VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2012 - Thèse n°

EVALUATION DE L'EFFET D'UNE LOTION, DOUXOCALMND MOUSSE MO, SUR LA REPARATION DE LA BARRIERE CUTANEE DANS UN MODELE DE RUPTURE CHRONIQUE DE LA BARRIERE CUTANEE CHEZ LE CHIEN

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 27 septembre 2012
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

BECKRICH Marie, Lucile, Frédérique
Née le 31 mai 1987
à Neuilly sur Seine (92)

VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2012 - Thèse n°

EVALUATION DE L'EFFET D'UNE LOTION, DOUXOCALMND MOUSSE MO, SUR LA REPARATION DE LA BARRIERE CUTANEE DANS UN MODELE DE RUPTURE CHRONIQUE DE LA BARRIERE CUTANEE CHEZ LE CHIEN

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 27 septembre 2012
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

BECKRICH Marie, Lucile, Frédérique
Née le 31 mai 1987
à Neuilly sur Seine (92)

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 Frédéric BERARD,
De la Faculté de Médecine de Lyon,
Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,
Hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur Vétérinaire Didier PIN,
Du campus vétérinaire de VetAgro Sup,
Pour sa disponibilité, son encadrement, son aide et ses relectures,
Avec toute ma reconnaissance et mon respect le plus sincère.

A Monsieur le Professeur Thierry MARCHAL,
Du campus vétérinaire de VetAgro Sup,
Qui m'a fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury de thèse.
Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Vétérinaire Oscar FANTINI,
Du campus vétérinaire de VetAgro Sup,
Pour son aide précieuse au cours des expériences, sa gentillesse et sa disponibilité.
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,
Merci à tous pour votre travail.

SOMMAIRE

SOMMAIRE **7**
INDEX DES ABREVIATIONS **10**
INDEX DES FIGURES **11**
INDEX DES PHOTOGRAPHIES **12**
INDEX DES TABLEAUX **13**
INDEX DES ANNEXES **14**
INTRODUCTION **15**
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE **17**

I/ Structure de la peau saine **17**
A) L'épiderme 17
1) Les différents constituants de l'épiderme 17
a) Les kératinocytes 17
b) Les mélanocytes 18
c) Les cellules de Langerhans 18
d) Les cellules de Merkel 18
e) Les lymphocytes T 19
2) Les couches cellulaires de l'épiderme 19
a) Stratum corneum 19
b) Stratum lucidum 20
c) Stratum granulosum 20
d) Stratum spinosum 20
e) Stratum germinativum 20
f) La lame basale 21
B) Le derme 23

II/ La barrière cutanée **23**
A) Une barrière chimique et biochimique 23
1) Le pH de la couche cornée 23
2) Les enzymes hydrolytiques et les peptides antimicrobiens 24
3) La flore commensale cutanée 24
B) Une barrière immunologique 25
1) Les cellules de Langherans de l'épiderme (cf partie correspondante) 25
2) Les histiocytes et macrophages 25
3) Les cellules dendritiques du derme 25
4) Lymphocytes, plasmocytes et polynucléaires 25
C) Une barrière physique 26
1) Les structures d'adhésion 26
a) Les jonctions serrées 26
b) Les jonctions communicantes (gap junctions) 26
c) Les jonctions adhérentes (zonula adherens) 27
d) Les desmosomes et les cornéodesmosomes 27
e) Les hémidesmosomes 29
2) La différenciation épidermique : formation de la couche cornée 29
a) Les produits des kératinocytes 29
i) Les kératines 29
ii) La filaggrine 30
iii) Les lipides épidermiques 31
b) Formation de l'enveloppe cornée 31
i) Généralités 31
ii) Les transglutaminases 31
iii) Initiation de la formation de l'enveloppe cornée 32
iv) Etape de renforcement de l'enveloppe cornée 32
c) La différenciation terminale kératinocytaire 35

d) La desquamation 35
e) Régulation du programme de différenciation 35
i) Le pH 35
ii) Le calcium 36
iii) La vitamine D 36
iv) Régulation génique 37
1) Le complexe de différenciation épidermique 37
2) Les facteurs de transcription de la famille AP-1 37
D) Une barrière hydrique 37
1) Les constituants de la barrière hydrique 37
a) Les lipides intercornéocytaires 37
i) Les précurseurs des lipides de la couche cornée 38
ii) Les céramides 39
iii) Les acides gras 39
iv) Le cholestérol et le sulfate de cholestérol 39
v) Organisation des lipides intercornéocytaires 40
b) Le FNH 40
2) La perte insensible en eau 40
a) Généralités 40
i) Définition 40
ii) Facteurs de variation chez le chien 41
1) Facteurs intrinsèques 41
2) Facteurs extrinsèques 42
b) Les méthodes de mesures de la PIE 42
i) Les instruments à chambre ouverte 43
ii) Les instruments à chambre fermée 44
1) La méthode à chambre condensée 44
2) La méthode à chambre fermée non ventilée 45

III/ L'altération de la barrière cutanée 46
A) Altération expérimentale : le tape-stripping 46
1) Technique du tape stripping 46
2) Facteurs de variabilité 47
a) Facteurs intrinsèques 47
b) Facteurs extrinsèques 47
3) Données disponibles chez le chien 48
B) Altération de la barrière cutanée lors de dermatoses 48
C) Modalités de restauration de la barrière cutanée 49
1) Les différentes étapes de la réparation de la barrière 49
2) Les mécanismes de régulation de la réparation de la barrière cutanée 50
a) Le flux d'eau dans le *stratum corneum* 50
b) Les ions 50
i) L'ion calcium 50
ii) L'ion potassium 50
iii) Autres ions 50
c) Les cytokines 51
d) L'AMPc (17) 51
e) Autres messagers 51
3) Les facteurs influençant la restauration de l'épiderme 51

PARTIE EXPERIMENTALE 55

I/ Etudes pilotes 55
A) Première étude pilote 55
1) Animal 55
2) Création des sites d'études 55
3) Méthode de rupture de la barrière cutanée par tape-stripping 55
4) Application du DOUXOCALM 56
5) Mesures de la PIE 56
6) Résultats graphiques 57
B) Deuxième étude pilote 58

1) Animal ... 58
2) Création des sites d'études ... 58
3) Méthode de rupture de la barrière cutanée par tape-stripping ... 58
4) Application du DOUXOCALM ... 59
5) Mesures de la PIE ... 59
6) Résultats graphiques ... 59
C) Conclusions ... 60

II/ Etude proprement dite ... **61**
A) Matériels et méthodes ... 61
1) Animaux ... 61
2) Création des sites d'études ... 62
3) Méthode de rupture chronique de la barrière cutanée par tape-stripping ... 63
4) Le DOUXOCALMND mousse MO ... 64
a) Objectifs ... 64
b) Mode d'action théorique ... 65
i) Il permet la reconstruction de la barrière ... 65
1) Le SK-influx V ... 65
2) La pseudo-filaggrine ... 65
3) Le lipidure PMB ... 65
4) La phytosphingosine hydrochloride ... 66
ii) Il calme rapidement le prurit ... 66
iii) Il contrôle l'inflammation persistante ... 66
iv) Il contrôle les flores de prolifération ... 66
c) Application du DouxocalmND mousse MO ... 66
5) Etude histopathologique des biopsies cutanées ... 67
6) Mesures de la PIE ... 69
7) Mesures du pH ... 69
8) Analyse statistique ... 70
B) Résultats ... 70
1) La perte insensible en eau ... 70
a) Etude graphique ... 70
b) Etude statistique ... 75
2) Le pH ... 76
a) Etude graphique ... 76
b) Etude statistique ... 78
3) Histologie ... 79
a) Biopsies en peau saine, avant « tape-stripping » ... 80
b) Biospses réalisées après une semaine de « tape-stripping » et avant application du DouxocalmND mousse MO. ... 81
c) Après 3 jours d'application quotidienne de DouxocalmND mousse MO ... 84
i) Sites témoins ... 84
ii) Sites traités ... 85
d) Biopsies après 5 jours d'applications quotidiennes de DouxocalmND mousse ... 88
i) Sites témoins ... 88
ii) Sites traités ... 89
e) Evolution de l'infiltrat inflammatoire au cours du temps ... 91
C) Discussion ... 93
1) Choix des sites d'étude ... 93
2) Etablissement du modèle de rupture chronique de la barrière cutanée ... 93
3) Mesure de la perte insensible en eau ... 94
a) Contrôle des facteurs de variation influençant la mesure de la perte insensible en eau ... 94
b) Interprétation des résultats ... 96
4) Mesure du pH ... 97
5) Examen histopathologique des biopsies cutanées ... 97
6) Conclusion sur les efftets du Douxocalm ... 98

CONCLUSION ... **99**
ANNEXES ... **101**
BIBLIOGRAPHIE ... **109**

INDEX DES ABREVIATIONS

ADN= Acide DésoxyriboNucléique

AMPc = Adenosine MonoPhosphate cyclique

ARNM = Acide RiboNucléique messager

CAM = Cell Adhesion Molecules

7-DHC= 7-DéhydroCHolestérol

HE = Hémalun éosine

HMG-CoA reductase = 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase

αMSH = αMelanocyte stimulating hormone

NMF = Natural moisturizing factor

PAR2 = Récepteur 2 activé par la protéase

PEP1 = endopeptidase de la profilaggrine

PIP2 = phosphatidyl inositol bisphosphate

pH= Potentiel Hydrogène

PIE = Perte insensible en eau

PLA2 = phospholipase A2

POMC = Pro-OpioMélanoCortine

SCCE = *Stratum Corneum* Chymotryptic Enzyme = kallikréine 7

SCTE = *Stratum Corneum* Tryptic Enzyme= kallikréine 5

TEWL = Transepidermal water loss

TNFα = Tumor Necrosis Factor α

VRDE = Eléments de réponse à la vitamine D

ZO = Zona Occludens

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Structure de l'épiderme d'un chien, d'après http://www.oleassence.fr/pour-une-belle-peau-naturelle et http://www.vetopsy.fr/sens/soma/tact/tact1_recept.php& 22
Figure 2 : Jonction serrée, d'après http://www.ulysse.u-bordeaux.fr 26
Figure 3 : Jonction gap, d'après http://fr.wikipedia.org/wiki/Jonction_communicante 27
Figure 4 : Jonction adhérente, d'après http://www.ulysse.u-bordeaux.fr 27
Figure 5 : Desmosome, d'après http://www.ulysse.u-bordeaux.fr 28
Figure 6 : Formation des enveloppes cornée et lipidique, d'après http://rms.medhyg.ch/article_p.php?ID_ARTICLE=RMS_246_0860 34
Figure 7 : Schéma d'une chambre de mesure d'un appareil à chambre ouverte, d'après 49 43
Figure 8 : Schéma d'une chambre de mesure d'un appareil à chambre condensée, d'après 49 44
Figure 9 : Schéma d'une chambre de mesure d'un appareil à chambre fermée non ventilée , d'après 49 45
Figure 10 : Mécanismes de régulation de la réparation de la barrière cutanée 53
Figure 11 : Répartition des 5 sites, modifié d'après : http://www.beagle-attitude.com/t1304-jeu-concours-dessine-moi 55
Figure 12 : Graphique représentant la PIE en fonction du temps chez le premier chien pilote 58
Figure 13 : Graphique représentant la PIE en fonction du temps chez le second chien pilote 60
Figure 14 : Répartition des 5 sites, modifié d'après : http://www.beagle-attitude.com/t1304-jeu-concours-dessine-moi 62
Figure 15 :Evolution de la PIE en fonction du temps chez les 5 chiens 71
Figure 16 : Evolution de la moyenne de la PIE en fonction du temps 72
Figure 17 : Evolution du rapport de la PIE mesurée sur la basale en fonction du temps chez les 5 chiens 73
Figure 18 : Evolution de la moyenne du rapport de la PIE mesurée sur la basale en fonction du temps 73
Figure 19 : Evolution du pourcentage de récupération en fonction du temps chez les 5 chiens 74
Figure 20 : Evolution de la moyenne du pourcentage de récupération en fonction du temps 75
Figure 21: Répartition des valeurs moyennes de PIE mesurées chez les 5 chiens 75
Figure 22: Diagramme en boîte de la répartition des valeurs moyennes de PIE mesurées chez les 5 chiens 76
Figure 23 : Evolution du pH en fonction du temps chez les 5 chiens 77
Figure 24 : Evolution de la moyenne du pH en fonction du temps 78
Figure 25: Répartition des valeurs moyennes de pH mesurées chez les 5 chiens 78
Figure 26: Diagramme en boîte de la répartition des valeurs moyennes de pH mesurées chez les 5 chiens 79
Figure 27 : Moyenne des lymphocytes (CD3) comptabilisés pour chaque site, des côtés traités et témoins 91
Figure 28 : Moyenne des monocytes et histiocytes (MAC387) comptabilisés pour chaque site, des côtés traités et témoins 91
Figure 29 : Moyenne des cellules dendritiques (Bla36) comptabilisées pour chaque site, des côtés traités et témoins 92
Figure 30 : Moyenne de la prolifération cellulaire (Ki67) de chaque site, des côtés traités et témoins 92

