.V. (2004) Immunohistochemical evaluation of mononuclear infiltrates in canine lupoid onychodystrophy. *Vet. Pathol*. **41**, (1), 37-43.

43- NISHIJIMA T., TOKURA Y., IMOKAWA G., SEO N., FURUKAWA F., TAKIGAWA M. (1997) Altered permeability and disordered cutaneous immunoregulatory function in mice with acute barrier disruption. *J. Invest. Dermatol*. **109**, (2), 175-182.

44- NORLEN L. (2001) Skin barrier formation: the membrane folding model. *J. Invest. Dermatol*. **117**, (4), 823-829.

45- NORLEN L. (2001) Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *J. Invest. Dermatol*. **117**, (4), 830-836.

46- OH W.S., OH T.H. (2009) Measurement of transepidermal water loss from clipped and unclipped anatomical sites on the dog. *Aust. Vet. J*. **87**, (10), 409-412.

47- OHMORI K., TANAKA A., MAKITA Y., TAKAI M., YOSHINARI Y., MATSUDA H. (2010) Pilot evaluation of the efficacy of shampoo treatment with ultrapure soft water for canine pruritus. *Vet. Dermatol*. **21**, (5), 477-483.

48- OLIVRY T., WOFFORD J., PAPS J.S., DUNSTON S.M. (2010) Stratum corneum removal facilitates experimental sensitization to mite allergens in atopic dogs. *Vet Dermatol*. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21143539

49- ONOUE A., KABASHIMA K., KOBAYASHI M., MORI T., TOKURA Y. (2009) Induction of eosinophil- and Th2-attracting epidermal chemokines and cutaneous late-phase reaction in tape-stripped skin. *Exp. Dermatol*. **18**, (12), 1036-1043.

50- OUDSHOORN M.H.M., RISSMANN R., VAN DER COELEN D., HENNINK W.E., PONEC M., BOUWSTRA J.A. (2009) Development of a murine model to evaluate the effect of vernix caseosa on skin barrier recovery. *Exp. Dermatol*. **18**, (2), 178-184.

51- OYOSHI M.K., LARSON R.P., ZIEGLER S.F., GEHA R.S. (2010) Mechanical injury polarizes skin dendritic cells to elicit a T(H)2 response by inducing cutaneous thymic stromal lymphopoietin expression. *J. Allergy Clin. Immunol*. **126**, (5), 976-984.

52- DE PAEPE K., HOUBEN E., ADAM R., WIESEMANN F., ROGIERS V. (2005) Validation of the VapoMeter, a closed unventilated chamber system to assess transepidermal water loss vs. the open chamber Tewameter. *Skin Res Technol*. **11**, (1), 61-69.

53- PINKUS H. (1951) Examination of the epidermis by the strip method of removing horny layers. I. Observations on thickness of the horny layer, and on mitotic activity after stripping. *J. Invest. Dermatol*. **16**, (6), 383-386.

54- POPA I., THUY L.H., COLSCH B., PIN D., GATTO H., HAFTEK M., *et al.* (2010) Analysis of free and protein-bound ceramides by tape stripping of stratum corneum from dogs. *Arch. Dermatol. Res.* **302**, (9), 639-644.

55- PROKSCH E., FEINGOLD K.R., MAN M.Q., ELIAS P.M. (1991) Barrier function regulates epidermal DNA synthesis. *J. Clin. Invest*. **87**, (5), 1668-1673.

56- PROKSCH E., BRANDNER J.M., JENSEN J.-M. (2008) The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol*. **17**, (12), 1063-1072.

57- RISSMANN R., OUDSHOORN M.H.M., HENNINK W.E., PONEC M., BOUWSTRA J.A. (2009) Skin barrier disruption by acetone: observations in a hairless mouse skin model. *Arch Dermatol Res*. **301**, (8), 609-613.

58- SAMUELSON D.A. (2006) Textbook of Veterinary Histology. 1er éd. Saunders, 560 p.

59- SCOTT D.W., MILLER J., GRIFFIN C.E. (2001) Structure and Function of the Skin. *Dans*: *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology (Sixth Edition)*. Philadelphia, W.B. Saunders, 1-70.

60- SEXTIUS P., MARIONNET C., BON F.-X., DE LA CHAPELLE A.L., TACHEAU C., LAHFA M., *et al.* (2010) Large scale study of epidermal recovery after stratum corneum removal: dynamics of genomic response. *Exp. Dermatol*. **19**, (3), 259-268.

61- SHIMADA K., YOON J.-S., YOSHIHARA T., IWASAKI T., NISHIFUJI K. (2009) Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of

dogs with atopic dermatitis. *Vet. Dermatol*. **20**, (5-6), 541-546.

62- SHIMADA K., YOSHIHARA T., YAMAMOTO M., KONNO K., MOMOI Y., NISHIFUJI K., *et al*. (2008) Transepidermal water loss (TEWL) reflects skin barrier function of dog. *J. Vet. Med. Sci*. **70**, (8), 841-843.

63- SUNWOO Y., CHOU C., TAKESHITA J., MURAKAMI M., TOCHIHARA Y. (2006) Physiological and subjective responses to low relative humidity. *J Physiol Anthropol*. **25**, (1), 7-14.

64- TANAKA M., ZHEN Y.X., TAGAMI H. (1997) Normal recovery of the stratum corneum barrier function following damage induced by tape stripping in patients with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol*. **136**, (6), 966-967.

65- THOMSETT L.R. (1986) Structure of canine skin. *British Veterinary Journal*. **142**, (2), 116-123.

66- WALTER J.H. (2001) Cytokeratins in the canine epidermis. *Vet. Dermatol*. **12**, (2), 81-87.

67- WATSON A., FRAY T., CLARKE S., YATES D., MARKWELL P. (2002) Reliable use of the ServoMed Evaporimeter EP-2 to assess transepidermal water loss in the canine. *J. Nutr*. **132**, (6 Suppl 2), 1661S-4S.

68- WOOD L.C., JACKSON S.M., ELIAS P.M., GRUNFELD C., FEINGOLD K.R. (1992) Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. *J. Clin. Invest*. **90**, (2), 482-487.

69- YANG L., MAO-QIANG M., TALJEBINI M., ELIAS P.M., FEINGOLD K.R. (1995) Topical stratum corneum lipids accelerate barrier repair after tape stripping, solvent treatment and some but not all types of detergent treatment. *Br. J. Dermatol*. **133**, (5), 679-685.

70- YOSHIHARA T., SHIMADA K., MOMOI Y., KONNO K., IWASAKI T. (2007) A new method of measuring the transepidermal water loss (TEWL) of dog skin. *J. Vet. Med. Sci*. **69**, (3), 289-292.

71- ZABA L.C., FUENTES-DUCULAN J., STEINMAN R.M., KRUEGER J.G., LOWES M.A. (2007) Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIA+ macrophages. *J Clin Invest*. **117**, (9), 2517-2525.

72- Cytokératine - Wikipédia [en ligne]. (Page consultée le 16 octobre 2011). Adresse URL: http://fr.wikipedia.org/wiki/Cytok%C3%A9ratine

73- Kératine - Wikipédia [en ligne]. (Page consultée le 16 octobre 2011). Adresse URL: http://fr.wikipedia.org/wiki/K%C3%A9ratine

ANNEXES

I. COMPLEMENTS D'INFORMATION SUR LES AUTRES TYPES CELLULAIRES DE L'EPIDERME

1. *LES CELLULES DE MERKEL*

Ce sont des cellules dendritiques spécialisées qui jouent le rôle de mécanorécepteurs à adaptation lente. Elles se localisent au sein des tubercules tylotriches et semblent intervenir dans le toucher. Chaque cellule de Merkel est en relation avec une terminaison nerveuse non myélinisée. Elles sont étroitement attachées aux cellules basales adjacentes par des desmosomes (58).

Ces cellules semblent également intervenir dans la circulation sanguine cutanée, la transpiration, la coordination de la prolifération des kératinocytes ainsi que dans le maintien et la stimulation de la population de cellules souches des follicules pileux (59).