INDEX DES PHOTOGRAPHIES

Photographie 1 : Le VapoMeter Delfin®..... 57
Photographie 2 : Mesure de la PIE à l'aide du VapoMeter Delfin® 57
Photographie 3: Identification des sujets à l'aide d'un numéro tracé au marqueur noir sur l'oreille..... 61
Photographie 4 : Répartition des 5 sites de mesure..... 63
Photographie 5 : Erythème bien visible sur les 5 sites au terme de la semaine de rupture chronique de la barrière cutanée par tape-stripping, à J6 64
Photographie 6 : La lotion Douxocalm, sous sa forme commerciale à gauche, sous forme d'échantillon au centre, et les deux côte à côte à droite 67
Photographie 7 : Deux sites de biopsies 67
Photographie 8: Le pH-mètre HI 83141 69
Photographie 9 : Peau saine avant « tape-stripping », x 200, HE..... 80
Photographie 10 : Peau saine avant « tape-stripping »..... 80
Photographie 11 : Peau saine avant « tape-stripping », x 200, Ki67 81
Photographie 12 : Peau à J6, x 300, HE 81
Photographie 13 : Vue d'ensemble de la peau à J0, x 100, HE 82
Photographie 14 : Peau à J0, x 200, Ki67 82
Photographie 15 : Peau à J0, x 200, BLA36..... 83
Photographie 16 : Peau à J0, x 100, CD3 83
Photographie 17 : Peau à J0, x 200, Mac 387..... 83
Photographie 18 : Peau du côté témoin à J8, x 250, HE 84
Photographie 19 : Vue d'ensemble de la peau du côté témoin à J8, x 100, HE 85
Photographie 20 : Peau du côté traité à J8, x 250, HE 85
Photographie 21 : Vue d'ensemble de la peau du côté traité à J8, x 100, HE..... 86
Photographie 22: Marquages immunohistochimiques à J8, des côtés traités et témoins 87
Photographie 23 : Peau du côté témoin à J10, x 250, HE 88
Photographie 24 : Vue d'ensemble de la peau du côté témoin à J10, x 100, HE 88
Photographie 25 : Peau du côté traité à J10, x 200, HE 89
Photographie 26 : Vue d'ensemble de la peau du côté traité à J10, x 100, HE..... 89
Photographie 27 : Marquages immunohistochimiques à J10, des côtés traités et témoins 90

INDEX DES TABLEAUX

Tableau I : Valeurs moyennes de la PIE à la fin de la procédure de rupture aiguë de la barrière cutanée..... 56
Tableau II : Valeurs moyennes de la PIE à la fin de la procédure de rupture aiguë de la barrière cutanée 59
Tableau III : Planning de l'étude..... 62
Tableau IV : Valeurs moyennes de la PIE, du pH, et du nombre de scotchs appliqués à la fin de la procédure de rupture chronique de la barrière cutanée 64
Tableau V : Valeurs moyennes obtenues d'après le comptage de chaque population cellulaire, pour les côtés traités et témoins, aux différents temps, suite à l'étude en immunohistochimie..... 68

INDEX DES ANNEXES

ANNEXE 1 : RELEVE DE LA PIE POUR CHAQUE SITE POUR LES CHIENS PILOTES 101
ANNEXE 2 : NOMBRE DE SCOTCHS APPLIQUES SUR CHAQUE SITE PENDANT 1 SEMAINE..... 102
ANNEXE 3 : RELEVE DE LA PIE POUR CHAQUE SITE 103
ANNEXE 4 : RELEVE DU PH POUR CHAQUE SITE..... 105
ANNEXE 5 : EXTRAIT DE LA MATRICE ERGONOMIQUE UTILISEE POUR TRACER LES COURBES DANS R 107

INTRODUCTION

La peau est un organe complexe, qui participe au maintien de l'homéostasie interne et est donc indispensable à la vie terrestre. Sa fonction essentielle est celle de barrière. Elle est assurée en majeure partie par l'épiderme, et regroupe en réalité plusieurs sortes de barrières, qu'elles soient chimique, biochimique, immunitaire, physique ou encore hydrique. La peau a d'autres rôles importants, comme le toucher, la production des annexes et la thermorégulation.

Les affections chroniques de la peau, telles que la dermatite atopique, sont des pathologies fréquentes, qui se traduisent généralement par une altération de la barrière cutanée. Cette dernière peut être induite par la pathologie de manière primaire, ou secondairement par le prurit. Il en résulte alors une dégradation du bien-être de l'animal, pouvant se répercuter sur son propriétaire. Le traitement de ces dermatoses chroniques passe généralement par l'utilisation répétée de shampooing ou autres topiques, qui ne respectent pas forcément la barrière cutanée. Actuellement, il est recommandé d'associer à ces traitements étiologiques des produits qui favorisent la réparation de cette barrière cutanée, par exemple des réhydratants ou des anti-inflammatoires.

Le but de cette thèse est d'étudier les effets d'un nouveau produit, créé par le laboratoire Sogéval, le DouxocalmND mousse MO, sur la réparation de la barrière cutanée.
La première partie de cette étude sera consacrée à une mise au point des connaissances actuelles sur la barrière cutanée et la perte insensible en eau. Après quelques rappels sur l'organisation des couches les plus superficielles de la peau, le derme et l'épiderme, nous nous intéresserons aux fonctions barrières de la peau, notamment à la barrière hydrique et à la mesure de la perte insensible en eau. Enfin, nous terminerons en présentant une méthode de rupture de la barrière cutanée, le tape-stripping, et les phases de la réparation de la barrière cutanée.
La seconde partie de la thèse sera dédiée à l'étude expérimentale du produit. Après avoir provoqué une rupture de la barrière cutanée chez des chiens sains par la méthode de tape-stripping, nous étudierons la restauration de la barrière cutanée à l'aide des mesures de PIE, de pH, et des analyses histologiques et immunochimiques. Puis nous présenterons et discuterons les résultats obtenus, afin d'évaluer les effets du DouxocalmND mousse MO sur la réparation de la fonction barrière de la peau suite à une rupture chronique de cette dernière.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I/ Structure de la peau saine

La peau est l'organe le plus important du corps, elle représente 12% du poids corporel d'un chien adulte et son épaisseur varie de 0,5 à 5 mm. Des points de vue histologique et anatomique, la peau comprend trois parties principales : l'épiderme, partie la plus superficielle et la plus mince, le derme, partie la plus épaisse, et l'hypoderme, couche la plus profonde. L'ensemble de la peau et de ses phanères (ongles, poils) se nomme le tégument.

A) L'épiderme

L'épiderme (Fig 1) est la couche la plus externe de la peau. Dérivant de l'ectoderme, feuillet externe de l'embryon chez les vertébrés, il s'agit d'un épithélium malpighien kératinisé. L'épiderme est une couche très fine. En effet, elle mesure, dans les zones poilues, de 100 à 150 micromètres, soit moins d'un dixième de millimètre (61, 84). Cette épaisseur est beaucoup plus faible chez le chien que chez l'homme, chez qui elle varie de 400 à 1500 micromètres. L'épiderme est plus épais dans les zones non velues comme la truffe et les coussinets, où il peut atteindre 1500 micromètres (61). Il est recouvert d'un film hydrolipidique superficiel. L'épiderme n'est irrigué par aucun vaisseau sanguin. Les cellules qui le composent sont alimentées par diffusion depuis le derme. Il contient, par contre, de nombreuses terminaisons nerveuses. L'épiderme est séparé du derme par la membrane basale.

1) Les différents constituants de l'épiderme

a) Les kératinocytes

Les kératinocytes représentent environ 85% des cellules de l'épiderme (78, 88). Originaires de la couche basale, les kératinocytes se différencient en même temps qu'ils sont poussés vers le haut du massif épidermique, avant d'être éliminés à la surface de la couche cornée sous forme de cellules mortes appelées cornéocytes. Les cornéocytes sont des cellules 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. La différenciation, qui permet le passage du kératinocyte au cornéocyte, est nommée kératinisation ou cornification. Les kératinocytes synthétisent des protéines filamenteuses riches en soufre, les kératines. Les filaments de kératine vont remplir la cellule et se trouver agglomérés par une protéine, également synthétisée par les kératinocytes, la filaggrine. Parallèlement, les organites intracellulaires disparaissent et une enveloppe cornée riche en loricrine et en involucrine se dépose, doublant la membrane plasmique. Les kératinocytes adhérent les uns aux autres par des adhésions focales et des desmosomes, sur lesquels se fixent respectivement les microfilaments d'actine et les filaments intermédiaires de kératine. L'ensemble forme un réseau qui assure la cohésion du massif épidermique. Les kératinocytes servent de bouclier de protection, mais participent également activement à la production de substances variées, qui jouent un rôle dans la cicatrisation et la défense de l'organisme contre les agents infectieux ou les agresseurs extérieurs.

b) Les mélanocytes

Les mélanocytes constituent 3 à 8% des cellules épidermiques et élaborent les pigments naturels de la peau, les mélanines, au sein d'organites spécialisés appelés mélanosomes (78, 88). Les mélanocytes sont des cellules dendritiques localisées au niveau de la couche basale de l'épiderme ou dans la matrice des follicules pileux. Les mélanosomes sont transmis aux kératinocytes dans lesquels ils se rassemblent et forment une sorte de toit au noyau qui protège l'ADN de la lumière du soleil. Ils sont transférés des mélanocytes aux kératinocytes voisins par l'intermédiaire des dendrites des mélanocytes. Un mélanocyte et l'ensemble des kératinocytes basaux (10 à 20 chez le chien) auxquels il fournit des mélanosomes constituent une « unité de mélanisation épidermique ». Sous l'effet des UV, les kératinocytes sécrètent l'hormone alpha-MSH, par scission de la pro-opiomélanocortine (POMC), avec l'intervention d'une protéine appelée p53. L'alpha-MSH s'attache aux mélanocytes et stimule la production de mélanine.

c) Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans constituent 3 à 8 % des cellules de l'épiderme (78). Ce sont des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes que l'on retrouve dans le tissu cutané, entre les kératinocytes des couches basale et épineuse de l'épiderme, plus particulièrement dans la couche épineuse, les ganglions lymphatiques et quelques autres organes à muqueuse malpighienne (69, 117). Elles phagocytent les antigènes à la surface de la peau et migrent dans le ganglion lymphatique afférent où elles présentent l'antigène aux lymphocytes T. Elles sont responsables du déclenchement de la réponse immunitaire spécifique. Ce ne sont pas des cellules épidermiques car elles proviennent de la moelle osseuse et migrent vers l'épiderme où elles s'intercalent, entre les kératinocytes, sur toute la hauteur de la couche malpighienne. Ce sont des cellules qui comportent une douzaine de dendrites formant un réseau étendu à l'ensemble du tégument et entourant les kératinocytes.

d) Les cellules de Merkel

Les cellules de Merkel ont pour origine la crête neurale. Elles sont localisées spécifiquement au niveau de la couche basale épidermique. Elles appartiennent au système neuroendocrinien diffus. Ce sont des mécanorécepteurs sensibles au toucher, à la pression et au tremblement, et capables de produire de nombreux neuromédiateurs (78). Les cellules de Merkel entretiennent des connexions "synaptiques" avec des terminaisons nerveuses cutanées, formant ainsi le complexe neurite-cellules de Merkel. Une seule fibre peut innerver plus de 50 cellules de Merkel. Ce complexe est un mécanorécepteur à adaptation lente (jusqu'à 30 minutes), ce qui signifie qu'il peut traduire une stimulation mécanique en influx nerveux pendant toute la durée de la déformation mais uniquement sur une zone très limitée. Les cellules de Merkel se regroupent au niveau de la couche basale de l'épiderme pour former l'organe de Merkel, un mécanorécepteur sensible à la pression, en intensité et en durée, et d'innervation rapide. L'autre caractéristique principale de ces cellules est leur richesse en neuropeptides et médiateurs de toutes sortes (enképhaline, chromogranine, sérotonine, substance P, somatostatine, sécrétogranine,...) stockés dans des granules neurosécrétoires et relargables sous l'effet d'une stimulation. Le nombre de molécules contenues dans ces granules donne la capacité aux cellules de Merkel de communiquer avec de nombreux types cellulaires, en plus des neurones, ce qui leur vaut l'attribution du titre de "cellules neuroendocrines". Les cellules de Merkel ne sont présentes qu'au niveau des tubercules tylotriches, zones d'épaississement épidermiques ovoïdes en étroite relation avec un tissu richement vascularisé et innervé. Elles

se distinguent des autres cellules épidermiques par la présence, dans leur cytoplasme, de granules denses, très riches en médiateurs biochimiques, par leur forme ovale, leur petite taille (15 µm environ) et un noyau important et plurilobé. Le cytosquelette des cellules de Merkel contient des kératines d'épithéliums simples (K20) à la différence des kératinocytes qui contiennent des kératines d'épithéliums stratifiés. Elles peuvent se lier, par l'intermédiaire de desmosomes, aux cellules avoisinantes.

e) Les lymphocytes T

Les lymphocytes T sont le dernier type de cellules que l'on trouve dans l'épiderme normal. Ils jouent un grand rôle dans la réponse immunitaire secondaire. Ils sont responsables de l'immunité cellulaire : les cellules reconnues comme étrangères, c'est-à-dire autres que celles que les cellules T ont appris à tolérer lors de leur maturation, sont détruites par un mécanisme complexe.

2) Les couches cellulaires de l'épiderme

On distingue, chez le chien, 4 à 5 couches cellulaires: la couche cornée, la plus superficielle et la plus épaisse, la couche claire, présente seulement au niveau des coussinets et de la truffe, puis la couche granuleuse, la couche épineuse et enfin la couche basale, la plus profonde (110).

a) Stratum corneum

Le *stratum corneum* ou couche cornée, est la couche la plus superficielle de l'épiderme. Elle est composée principalement de cellules mortes, aplaties, anucléées et éosinophiles appelées cornéocytes dont la perte du noyau cellulaire résulte de la différenciation épidermique. Ces cellules sont constituées d'une enveloppe cornée riche en involucrine et en loricrine et d'un cytoplasme gorgé d'une matrice filamenteuse dense formée par des filaments de kératine agrégés par de la filaggrine (66, 91, 95). Les cornéocytes sont reliés entre eux par des desmosomes particuliers appelés cornéodesmosomes et par un ciment intercellulaire lipidique issu du contenu des corps lamellaires déversé dans les espaces interkératinocytaires. La fonction protectrice de la peau est en grande partie due à la couche cornée : un très faible contenu en eau, associé à un pH acide (moins chez le chien que chez l'homme), la présence de protéases, de lipides à propriété antibactérienne et d'une flore bactérienne commensale en font une barrière efficace, de première ligne, contre les invasions bactériennes. Dans la couche cornée, on trouve des "facteurs d'hydratation naturels" (naturel moisturizing factors NMF - acides aminés, acide hyaluronique, glycérol...) qui maintiennent le degré d'hydratation de la peau à un niveau optimal.
L'épaisseur de la couche cornée varie de 5 à 1500 µm, avec une épaisseur moyenne de 13 µm et quarante sept couches cellulaires (61, 84). Elle est plus épaisse au niveau de la truffe et des coussinets. La partie la plus profonde de la couche cornée, appelée *stratum compactum,* est constituée de cellules cohésives alors que la partie la plus superficielle, le *stratum disjunctum*, est composée de cellules en desquamation (72). Ces dernières sont continuellement éliminées par exfoliation et sont remplacées par les cellules de la couche inférieure (78) : l'épiderme a donc une épaisseur constante (65). Cette desquamation résulte de l'action de protéases, une quinzaine au moins, qui clivent les protéines constitutives des cornéodesmosomes. Le passage de la couche basale à la couche cornée prend environ 22 jours chez le chien (1).

b) *Stratum lucidum*

Le *stratum lucidum*, ou couche claire, est une couche complètement kératinisée, constituée de cellules mortes. Elle est très développée dans l'épiderme des coussinets, moins développée au niveau de la truffe et absente des autres régions de la peau normale (102, 117).

c) *Stratum granulosum*

Le *stratum granulosum*, ou couche granuleuse, constitue la couche de cellules nucléées la plus superficielle de l'épiderme. Elle n'est pas présente sur toute la surface cutanée. Dans les zones poilues, on compte une à deux couches cellulaires tandis que, dans les zones glabres, elle contient quatre à huit couches cellulaires (102, 117), à l'exception de la truffe avec trois à quatre assises cellulaires et des coussinets où l'on en dénombre quinze. Elle est formée de cellules aplaties parallèlement à la surface et dont le noyau commence à dégénérer (78). Le cytoplasme des cellules de la couche granuleuse contient des grains de kératohyaline visibles en microscopie photonique, dont le principal constituant est la profilaggrine, qui sera scindée en filaggrine au sein des kératinocytes (91). La propriété de la filaggrine est de se déposer sur les tonofilaments, favorisant ainsi leur agglomération en macrofibrilles et la formation de la kératine. On trouve aussi dans ces cellules des corps lamellaires, aussi appelés kératinosomes ou corps d'Odland, invisibles en microscopie photonique : ils sont synthétisés par les kératinocytes de la couche granuleuse et renferment des lipides et d'autres substances. L'excrétion de leur contenu s'effectue dans l'espace intercellulaire de l'interface couche granuleuse/couche cornée. Les lipides sont lysés dans les couches supérieures et forment un ciment intercellulaire comblant les espaces vides et liant les cellules mortes entre elles (66, 74, 118).

d) *Stratum spinosum*

Le *stratum spinosum*, aussi appelé corps muqueux de Malpighi ou couche épineuse, est mince, dans les zones glabres, avec une à deux assises cellulaires. Il est plus épais au niveau des coussinets, où il y a jusqu'à vingt assises cellulaires, au niveau de la truffe, avec trente-cinq couches cellulaires et au niveau des jonctions cutanéo-muqueuses (76). Les kératinocytes qui composent cette couche 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. Ils sont reliés entre eux par des desmosomes, qui forment des ponts épineux, ce qui explique le nom donné à cette couche. Les cytokératines synthétisées par ces kératinocytes sont les K1 et les K10 (78). Le corps muqueux contient également des cellules de Langerhans dont les prolongements dendritiques rentrent en contact les uns avec les autres de manière à former un réseau et s'infiltrent jusqu'à la couche granuleuse vers le haut et jusqu'à la jonction dermo-épidermique, vers le bas. On y trouve aussi de nombreux mélanocytes.

e) *Stratum germinativum*

Le *stratum germinativum*, ou encore *stratum basale* ou couche basale, est la couche la plus profonde de l'épiderme. Elle est formée d'une seule assise de kératinocytes qui contient les cellules souches épidermiques qui peuvent se multiplier et donner naissance aux autres kératinocytes du massif épidermique : alors que les cellules souches restent dans la couche basale, les cellules filles migrent dans les couches supra-basales (60, 74). La couche basale repose sur la jonction dermo-épidermique formée par la lame basale. Le noyau des kératinocytes de cette couche est arrondi et est situé au pôle basal de la cellule. Ce sont des

cellules actives, sécrétrices : leur réticulum endoplasmique granuleux est volumineux, leur appareil de Golgi développé et leurs cytoplasmes contiennent de nombreuses mitochondries. Les cytokératines synthétisées par les kératinocytes basaux sont K5 et K14 (78).
Entre les kératinocytes, on peut trouver des cellules de Merkel ou de Langerhans qui ne sont attachées ni à la membrane basale ni aux autres cellules. Les kératinocytes sont reliés entre eux par des desmosomes et adhèrent à la lame basale par des hémidesmosomes. La couche basale a un aspect plus ou moins ondulé et sa surface est donc supérieure à la surface corporelle. Chez le chien, l'aspect de la couche basale est plus rectiligne que chez l'homme.

f) La lame basale

La lame basale est incluse dans la zone appelée jonction dermo-épidermique. Cette dernière est une structure de 1 à 2 µm d'épaisseur constituée de nombreux complexes protéiques. Elle est organisée de manière à empêcher une disjonction entre le derme et l'épiderme par les forces de cisaillement. Chez le chien, elle ne forme pas de papilles, ni de crêtes épidermiques, sauf au niveau des coussinets, de la truffe et du scrotum (91). La lame basale est élaborée conjointement par les kératinocytes et les fibroblastes. Outre son rôle d'adhérence, elle permet un contrôle des échanges entre ces deux compartiments ; elle oriente la polarité de croissance des cellules épidermiques, organise et oriente le cytosquelette des kératinocytes basaux et transmet des signaux de croissance et de multiplication.
La lame basale est constituée de trois couches principales : la *lamina lucida*, superficielle, claire à la microscopie électronique et contenant du collagène de type XVII et l'intégrine αβ64, la *lamina densa*, plus sombre à la microscopie électronique et contenant du collagène de type IV, et la couche fibroréticulaire ou *sub-lamina densa*, contenant du collagène de type VII. De nombreuses protéines et laminines sont également retrouvées dans ces couches. Les cellules basales sont attachées par des hémidesmosomes à la lamina densa. Du côté dermique, des fibrilles d'ancrage de collagène de type VII attachent la face inférieure de la lamina densa aux fibres de collagène du derme papillaire, tandis que des microfibrilles de fibrilline l'attachent aux fibres élastiques. De plus, la zone immédiatement sous-jacente à la lamina densa contient d'importantes quantités de fibronectine.