2. *LES MELANOCYTES*

Ils apparaissent sous forme de cellules claires intercalées entre les cellules basales sur les coupes colorées à l'hématoxyline-éosine (32). Leur rôle est d'élaborer les pigments de la peau (mélanines) qui seront transférés au kératinocytes pour les protéger des rayonnements solaires.

Ces cellules, originaires des crêtes neurales, possèdent des processus dendritiques allant jusqu'à la première assise de cellules épineuses. Leur répartition est uniforme au sein de la couche basale et le ratio est d'environ un mélanocyte pour dix à vingt kératinocytes. On parle d' « unité de mélanisation épidermique » car il y a une étroite relation structurelle et fonctionnelle entre les mélanocytes et les kératinocytes (59).

Les mélanosomes sont des organites intracellulaires dans lesquels sont produites les mélanines. Leur maturation va s'accompagner de leur migration en partie distale des prolongements cytoplasmiques. Ils vont ensuite passer dans le cytoplasme des kératinocytes et se placer au dessus du noyau pour le protéger des ultraviolets (58). Plus les mélanocytes de l'épiderme synthétisent de mélanine et mieux la peau est protégée contre les ultraviolets (37).

3. *LES CELLULES DE LANGERHANS*

Elles dérivent de cellules précurseurs de la lignée des monocytes-histiocytes dans la moelle osseuse. Leurs caractéristiques et leur origine expliquent leur appartenance au système des phagocytes mononucléés (58).

Elles représentent la première ligne de défense vis-à-vis des antigènes environnementaux. Ainsi, on comprend aisément l'importance de leur implication dans les phénomènes d'hypersensibilités à l'origine de nombreuses dermatoses immunologiques et lors de dermatite atopique (2). Elles stimulent la prolifération des lymphocytes T helper appropriés par le biais de la présentation d'antigènes, participent à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques, produisent des cytokines, contiennent de nombreuses enzymes et possèdent la capacité de phagocyter (59).

II. COMPLEMENTS D'INFORMATION SUR LES DIFFERENTES JONCTIONS CELLULAIRES

Une cellule possède différentes jonctions dont les quatre principales structures d'adhésion et de communication sont les desmosomes, les hémidesmosomes, les jonctions adhérentes et les adhésions focales. Les hémidesmosomes et les adhésions focales sont exclusivement retrouvées à la base des cellules basales et permettent l'adhésion à la matrice extracellulaire sous-jacente alors que les desmosomes et les jonctions adhérentes assurent la cohésion entre les kératinocytes dans toutes les couches de l'épiderme. La communication entre les cellules adjacentes peut se faire par le biais des canaux présents au niveau des jonctions Gap (59).

Les desmosomes (et les cornéodesmosomes) constituent les structures d'adhésion les plus importantes de la barrière cutanée. Ils peuvent être mis en évidence à l'examen histologique. Ils sont constitués de deux plaques cytoplasmiques denses renfermant des protéines non glycosylées de la famille des plakines (desmoplakines, plakoglobines et plakophilines), de filaments intermédiaires ancrés dans ces plaques et des membranes plasmiques de deux kératinocytes adjacents entre lesquelles s'interpose la desmoglée qui est formée de glycoprotéines (dont les desmogléines et les desmocollines) (figure). Les desmogléines et desmocollines sont spécialisées dans l'adhésion et leurs parties extracellulaires s'accrochent entre elles. Les filaments intermédiaires s'étendent dans le cytoplasme pour offrir une plus grande résistance mécanique et une meilleure cohésion (59).

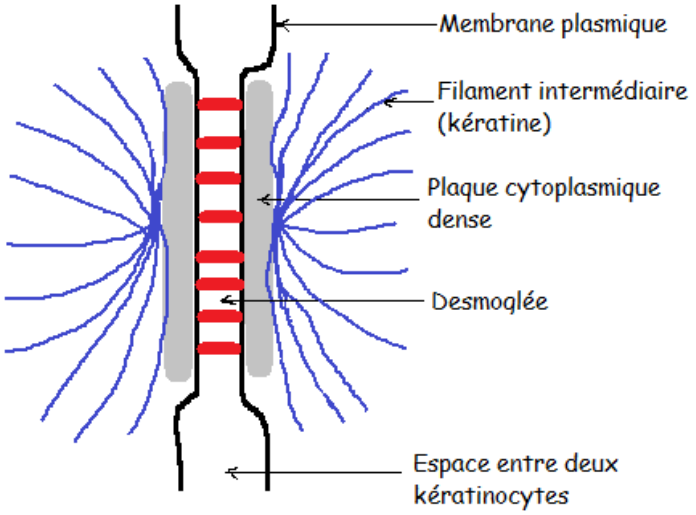

Figure 19 : Représentation schématique d'un desmosome.

Les hémidesmosomes, quant à eux, sont constitués d'une plaque d'attache unique d'où partent des filaments intermédiaires et qui permet l'adhésion des kératinocytes à la jonction dermo-épidermique. De nombreuses protéines sont impliquées dans ces structures et sont nécessaires à leur cohésion (32). Une déficience ou une anomalie de l'un des composants de ces hémidesmosomes peut être à l'origine des maladies dites « bulleuses » (2).

III. TABLEAU REGROUPANT LES VALEURS BRUTES DE PERTE INSENSIBLE EN EAU

	Chien A	Chien B	Chien C	Chien D	Chien E	Moyennes
Mesures de la PIE avant rupture ($g.m^{-2}.h^{-1}$)	15,3	14,4	15,6	12,2	7,8	
	12,2	13,0	18,1	11,8	17,0	
	10,9	10,1	16,8	11,3	11,2	
Moyenne	12,80	12,50	16,83	11,77	12,00	13,18
Ecart type	1,85	1,79	1,02	0,37	3,80	1,76
Variance	3,41	3,21	1,04	0,14	14,43	4,44
Coefficient de variation (%)	14,42	14,33	6,06	3,13	31,65	13,92
Mesures immédiatement après la rupture (T0) ($g.m^{-2}.h^{-1}$)	115,0	102,0	97,8	117,0	113,0	
	98,5	91,3	88,7	114,0	97,0	
	100,0	97,3	99,8	115,5	98,0	
Moyenne	104,50	96,87	95,43	115,50	102,67	102,99
Ecart type	7,45	4,38	4,83	1,22	7,32	5,04
Variance	55,50	19,18	23,34	1,50	53,56	30,61

Coefficient de variation (%)	7,13	4,52	5,06	1,06	7,13	4,98
Pourcentage de récupération	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mesures 1h après la rupture (T+1) ($g.m^{-2}.h^{-1}$)	106,0	68,1	86,7	93,4	150,0	
	104,0	68,8	90,0	116,0	144,0	
	106,0	72,4	87,4	111,0	124,0	
Moyenne	105,33	69,77	88,03	106,80	139,33	101,85
Ecart type	0,94	1,88	1,42	9,69	11,12	5,01
Variance	0,89	3,55	2,02	93,95	123,56	44,79
Coefficient de variation (%)	0,90	2,70	1,61	9,08	7,98	4,45
Pourcentage de récupération	-0,91	32,12	9,41	8,39	-40,43	1,72
Mesures 3h après la rupture (T+3) ($g.m^{-2}.h^{-1}$)	109,0	56,4	140,0	87,0	91,6	
	107,0	65,9	138,0	71,9	81,6	
	93,0	56,0	150,0	89,0	95,6	
Moyenne	103,00	59,43	142,67	82,63	89,60	95,47
Ecart type	7,12	4,58	5,25	7,63	5,89	6,09
Variance	50,67	20,94	27,56	58,27	34,67	38,42
Coefficient de variation (%)	6,91	7,70	3,68	9,24	6,57	6,82
Pourcentage de récupération	1,64	44,38	-60,10	31,69	14,41	6,40
Mesures 18h après la rupture (T+18) ($g.m^{-2}.h^{-1}$)	127,0	48,6	150,0	171,0	121,0	
	120,0	49,9	151,0	173,0	128,0	
	130,0	51,0	158,0	168,0	129,0	
Moyenne	125,67	49,83	153,00	170,67	126,00	125,03
Ecart type	4,19	0,98	3,56	2,05	3,56	2,87
Variance	17,56	0,96	12,67	4,22	12,67	9,61
Coefficient de variation (%)	3,33	1,97	2,33	1,20	2,82	2,33
Pourcentage de récupération	-23,09	55,75	-73,24	-53,19	-25,73	-23,90
Mesures 24h après la rupture (T+24) ($g.m^{-2}.h^{-1}$)	98,6	46,6	140,6	157,0	44,0	
	82,7	44,7	144,0	139,0	33,9	
	88,9	44,9	150,0	157,0	37,0	
Moyenne	90,07	45,40	144,87	151,00	38,30	93,93
Ecart type	6,54	0,85	3,89	8,49	4,22	4,80
Variance	42,82	0,73	15,10	72,00	17,85	29,70
Coefficient de variation (%)	7,27	1,88	2,68	5,62	11,03	5,69
Pourcentage de récupération	15,74	61,01	-62,90	-34,22	70,99	10,12
Mesures 48h après la rupture (T+48) ($g.m^{-2}.h^{-1}$)	15,3	30,5	129,0	107,0	24,9	
	17,5	27,0	111,0	118,0	20,3	
	13,3	26,0	118,0	116,0	19,8	
Moyenne	15,37	27,83	119,33	113,67	21,67	59,57