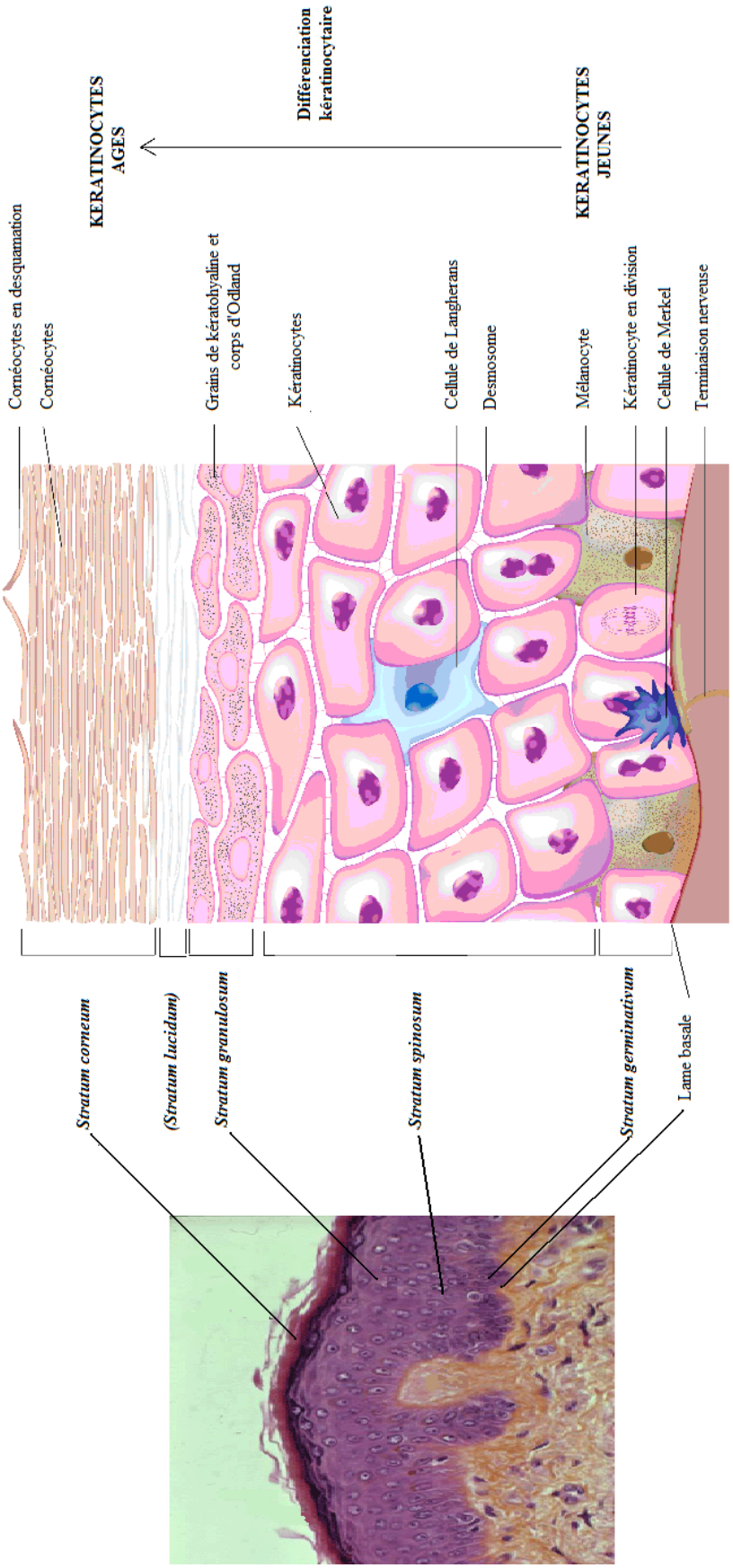


Figure 1 : Structure de l'épiderme d'un chien, d'après http://www.oleassence.fr/pour-une-belle-peau-naturelle et http://www.vetopsy.fr/sens/soma/tact/tact1_recept.php&

B) Le derme

C'est un tissu conjonctif innervé et vascularisé, d'origine mésenchymateuse, constitué principalement d'eau et de fibres protéiques noyées dans un gel réticulaire de mucopolysaccharides et de protéoglycanes (84). Il joue un rôle majeur dans la nutrition, le soutien et la protection de l'épiderme et des annexes cutanées, mais est aussi impliqué dans la thermorégulation, la cicatrisation et la défense contre les pathogènes grâce à la présence de cellules immunitaires (cellules dendritiques du derme, monocytes, macrophages et lymphocytes T). Au niveau des zones glabres, la partie superficielle du derme s'invagine à la jonction avec l'épiderme sous forme de crêtes, augmentant la surface de contact avec l'épiderme et permettant une meilleure adhésion entre ces deux couches. Le derme contient les fibres nerveuses, qui peuvent pénétrer la lame basale pour aller innerver l'épiderme ou être reliées à des terminaisons nerveuses encapsulées jouant notamment le rôle de mécanorécepteurs tactiles. Il est également composé de vaisseaux sanguins, qui ne rentrent pas dans l'épiderme. Dans les zones poilues, l'adhésion du derme à l'épiderme est renforcée par les follicules pileux. Les cellules principales du derme sont les fibroblastes qui vont synthétiser deux types de fibres protéiques : les fibres de collagène et les fibres d'élastine, constituants de la matrice extracellulaire (78, 84). La grande majorité des fibres présentes dans le derme sont des fibres de collagène (>90%) essentiellement de type 1 et 3, responsables de la résistance mécanique de la peau, alors que les fibres d'élastine, elles, participent à son élasticité. Au niveau du derme, on trouve enfin des vaisseaux lymphatiques et les annexes cutanées : les follicules pileux, associés étroitement aux glandes sébacées et aux glandes sudoripares (74, 78).

II/ La barrière cutanée

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. La fonction barrière est, souvent, vue comme un obstacle à la pénétration de substances à l'intérieur d'un individu mais 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, même une lésion d'apparence peu profonde va altérer cette barrière et entraîner une perte d'eau au travers de cet épiderme lésé.

A) Une barrière chimique et biochimique

Elle permet de lutter contre les allergènes, les germes et les éléments irritants. De nombreuses observations révèlent qu'une couche cornée défectueuse est plus favorable au développement d'hypersensibilités. Ainsi, des chercheurs ont montré que les chiens atopiques, sur lesquels avait été créée une rupture de la barrière par retrait mécanique du *stratum corneum*, présentaient une sensibilisation accrue aux allergènes exogènes (85).

1) Le pH de la couche cornée

La peau du chien a un pH acide à neutre, variant entre 5,5 et 7,5 (75, 98). Des variations significatives sont observées entre les races, suivant le sexe et suivant les régions du corps (94). Au niveau de la truffe et des coussinets plantaires, le pH est plus alcalin : 7,1-7,4. Les grandes races ont un pH plus élevé, de 7,4 en moyenne, contre 6,3 pour les petites races (111).

Il existe un gradient de pH dans l'épiderme qui diminue des couches les plus profondes vers la surface de la couche cornée. Cette acidification de l'épiderme provient d'au moins trois origines distinctes : de la production d'acides gras libres issus des phospholipides membranaires grâce à la phospholipase 2, de l'activité de pompes échangeuses d'ions sodium/protons au niveau de la couche granuleuse et, enfin, de la présence de l'acide trans-urocanique du FNH (42).
L'acidité de la couche cornée participe à la fonction antimicrobienne de la peau en régulant la flore bactérienne et en évitant l'implantation de bactéries pathogènes. Elle participe également à la régulation de la desquamation (cf. p 35).

2) Les enzymes hydrolytiques et les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont synthétisés par les kératinocytes et les polynucléaires neutrophiles ; on y trouve les β-défensines et les cathélicidines (32). Ils forment une première ligne de défense vis-à-vis des pathogènes. En effet, ils sont capables de tuer directement un large spectre d'agents pathogènes, tels que certaines bactéries Gram négatif et Gram positif, des champignons et certains virus, et ils possèdent un pouvoir chimiotactique pour les polynucléaires neutrophiles. Ils ont trois modes d'action : ils peuvent entraîner une rupture mécanique ou une destruction enzymatique des membranes bactériennes ; ils peuvent aussi séquestrer des nutriments comme le Fe3+, ce qui empêche les proliférations bactériennes.
Les enzymes hydrolytiques sont des protéases, DNAses, et collagénases qui vont empêcher les multiplications bactériennes.

3) La flore commensale cutanée

La flore cutanée à un rôle majeur de barrière biologique. En effet, de nombreuses bactéries vivent en symbiose, sur la peau saine, en surface et dans l'infundibulum des follicules pileux (99). Cette flore peut varier sous l'influence de facteurs environnementaux. Les agents pathogènes vont se retrouver en compétition avec cette flore locale. De plus, de nombreuses bactéries commensales produisent des substances antibactériennes, comme par exemple *Staphylococcus sp*.
La peau du chien abrite une flore microbienne variée, composée de bactéries et de champignons, à laquelle s'ajoutent des *Demodex*. La flore bactérienne cutanée est acquise par les chiots au contact de leur mère. Cette acquisition se fait progressivement, au cours de la période néonatale. Elle commence dès que la membrane amniotique est percée. Celle-ci, intacte lorsque les chiots naissent, est déchirée par la mère avec ses crocs, immédiatement après la mise bas, puis la chienne va alors nettoyer ses petits en les léchant. L'humidité due au léchage et la promiscuité entre les chiots favorisent la prolifération bactérienne. Les organismes résidents sont capables de se multiplier sur la peau normale et d'y persister à long terme (99). Ce sont des commensaux non pathogènes. Cette flore résidente ne s'étend pas sur toute la surface cutanée, mais est regroupée en microcolonies de tailles variées. Chez le chien, les bactéries composant la flore résidente sont : *Micrococcus spp*, les Staphylocoques coagulase négative (*S. epidermidis, S. xylosus*), les Streptocoques α-hémolytiques, *Clostridium spp, Propionibacterium acnes, Acinetobacter spp* et des aérobies Gram négatif. L'hôte tolère la présence de ces commensaux en contrepartie des bénéfices qu'ils lui apportent et, notamment, l'exclusion d'autres agents pathogènes des niches écologiques par compétition.
Le nombre d'organismes résidents varie selon les individus et, sur un individu donné, selon les régions du corps. Les zones chaudes et humides comportent plus de bactéries que les

zones froides et sèches. En revanche, la densité de la flore d'un individu donné reste constante, à moins d'être modifiée par des changements dans le microclimat cutané.

B) Une barrière immunologique

Elle est formée par les constituants du système immunitaire et fait appel à l'immunité innée et acquise. On y trouve notamment :

1) Les cellules de Langerhans de l'épiderme (cf. p 18)

2) Les histiocytes et macrophages

Les histiocytes sont des cellules de taille importante faisant partie du système immunitaire. Ce sont les monocytes du tissu conjonctif qui dérivent de la moelle osseuse. Au départ, les monocytes immatures passent la barrière moelle/sang. Après un court séjour dans le sang, ils traversent la barrière endothéliale pour migrer dans le derme. Là, ils se différencient en histiocytes. L'histiocyte et le macrophage sont la même cellule ; l'histiocyte est la forme non activée sans activité phagocytaire, le macrophage est la forme activée qui possède une activité phagocytaire. En microscopie électronique, on observe des lysosomes autour de son noyau. On distingue aussi un appareil de Golgi assez développé. Histiocytes et macrophages sont des cellules résidentes du derme.

3) Les cellules dendritiques du derme

Les cellules dendritiques sont des cellules du système immunitaire qui font partie du système réticulohistiocytaire. Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes qui possèdent des dendrites, c'est-à-dire des prolongements cytoplasmiques. Les cellules dendritiques dermiques ont pour fonction principale le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative. Elles résident dans le derme à la périphérie des vaisseaux sanguins et sont à l'état immature.

4) Lymphocytes, plasmocytes et polynucléaires

Les lymphocytes sont des leucocytes qui ont un rôle majeur dans le système immunitaire. On distingue les lymphocytes B et les lymphocytes T. Les lymphocytes T jouent un rôle dans les réponses immunitaires primaire et secondaire, notamment pour cette dernière grâce aux lymphocytes T mémoires. Les lymphocytes B participent à l'immunité humorale. Il existe deux types de lymphocytes B : les plasmocytes, stade final de la différenciation des lymphocytes B, et les lymphocytes B mémoires, qui sont formés spécifiquement contre les antigènes rencontrés lors de la réponse immunitaire primaire. Les lymphocytes mémoires sont des cellules résidentes du derme, les autres lymphocytes sont des cellules de passage.

Les polynucléaires sont des cellules sanguines appartenant à la lignée blanche et qui ont un rôle dans le système immunitaire. Au niveau du derme, on va essentiellement rencontrer des polynucléaires neutrophiles et des polynucléaires éosinophiles. Les neutrophiles peuvent vivre 2 à 3 jours dans le derme, tandis que les éosinophiles peuvent y vivre une dizaine de jours.

C) Une barrière physique

Elle correspond à la couche cornée et est assurée par la forte cohésion entre les kératinocytes qui permet à l'épiderme de résister aux agressions extérieures.
La couche cornée absorbe aussi une partie du rayonnement ultraviolet grâce à la présence en quantité importante d'acide urocanique, un dérivé de l'histidine.
De plus, la constante desquamation limite l'ancrage des pathogènes en surface (70).