Ecart type	1,72	1,93	7,41	4,78	2,30	3,63
Variance	2,94	3,72	54,89	22,89	5,27	17,94
Coefficient de variation (%)	11,16	6,93	6,21	4,21	10,59	7,82
Pourcentage de récupération	97,20	81,83	-30,41	1,76	89,33	47,94
Mesures 72h après la rupture (T+72) ($g.m^{-2}.h^{-1}$)	22,2	21,4	86,2	85,0	20,9	
	21,2	20,4	85,0	70,6	18,7	
	18,6	21,4	78,9	75,9	15,6	
Moyenne	20,67	21,07	83,37	77,17	18,40	44,13
Ecart type	1,52	0,47	3,20	5,95	2,17	2,66
Variance	2,30	0,22	10,22	35,36	4,73	10,57
Coefficient de variation (%)	7,34	2,24	3,83	7,71	11,82	6,59
Pourcentage de récupération	91,42	89,84	15,34	36,95	92,94	65,30

Tableau V : Valeurs brutes de perte insensible en eau en $g.m^{-2}.h^{-1}$ et moyennes, écarts types, variances, coefficients de variation et pourcentages de récupération associés.

NOM PRENOM : SCHAFFO ARMELLE

TITRE : CREATION D'UN MODELE DE RUPTURE AIGUË DE LA BARRIERE CUTANEE CHEZ LE CHIEN ET ESSAI DE QUANTIFICATION PAR LA MESURE DE LA PERTE INSENSIBLE EN EAU.

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon, *28 novembre 2011*

RESUME :

La barrière cutanée est un élément indispensable à la survie dans le milieu terrestre. Elle permet, notamment, le maintien de l'homéostasie interne et la protection contre les agressions extérieures. Cette barrière est assurée exclusivement par l'épiderme.

Après quelques rappels sur la peau et, plus particulièrement, sur l'épiderme, un état des lieux des connaissances actuelles concernant la barrière cutanée et la perte insensible en eau est dressé dans une première partie.

La seconde partie de cette thèse est le compte-rendu d'une étude expérimentale originale ayant pour but d'élaborer un modèle de rupture aiguë de la barrière cutanée chez le chien et de tester une éventuelle corrélation entre le statut de la barrière cutanée et la perte insensible en eau.

MOTS CLES :

- Chien
- Peau
- Perméabilité
- Rupture

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur Jean-François NICOLAS
1er Assesseur :	Monsieur le Docteur Vétérinaire Didier PIN
2ème Assesseur :	Monsieur le Docteur Vétérinaire Thierry MARCHAL
Membre invité :	Madame le Docteur Vétérinaire Emilie VIDEMONT-DREVON

DATE DE SOUTENANCE : 28 NOVEMBRE 2011

ADRESSE DE L'AUTEUR :

16 rue Pierre Vernier
25000 BESANCON