1) Les structures d'adhésion

On trouve différents types de jonctions responsables de l'adhésion et de la cohésion intercellulaire dans l'épiderme. Ce sont les jonctions serrées, les jonctions communicantes, les jonctions adhérentes et les desmosomes (95).
Les hémidesmosomes quant à eux permettent d'ancrer les kératinocytes basaux et donc l'épiderme à la lame basale et au derme.

a) Les jonctions serrées (Fig 2)

Ce sont des jonctions intercellulaires qui permettent de souder les cellules entre elles, de contrôler leur transit moléculaire et de séparer les lipides des pôles apical et basolatéral (6). Dans l'épiderme, ces structures sont localisées dans la couche granuleuse et la couche cornée où elles ont un rôle dans le maintien de la fonction de barrière en limitant les pertes hydriques, ainsi que dans la kératinisation et l'exfoliation en permettant une certaine étanchéité entre les strates de la couche cornée. Les jonctions serrées sont composées de deux types de protéines, les claudines et les occludines (95). On trouve également des cadhérines Ca^{2+} dépendantes et des protéines de jonction qui relient le tout aux microfilaments d'actine : ZO1 et ZO2 (ZO pour "zonula occludens"). C'est ZO1 qui s'accroche à l'occludine et ZO2 s'accroche sur ZO1.

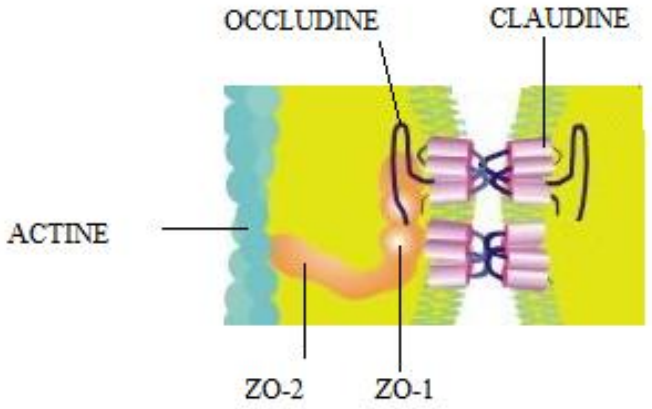


Figure 2 : Jonction serrée, d'après http://www.ulysse.u-bordeaux.fr

b) Les jonctions communicantes (gap junctions) (Fig 3)

Elles sont constituées de protéines transmembranaires, les connexines, qui s'assemblent en complexes hexamériques, les connexons, afin de former des pores de 2 nm entre deux cellules adjacentes. Elles permettent le passage intercellulaire d'ions et de petites molécules, mais assurent également un couplage électrique entre les cellules (95). La connexine 43 est la plus fortement exprimée dans l'épiderme.

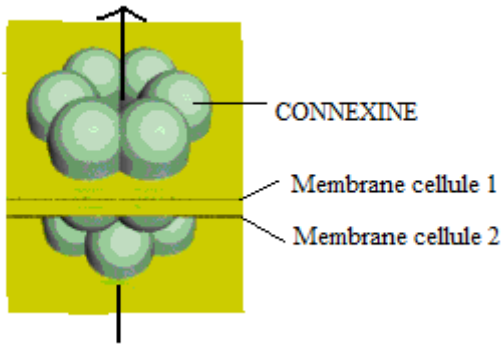


Figure 3 : Jonction gap, d'après http://fr.wikipedia.org/wiki/Jonction_communicante

c) Les jonctions adhérentes (zonula adherens) (Fig4)

Les jonctions adhérentes sont voisines des desmosomes. Elles s'en différencient par la nature des protéines les constituant : les protéines transmembranaires sont des cadhérines E ou P, les protéines de la plaque cytoplasmique sont des caténines et les filaments qui s'y fixent sont les microfilaments d'actine. Ces jonctions ont de nombreux rôles : elles assurent notamment l'adhérence entre les épithéliums (95) et ont un rôle dans la communication et dans l'orientation des cellules.

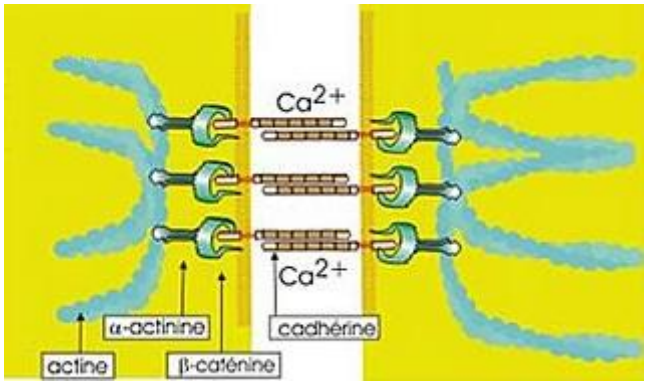


Figure 4 : Jonction adhérente, d'après http://www.ulysse.u-bordeaux.fr

d) Les desmosomes et les cornéodesmosomes

Comme les jonctions adhérentes, les desmosomes appartiennent à la famille des jonctions d'ancrage. Ils permettent de fixer solidement deux cellules épithéliales adjacentes et participent à la cohésion tissulaire en permettant l'ancrage des filaments intermédiaires de kératines de deux kératinocytes voisins en un même point d'adhésion (95). Les desmosomes sont présents dans toutes les couches épidermiques et prennent le nom de cornéodesmosomes dans la couche cornée.

Les desmosomes (Fig 5) sont des structures moléculaires complexes organisées autour de glycoprotéines transmembranaires, les cadhérines desmosomales. Les domaines extracellulaires des cadhérines sont situés dans l'espace intercellulaire desmosomal, ou desmoglée, pour assurer l'adhésion entre les cellules voisines. La partie intracellulaire de ces protéines est associée aux plaques desmosomales, plaques ovales de 0,3 à 0,7 micromètres de diamètre et de plus de 100 Angström d'épaisseur, formées de nombreuses protéines

cytoplasmiques et où s'insèrent les filaments intermédiaires de kératines (36). Les principales protéines de la plaque desmosomale appartiennent à deux grandes familles : la famille armadillo et la famille des plakines. Les membres de la famille armadillo sont la plakoglobine, molécule adaptatrice liant les cadhérines telles que la desmocolline ou la desmogléine à des protéines de plaque. La famille des plakines est principalement représentée par les desmoplakines, dont l'envoplakine et la périplakine, responsables de la liaison entre les protéines armadillo et les filaments intermédiaires de kératines (51). Les desmocollines et desmogléines sont des CAM (Cell Adhesion Molecules) homophiles et homotypiques. Pour se lier, elles ont besoin d'ions calcium Ca^{2+}, qui changent leur conformation et permettent de les assembler selon le principe clé-serrure.

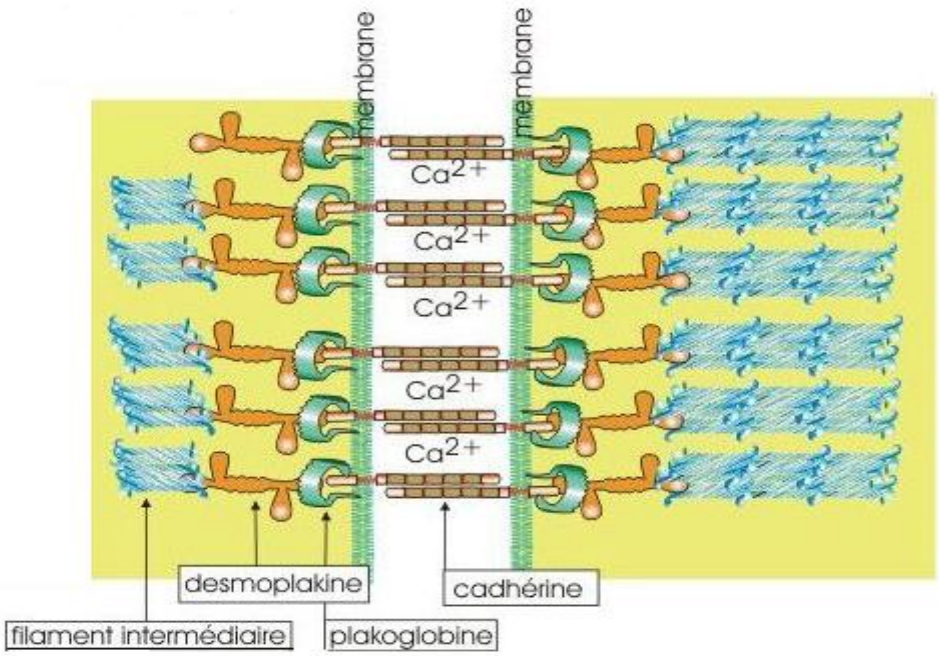


Figure 5 : Desmosome, d'après http://www.ulysse.u-bordeaux.fr

Les constituants des desmosomes sont exprimés de manière séquentielle lors de la différenciation épidermique. La desmogléine 2 est retrouvée exclusivement dans la couche basale. Les desmocollines 2 et 3 et la desmogléine 3 sont très fortement exprimées dans la couche basale et sont progressivement remplacées par les desmogléines 1 et 4 et la desmocolline 1 lors du déplacement des kératinocytes vers les couches supérieures. De façon similaire, tandis que la plakophiline 3 reste constante dans toutes les couches de l'épiderme, la plakophiline 2 est graduellement remplacée par la plakophiline 1.
Lors de la transition entre la couche granuleuse et la couche cornée, les desmosomes vont subir de profonds changements morphologiques en devenant des cornéodesmosomes : la plaque desmosomale est progressivement incorporée à l'enveloppe cornée jusqu'à devenir invisible en microscopie électronique et le cœur intercellulaire se densifie. La cohésion de la couche cornée est dépendante de la présence de ces cornéodesmosomes. Toutes les protéines qui les composent sont déjà présentes dans les desmosomes de l'épiderme sauf une qui est, à ce jour, la seule protéine spécifique connue des cornéodesmosomes : la cornéodesmosine. C'est une protéine adhésive contenue dans les corps d'Odland des kératinocytes granuleux et déversée dans l'espace intercornéocytaire (43, 96, 97).

e) Les hémidesmosomes

Les hémidesmosomes sont semblables aux desmosomes sauf qu'ils relient une cellule à la membrane basale. Il n'y a donc qu'une seule moitié du dispositif en place. Les composants transmembranaires sont l'intégrine α6β4, l'antigène BP180 et la molécule CD151. La plaque cytoplasmique interne est reliée aux filaments intermédiaires de kératine par l'intermédiaire de la plectine et de l'antigène BP230. Les laminines sont les intermédiaires entre les différents types de collagène, formant la lame basale, ou la matrice extracellulaire et l'hémidesmosome.

2) La différenciation épidermique : formation de la couche cornée

La différenciation épidermique recouvre l'ensemble des phénomènes biochimiques, morphologiques et moléculaires, finement régulés, qui transforment les kératinocytes basaux, cellules nucléées et se multipliant activement, en cornéocytes, cellules mortes, cornifiées et anucléées. Les étapes ultimes de ce programme correspondent à la kératinisation ou cornification. C'est elle qui permet d'aboutir à une véritable barrière physique.
La cornification concerne tous les constituants du kératinocyte basal. Le cytoplasme est transformé en matrice fibreuse et amorphe constituée de macrofibrilles de kératine. La membrane plasmique est remplacée par une coque protéique rigide appelée enveloppe cornée. Enfin, l'espace intercornéocytaire est rempli de lamelles lipidiques et les desmosomes deviennent des cornéodesmosomes. Ces derniers sont progressivement dégradés, au fur et à mesure que les cornéocytes progressent vers la surface de la couche cornée, ce qui permet la libération des cornéocytes au cours de la desquamation.

a) Les produits des kératinocytes

i) Les kératines

Les kératines sont des éléments du cytosquelette, composants des filaments intermédiaires des cellules épithéliales. Elles sont les protéines structurales principales de l'épiderme constituant jusqu'à 85% des protéines totales des cornéocytes (10). Elles possèdent toutes la même organisation structurale avec un domaine central en hélice, d'environ 310 acides aminés, encadré par un domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal de tailles extrêmement variables et de structures non hélicoïdales.
Les kératines comptent plus de cinquante protéines regroupées en deux familles sur la base de leurs séquences protéiques : les kératines acides de type I (K9 à K28) et les kératines basiques de type II (K1 à K8 et K71 à K80). La polymérisation des filaments de kératines s'effectue grâce à l'assemblage d'hétérodimères de kératines acides et basiques (10). Les hétérodimères s'assemblent, dans un deuxième temps, en tétramères qui s'associent, à leur tour, par leurs extrémités pour former un protofilament. C'est l'association et le compactage de plusieurs protofilaments qui donnent naissance aux filaments intermédiaires de kératines de 10 à 12 nm de diamètre (41). Ceux-ci s'organisent dans la cellule en un réseau qui permet de relier la membrane nucléaire à la membrane plasmique où ils sont liés aux protéines desmosomales. Les cellules épithéliales coordonnent ainsi l'expression d'au moins deux gènes pour produire un réseau de kératines.
Les kératinocytes de l'épiderme expriment différents hétérodimères de kératines, selon leur degré de différenciation. En effet, les kératines K5 et K14 sont exprimées dans les cellules non différenciées de la couche basale alors que leur expression est inhibée dans les couches supérieures. Les kératines K1 et K10, elles, sont caractéristiques des couches suprabasales. Le

fait d'avoir deux types de kératines à chaque fois limite les conséquences d'une mutation de l'une d'elles (23).
Enfin, le réseau de filaments intermédiaires de kératines est hautement dynamique et n'aurait pas seulement une fonction de protection de la cellule mais serait également impliqué dans d'autres fonctions régulatrices et voies de signalisation intracellulaires comme la protection contre le stress, la cicatrisation cutanée et l'apoptose (41).
Au cours de la cornification, les filaments intermédiaires de kératines vont s'agréger pour former la matrice fibreuse intracornéocytaire indispensable à la résistance mécanique de l'épiderme. Cette agrégation est permise par l'intervention d'un polypeptide de la famille des protéines associées aux filaments intermédiaires : la filaggrine (pour filament aggregating protein) (33).

ii) La filaggrine

La filaggrine est une protéine au métabolisme complexe, d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur basique de haut poids moléculaire (400 kDa), la profilaggrine (12, 100). Le gène de la profilaggrine, formé de 3 exons, est localisé sur le chromosome 1q21 dans une région appelée complexe de différenciation épidermique. La profilaggrine est synthétisée puis phosphorylée et stockée dans les grains de kératohyaline des kératinocytes épineux et surtout granuleux. A la transition couche granuleuse/couche cornée, la profilaggrine est déphosphorylée avant d'être clivée, par protéolyse, en sous-unités fonctionnelles, les monomères basiques de filaggrine. Les monomères ainsi libérés s'associent aux filaments intermédiaires de kératines par des interactions ioniques afin de favoriser l'agrégation et la stabilisation du réseau de kératines (100). Cette association pourrait également permettre d'empêcher une protéolyse trop rapide de la filaggrine (13). Dans le *stratum compactum*, les sous-unités de filaggrine sont désiminées (transformation de résidus arginyl en résidus citrullyl) par une ou plusieurs peptidyl-arginine désiminases. Cette modification entraîne un changement de charge, la filaggrine devient alors acide et perd son affinité pour la kératine. Les sous-unités de filaggrine se détachent de la matrice et sont complètement protéolysées, dans les cornéocytes superficiels, en acides aminés libres tels que l'acide glutamique ou l'acide aspartique entrant dans la composition du FNH (100).
Différentes protéases sont impliquées dans ce métabolisme complexe. Tout d'abord la furine pourrait cliver le peptide N-terminal, tandis que la calpaïne, une protéase à cystéine, et l'endopeptidase de la profilaggrine (PEP-1) ont été impliquées dans le clivage des peptides de liaison pour permettre la libération des monomères de filaggrine. D'autres protéases permettraient la conversion profilaggrine/filaggrine : c'est le cas de la matriptase, une protéase à sérine transmembranaire exprimée dans la plupart des tissus épithéliaux. Cependant, un clivage direct de la profilaggrine par la matriptase doit être écarté étant donné que la profilaggrine est cytoplasmique alors que le site catalytique de la matriptase est extracellulaire. La matriptase, dont l'un des partenaires supposés est la prostasine, pourrait donc appartenir à une cascade protéolytique qui aboutirait secondairement à la protéolyse de la profilaggrine.
La caspase 14 est un membre isolé de la famille des caspases (protéases à cystéine spécifiques des résidus aspartate), protéines habituellement impliquées dans l'inflammation et l'apoptose. Elle est exprimée uniquement dans les couches les plus différenciées de l'épiderme et c'est la seule caspase à y être présente sous sa forme activée. Deux mécanismes de clivage ont été envisagés : soit une coupure directe de la filaggrine qui permettrait d'exposer des sites de clivage pour d'autres endo- ou exopeptidases, soit un mécanisme indirect où la caspase 14 activerait une endo- ou une exopeptidase qui cliverait ensuite la filaggrine (18). Bien que les enzymes responsables du clivage spécifique de la filaggrine n'aient pas encore été

définitivement identifiées, le “signal” initiant cette protéolyse pourrait être le degré d’hydratation de la couche cornée, qui assurerait une sorte de rétrocontrôle de la production du FNH et donc de l’hydratation (53).

iii) Les lipides épidermiques

Les lipides intra-épidermiques sont synthétisés par les kératinocytes. Ils jouent un rôle fondamental dans la structure de l’épiderme et dans ses fonctions, notamment dans la cohésion cornéocytaire et dans le maintien et le contrôle de l’hydratation de la peau. Ils seront abordés en détail ultérieurement (cf. p 37).

b) Formation de l’enveloppe cornée

i) Généralités

Lors de la différenciation terminale, la membrane plasmique des kératinocytes est doublée sur sa face interne par une structure mince, insoluble, imperméable et résistante, constituée de précurseurs protéiques liés entre eux par des ponts disulfures et d’autres liens covalents. Cette structure, appelée enveloppe cornée, est indispensable aux fonctions de barrière de l’épiderme. Elle est visible en microscopie électronique sous la forme d’une couche dense aux électrons, d’environ 10 nm d’épaisseur (51), entourant les cornéocytes et associée à une monocouche de lipides d’environ 5 nm d’épaisseur (47, 51, 66, 95). L’enveloppe cornée est composée de plusieurs protéines structurales, notamment l’involucrine et la loricrine, liées par des oxydases sulfhydriles et des transglutaminases (52, 66). La surface interne de l’enveloppe cornée est liée aux macrofibrilles de filaments de kératine qui remplissent le cytoplasme des cornéocytes. Les nombreux cornéocytes de la couche cornée contribuent à la résistance et à l’élasticité de la structure des lamelles lipidiques intracellulaires. Sur la surface extérieure de l’enveloppe cornée on trouve l’enveloppe lipidique cornéocytaire. Cette dernière est une structure hautement insoluble, même en présence d’agents réducteurs comme le β-mercaptoéthanol et le dithiothréitol ; cette insolubilité est due à la présence de liens covalents isodipeptides Nε-(γ-glutamyl)-lysine formés entre des précurseurs protéiques par les transglutaminases.

ii) Les transglutaminases

Les transglutaminases appartiennent à la famille des protéases à cystéine « papainlike », elles catalysent la transamidation de résidus peptidyl glutamines en présence de calcium.
Seules les transglutaminases 1, 2, 3 et 5 sont présentes dans la peau. Les transglutaminases 1, 3 et 5 sont exprimées uniquement dans l’épiderme et participent à la formation de l’enveloppe cornée tandis que la transglutaminase 2 est également présente dans le derme et participe à la formation d’une matrice extracellulaire lors du processus de cicatrisation (63). Les transglutaminases 1 et 3 sont synthétisées sous forme de précurseurs et sont activées, par protéolyse partielle, lors de la cornification, par des protéines telles que la calpaïne 1, la cathépsine D (22), la dispase ou encore les cathépsines L et S. La transglutaminase 1 est une protéine membranaire qui joue un rôle essentiel dans l’assemblage des composants de l’enveloppe cornée. Les souris dont le gène codant la transglutaminase 1 a été invalidé meurent à la naissance suite à un défaut de barrière cutanée induit par des anomalies de formation de l’enveloppe cornée (95). Chez l’Homme, des mutations du même gène sont responsables de l’ichtyose lamellaire de type 1 (66). D’autre part, la transglutaminase 1

participe, *in vitro,* à la formation de l'enveloppe lipidique cornéocytaire en catalysant l'estérification des ω-hydroxycéramides avec un précurseur de l'enveloppe, l'involucrine.
Les transglutaminases 3 et 5 sont cytosoliques. La transglutaminase 3 permet d'oligomériser des précurseurs protéiques qui seront ensuite liés entre eux par la transglutaminase 1 membranaire. La transglutaminase 5 peut former des liaisons avec de nombreux précurseurs protéiques et pourrait également jouer un rôle dans les stades précoces de formation des enveloppes cornées au niveau des plaques desmosomales pour maintenir l'adhésion intercellulaire (8).

iii) Initiation de la formation de l'enveloppe cornée

L'étape d'initiation de la formation de l'enveloppe a lieu au niveau de la couche épineuse.
Les deux premiers précurseurs protéiques sont l'envoplakine et la périplakine. Sous l'effet d'une augmentation de la concentration calcique, ces deux protéines vont s'hétérodimériser grâce à la transglutaminase 5 et s'accumuler au niveau de la face interne de la membrane plasmique, au voisinage des plaques des desmosomes.
Elles sont immédiatement rejointes par une autre protéine, l'involucrine, fixée par la transglutaminase 1 membranaire (51, 66, 107). Alors que la concentration calcique continue d'augmenter, la transglutaminase 1 forme des liaisons entre l'envoplakine et l'involucrine. Il se forme alors une sorte d'échafaudage protéique particulièrement résistant qui recouvre la face interne de la membrane plasmique et incorpore la plaque desmosomale (51).
Curieusement, des souris invalidées pour l'un des gènes codant l'involucrine ou l'envoplakine et la périplakine sont viables et ne présentent aucun phénotype particulier, ce qui suggère une importante redondance des fonctions de ces trois protéines (51, 66). L'étude de souris déficientes simultanément en ces trois protéines structurales a montré un léger retard de formation de la fonction barrière et la présence d'une hyperkératose. Même si la barrière hydrique paraît maintenue chez ces souris « triples knock-out », la barrière mécanique semble être altérée, avec une inhibition de l'activité protéolytique des protéases épidermiques impliquées dans la desquamation et une infiltration de cellules immunitaires dans le derme.

iv) Etape de renforcement de l'enveloppe cornée

Elle comporte deux phases principales. Tout d'abord, les corps lamellaires déversent leur contenu dans les espaces interkératinocytaires à la transition couche granuleuse/couche cornée. Ils sont particulièrement riches en acylglucosylcéramides (27, 51, 66). Ces lipides particuliers ont une très longue chaîne ω hydroxylée, permettant la liaison à l'acide linoléique par une liaison ester. Il serait capable d'aplatir et d'empiler les vésicules lipidiques ; la chaine de l'acide gras est suffisamment longue pour traverser complètement la bicouche lipidique et permettre à la queue linolée de s'insérer au bout de la bicouche suivante. Après extrusion du contenu des corps lamellaires, les acylglucosylcéramides sont déglycosylés en même temps que les autres glucosylcéramides pour produire des acylcéramides. Les acylcéramides et les acylglucosylcéramides sont les deux principaux transporteurs de l'acide linoléique dans la couche cornée et dans l'épiderme. Si ces acides gras sont déficients, on a une faible fonction de la barrière cutanée et une augmentation de la perte d'eau trans-épidermique. Les ω-hydroxycéramides sont liés à l'involucrine par la transglutaminase 1 (8). La conformation spécifique de l'involucrine permet l'attachement des lipides de la surface extérieure à d'autres protéines d'enveloppe sur la surface intérieure de l'enveloppe cornée. Les acylglucosylcéramides sont aussi les précurseurs des ω-hydroxycéramides de l'enveloppe lipidique cornéocytaire.

La deuxième phase du renforcement fait intervenir la loricrine (51). La loricrine est le composant principal de l'enveloppe cornée (jusqu'à 80% de sa masse protéique). Elle est exprimée au niveau de la couche granuleuse et est liée à d'autres protéines, principalement aux SPRs (une famille de petites protéines riches en proline) grâce à l'action de la transglutaminase 3 (48). Ces complexes sont ensuite amenés à la périphérie des kératinocytes et incorporés à l'échafaudage protéique préexistant. D'abondantes liaisons peptidiques sont formées au niveau des desmosomes où de nombreux substrats des transglutaminases sont présents. D'autres protéines sont finalement ajoutées à l'enveloppe cornée comme par exemple les kératines ou la filaggrine.

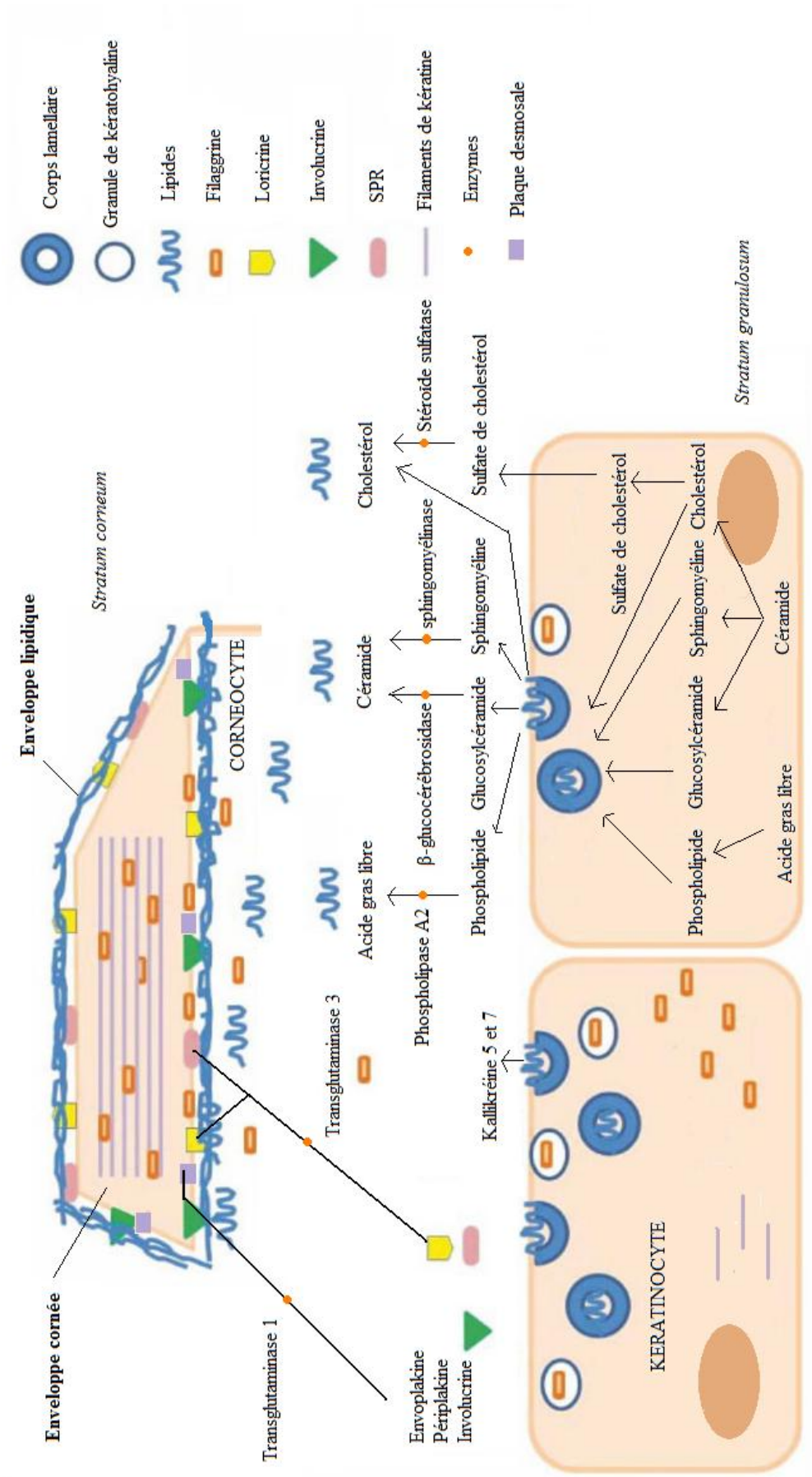


Figure 6 : Formation des enveloppes cornée et lipidique, d'après http://rms.medhyg.ch/article_p.php?ID_ARTICLE=RMS_246_0860

c) La différenciation terminale kératinocytaire

L'épiderme étant constamment soumis à des agressions extérieures, son intégrité est assurée grâce à un équilibre entre prolifération, différenciation et desquamation.
La différenciation terminale kératinocytaire regroupe plusieurs processus : l'ADN est dégradé, le noyau et les organelles disparaissent, et il y a mise en place d'un programme protéolytique. Elle se déroule sur plusieurs semaines. La membrane plasmique est progressivement remplacée par l'enveloppe cornée. Enfin, les cornéocytes sont éliminés par desquamation.

d) La desquamation

Le maintien de l'homéostasie de l'épiderme et le renouvellement constant de la couche cornée sont assurés par une balance finement contrôlée entre la prolifération des kératinocytes basaux et le détachement des cornéocytes à la surface de l'épiderme.
Les cornéodesmosomes sont des desmosomes modifiés par ajout de cornéodesmosine, présente dans les corps lamellaires (40). Une fois libérée, elle s'insinue entre les différents composants extracellulaires des desmosomes. C'est le clivage protéolytique progressif des cornéodesmosomes qui va conduire à l'exfoliation des cornéocytes (64). Les molécules responsables du clivage des cornéodesmosomes sont, pour la plupart, des protéases à sérine, les kallikréines, ou à cystéine, les cathépsines. De nombreux inhibiteurs de protéases, comme le sulfate de cholestérol (cf p 39), sont également présents dans les espaces extracellulaires de la couche cornée et la desquamation passe par un équilibre finement régulé entre ces activités protéasiques et anti- protéasiques. La protéolyse concerne initialement des protéases à sérine : la kallikréine 7 (ou SCCE = *Stratum Corneum* Chymotryptic Enzyme (70)) et la kallikréine 5 (SCTE = *Stratum Corneum* Tryptic Enzyme). Ces deux protéases sont exprimées dans les kératinocytes granuleux puis acheminées via les corps lamellaires dans les espaces intercellulaires à la transition couche granuleuse/couche cornée. La kallikréine 7 peut dégrader la desmocolline 1 et la cornéodesmosine, tandis que la kallikréine 5 peut dégrader, en plus, la desmogléine 1 (97).
Il existe une cascade d'autoactivation entre ces protéases. L'inhibiteur de protéases à sérine LEKTI peut inhiber plusieurs kallikréines, en particulier les types 5 et 7. Il est codé par le gène *SPINK5* et est exprimé dans la couche granuleuse. D'autres inhibiteurs peuvent aussi être impliqués dans cette régulation des kallikréines, comme l'élafine, l'α2-macroglobuline like-1 ou le sulfate de cholestérol. La plupart des études portent sur les protéases à sérine, mais de nombreuses autres protéases ont été identifiées dans la couche cornée, parmi lesquelles des protéases à cystéine, ainsi qu'une protéase à acide aspartique, la cathépsine D, qui sont actives à pH acide et sont aussi capables de dégrader des composants du cornéodesmosome (22). La cathépsine D contribue à l'activation de la transglutaminase 1 par le clivage de son précurseur de 150 kDa en sa forme active de 35 kDa.

e) Régulation du programme de différenciation

i) Le pH

Le pH de la couche cornée, acide ou neutre chez le chien, joue un rôle primordial dans la fonction de barrière et dans la régulation de la cohésion de la couche cornée. Chez la souris, la neutralisation du pH de la couche cornée a pour conséquences des altérations de la fonction de barrière et de l'intégrité de la couche cornée, en activant les protéases à sérines (actives à pH neutre et alcalin) qui dégradent des enzymes clés, impliquées dans la maturation des lipides et

des constituants des cornéodesmosomes. Une augmentation de pH stimule donc la desquamation. Elle entraîne également une inhibition de la sécrétion des corps lamellaires (97).

ii) Le calcium

Le calcium est impliqué dans la prolifération et la différenciation de l'épiderme. De la même manière que pour le pH, il existe un gradient calcique au niveau de l'épiderme, croissant des couches proliératives (concentration inférieure à 0,05 mM) vers les couches les plus différenciées (haut de la couche granuleuse, avec un pic jusqu'à 1,5 mM), puis décroissant à nouveau dans la couche cornée (58).
Ce gradient est essentiel à la différenciation épidermique, il permet de déclencher la sécrétion des corps lamellaires et de réguler la transcription de nombreux gènes impliqués dans la cornification comme ceux des transglutaminases, des protéines S100, de l'involucrine, de la loricrine, de la filaggrine, etc. (24, 109).
Des récepteurs et des canaux calciques ont été identifiés à la surface des kératinocytes. Les canaux calciques permettraient de générer l'influx calcique intracellulaire à partir du calcium extracellulaire, tandis que les récepteurs calciques, dont l'expression diminue lors de la différenciation, permettraient le recrutement des stocks de calcium contenus dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Ce recrutement se fait grâce à l'hydrolyse du phosphatidyl inositol bisphosphate (PIP2) par une phospholipase C et la mobilisation de la protéine kinase C.
Le calcium a aussi un effet marquant sur la croissance et la différenciation des kératinocytes. De faibles teneurs en calcium (≤ 0,05 mM) stimulent la prolifération des kératinocytes mais bloquent leur différenciation, tandis qu'une forte concentration en calcium (entre 0,1 mM et 1,5 mM) inhibe leur prolifération mais stimule la différenciation terminale des kératinocytes (73).
Le calcium est, enfin, nécessaire à la formation des desmosomes et à l'activation d'enzymes. Il est essentiel pour l'établissement d'une architecture tissulaire normale. Les changements dans les concentrations de calcium extracellulaire ont une répercussion sur le taux de calcium intracellulaire dans une culture de kératinocytes. Le calcium est, donc, physiologiquement présent dans l'épiderme à certaines concentrations et influe sur la prolifération et la différentiation de l'épithélium.

iii) La vitamine D

La peau est le seul organe capable de produire le cholécalciférol ou vitamine D3. Le 7, déhydrocholestérol (7-DHC) est converti en vitamine D3 sous l'influence des rayonnements UV. La vitamine D3 est ensuite métabolisée en $1,25(OH)_2$ vitamine D3 qui correspond à la forme biologiquement active de la vitamine D. La $1,25(OH)_2$ vitamine D3 est surtout connue pour jouer un rôle dans le métabolisme osseux, mais elle est aussi impliquée dans d'autres mécanismes comme la croissance cellulaire, la différenciation cellulaire et l'apoptose.
La vitamine D agit selon une voie d'action génomique : elle se lie à son récepteur nucléaire VDR, permettant l'association du VDR avec son partenaire hétérodimérique le récepteur X aux rétinoïdes ainsi qu'avec un certain nombre de co-activateurs. Ceci permet de réguler la transcription de gènes cibles via des éléments de réponse à la vitamine D (VDRE) situés, en général, en amont des promoteurs de ces gènes. L'expression du VDR lui-même est activée par c-Jun (membre de la famille des facteurs de transcription AP-1). La vitamine D permet ainsi d'augmenter l'expression de gènes de la différenciation épidermique comme ceux de l'involucrine et de la transglutaminase 1, mais aussi l'expression des peptidyl-arginine

désiminases 1 et 3. L'invalidation du récepteur de la vitamine D chez la souris entraîne une alopécie, le rachitisme des animaux, une disparition des granules de kératohyaline et une diminution d'expression de la filaggrine, de l'involucrine et de la loricrine (123).
La vitamine D peut également agir selon une voie non génomique, via des récepteurs membranaires, et a été impliquée dans de nombreuses voies de signalisation communes avec celles du calcium (4). En effet, la vitamine D peut activer les récepteurs calciques CaR et potentialiser ainsi la différenciation des kératinocytes *in vitro*, ainsi que l'expression de nombreux membres de la famille des phospholipases C. En outre, elle agit en synergie avec le calcium pour activer l'expression de l'involucrine et de la loricrine, certainement grâce à la proximité physique des éléments de réponse au calcium et des VDRE que l'on retrouve notamment dans le promoteur du gène de l'involucrine.

iv) Régulation génique

1) Le complexe de différenciation épidermique

De nombreux gènes codant des protéines de l'enveloppe cornée sont situés au sein d'un même cluster de 2,5 Mb appelé « Complexe de Différenciation Epidermique » (CDE). On y retrouve plus de 50 gènes différents, exprimés principalement dans l'épiderme, la plupart codant pour des protéines impliquées dans la cornification comme la filaggrine, la loricrine et l'involucrine.

2) Les facteurs de transcription de la famille AP-1

Parmi les facteurs de transcription impliqués dans la régulation transcriptionnelle des gènes codant les protéines de la différenciation épidermique, les facteurs AP-1 jouent un rôle important. Ils sont impliqués dans la transcription des gènes de la profilaggrine, de l'involucrine, de la loricrine, de la transglutaminase… Cette famille de facteurs de transcription se compose principalement d'homodimères ou d'hétérodimères Jun (c-Jun, Jun B et Jun D) et Fos (c-Fos, Fos B, Fra-1 et Fra-2). Dans l'épiderme, l'expression des protéines AP-1 varie avec la différenciation des kératinocytes. Cette variation joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle des gènes épidermiques. En effet, en fonction des dimères formés, l'activité des facteurs AP-1 est variable. Alors que Jun D est plus abondant dans les kératinocytes prolifératifs, c-Jun et c-Fos sont surtout retrouvés dans les kératinocytes différenciés.

D) Une barrière hydrique

1) Les constituants de la barrière hydrique

Elle est permise grâce aux lipides intercornéocytaires, mais aussi grâce aux jonctions serrées de la couche granuleuse (cf p 26) et grâce au facteur naturel d'hydratation (FNH) présent dans le *stratum disjunctum*.

a) Les lipides intercornéocytaires

Parmi les lipides épidermiques, on distingue classiquement les lipides de surface et les lipides intra-épidermiques ou intercornéocytaires. Les lipides de surface forment le film hydrolipidique superficiel. Il est produit à partir des sécrétions des glandes sébacées et sudoripares, ainsi que des débris cellulaires et des lipides du ciment intercellulaire. Il abrite et

nourrit la flore commensale, possède un pouvoir antibactérien et antifongique et peut assurer l'imperméabilisation du pelage, comme chez le Terre-Neuve (91).

Les lipides intra-épidermiques sont synthétisés par les kératinocytes. Ils sont constitués de 45 à 50% de céramides (sphingolipides), de 20 à 25% de cholestérol et de 10 à 15% d'acides gras libres (66) et ont un très haut degré d'organisation (95). Ils jouent un rôle fondamental dans la structure de l'épiderme et dans ses fonctions, notamment dans la cohésion cornéocytaire et dans le maintien et le contrôle de l'hydratation de la peau. Ces lipides sont empilés dans les espaces intercellulaires. Tous les acides gras constituant les céramides n'ont pas de doubles liaisons, ce qui permet la formation d'un gel très ordonné qui est moins fluide et moins perméable que le liquide cristallin typique à dominante phospho-lipidienne des membranes biologiques (53, 106). Les céramides y ont une place de choix en raison de leur importance quantitative, de leur organisation particulière et de leurs propriétés fondamentales. La partie superficielle de l'épiderme est riche en céramides mais pauvre en phospholipides, alors que la partie profonde est riche en phospholipides mais pauvre en céramides. Ceci s'explique par le niveau de synthèse et de libération des céramides et par les modifications cellulaires et intercellulaires survenant lors du processus de kératinisation ; les kératinocytes des couches profondes possèdent une membrane cellulaire constituée majoritairement de phospholipides, tandis que les cornéocytes des couches superficielles possèdent une enveloppe cornée doublée d'une membrane lipidique résiduelle riche en ω-hydroxycéramides et sont séparés par un espace intercellulaire rempli d'un ciment riche en céramides (51).

La synthèse lipidique épidermique est relativement autonome car elle est peu influencée par la nature et la quantité des lipides circulants. Elle est soumise à une régulation en fonction de l'état de la fonction barrière.

i) Les précurseurs des lipides de la couche cornée

Dans les couches granuleuse et épineuse, des précurseurs lipidiques (phospholipides, cholestérol et glucosylcéramides) sont contenus dans les corps lamellaires, ou corps d'Odland, structures tubulo-vésiculaires dérivant de l'appareil de Golgi (28, 66, 72). A l'interface couche granuleuse/couche cornée, les corps lamellaires migrent jusqu'à la membrane plasmique apicale, avec laquelle leur membrane limitante fusionne, et déversent leur contenu dans l'espace extracellulaire.
La sécrétion de ces corps lamellaires peut également être induite par une perturbation de la fonction de barrière de la couche cornée, par exemple par des forces mécaniques (délaminage au scotch), ou par un traitement topique de la peau à l'aide de solvants ou de détergents (72). Les corps lamellaires sécrètent diverses enzymes ayant un rôle dans le métabolisme des lipides et la desquamation de la peau (27, 28, 66, 68). Ainsi, la β-glucocérébrosidase convertit les glucosyl-céramides en céramides, la sphingomyélinase convertit les sphingomyélines en céramides et les phospholipases, comme la phospholipase A2, clivent les phospholipides pour donner des acides gras libres et du glycérol (28, 29). Des protéases (kallikréine 5 et 7) qui jouent un rôle dans la rupture des desmosomes et, par conséquent, contribuent à la desquamation de la couche cornée, pourraient être également libérées par les corps lamellaires (66).
Après sécrétion, les précurseurs lipidiques sont modifiés et s'organisent en lamelles lipidiques qui remplissent les espaces inter-cornéocytaires.

ii) Les céramides

Les céramides représentent 50% des lipides et sont les plus divers de la couche cornée (66). Il existe douze sous-classes de céramides (CER1-12) présentant des chaînes carbonées d'acide gras plus ou moins longues (queue) et des groupements sphingosine différents (tête) (95). Les céramides sont soit d'origine anabolique, soit d'origine catabolique. Les céramides d'origine anabolique sont synthétisés *de novo* à partir du palmitoyl-CoA et de la sérine grâce à la sérine palmitoyl-transférase. Les céramides d'origine catabolique sont produits par l'hydrolyse, d'une part, des glucosyl-céramides par la β-glucocérébrosidase, et d'autre part des sphingomyélines par la sphingomyélinase (50).
Dans la plupart des tissus, les céramides sont rapidement convertis en sphingolipides, si bien qu'ils ne s'y accumulent jamais et ne sont présents qu'à l'état de traces. Seule la couche cornée est particulièrement riche en céramides. Les céramides sont dégradés par la céramidase en sphingosine et acide gras.
Les céramides de la couche cornée ont, dans la physiologie de l'épiderme, un rôle important en raison de leur abondance et de leurs propriétés physico-chimiques liées à la présence d'acides gras à longue chaîne. Ils participent à la cohésion de la couche cornée de 2 façons : d'une part, les oméga-hydroxycéramides de l'enveloppe cornéocytaire lipidique sont unis de façon covalente à l'enveloppe cornée des cornéocytes ; d'autre part les oméga-hydroxycéramides estérifiés (principalement par l'acide linoléique) des membranes lamellaires contiennent un acide gras à très longue chaîne (> 30C) auquel est estérifié l'acide linoléique. Selon les observations les plus récentes, en microscopie électronique et en diffraction par rayons X, il semble que ces chaînes traversent la bicouche lipidique et se lient au niveau de la partie linoléique, par des interactions hydrophobes, à des molécules de cholestérol au sein d'une couche lipidique fluide séparant 2 bicouches superposées. Il se forme ainsi un véritable "treillis" lipidique qui est responsable de l'effet barrière vis-à-vis des molécules, tout en laissant possible le passage d'un certain flux d'eau; ce "treillis" est consolidé par les interdigitations latérales des très longues chaînes qui constituent de véritables "rivets moléculaires" accroissant la stabilité et la cohésion de l'ensemble.

iii) Les acides gras

L'épiderme contient aussi des acides gras libres ou liés à des triglycérides, phospholipides, glucosylcéramides et céramides. Seuls les acides gras saturés ou mono-insaturés sont synthétisés directement dans l'épiderme, les autres provenant de l'alimentation ou de la circulation sanguine. Les acides gras nécessaires à l'élaboration des lamelles lipidiques intercornéocytaires sont produits grâce à l'hydrolyse des glycérophospholipides par la phospholipase A2 (28). L'inhibition de l'activité de la phospholipase A2 entraîne des défauts dans la structure des membranes lipidiques et dans la perméabilité de la couche cornée. Le glycérol libéré lors de cette réaction permet de retenir l'eau dans la couche cornée, jouant ainsi un rôle dans le maintien de son hydratation.

iv) Le cholestérol et le sulfate de cholestérol

Le cholestérol donne de la fluidité à la membrane, sinon cette dernière serait rigide et cassante. Il est synthétisé dans les couches les plus profondes de l'épiderme avant d'être converti en sulfate de cholestérol par la sulfotransférase présente dans la couche granuleuse. Le sulfate de cholestérol est, à nouveau, métabolisé en cholestérol dans la couche cornée grâce à la stéroïde sulfatase (27). Cette enzyme joue un rôle essentiel dans la desquamation. En effet, elle est sécrétée dans l'espace intercornéocytaire et son activité persiste dans les

couches basses du stratum corneum alors qu'elle disparaît dans les couches superficielles (25). Il en résulte un gradient de sulfate de cholestérol dans la couche cornée, avec une concentration plus importante dans les couches profondes de l'épiderme. Or, le sulfate de cholestérol est un inhibiteur de protéases à sérine qui jouent un rôle dans la dégradation des cornéodesmosomes (28, 29); il entraîne donc un retard de la desquamation lorsqu'il est appliqué en topique sur l'épiderme.

v) Organisation des lipides intercornéocytaires

L'organisation des lipides intercornéocytaires est, elle aussi, particulière à l'épiderme. C'est une organisation « en sandwich », observée en microscopie électronique comme une alternance de bandes claires, représentant les chaînes hydrocarbonées apolaires, et de bandes denses figurant les groupements polaires (66, 67).
De nombreuses affections épidermiques sont liées à des défauts dans la composition des lamelles lipidiques. Des défauts de l'expression de céramides ainsi qu'une perturbation de l'organisation lamellaire ont notamment été observés dans le psoriasis et la dermatite atopique (90, 94, 104).

b) Le FNH

Le FNH est retrouvé exclusivement dans le *stratum corneum*. Il est composé majoritairement d'un pool d'acides aminés, d'acide lactique, d'urée, de citrate et de sucres. Les composants du FNH sont présents en grande quantité dans la couche cornée, pouvant représenter jusqu'à 30% du poids du cornéocyte. Les acides aminés issus du FNH, comme l'acide pyrrolidone carboxylique, sont hygroscopiques. Ils peuvent capter l'eau et agir comme humectant, ce qui permet à la couche cornée de rester perpétuellement hydratée malgré l'action asséchante de l'environnement extérieur (66).
De plus, la présence d'acides aminés acides va participer à la diminution du pH de la couche cornée. Cette acidité permet de réguler la flore bactérienne présente à la surface de la peau mais aussi de contrôler l'action de nombreuses enzymes cornéocytaires, comme les protéases impliquées dans le processus de desquamation, ou comme les lipases essentielles à la maturation des lipides.
Enfin, la photo-isomérisation de l'acide trans-urocanique issu de la transformation de l'histidine présente dans le FNH en acide cis-urocanique, permet l'absorption d'une partie du rayonnement UV.
Tous les acides aminés présents dans le FNH sont issus de la protéolyse de la filaggrine. Les autres composants extracellulaires qui ne proviennent pas du cornéocyte, comme l'urée, les sucres et le lactate pourraient provenir en partie des glandes sudoripares.

2) La perte insensible en eau

a) Généralités

i) Définition

La perte insensible en eau (PIE), aussi appelée perte d'eau transépidermique, ou TEWL en anglais (transepidermal water loss), est définie comme la mesure de la quantité d'eau qui passe de l'intérieur d'un corps à l'atmosphère environnante, à travers l' épiderme , par l'intermédiaire de processus comme la diffusion et l'évaporation (9, 66).

La corrélation entre la fonction barrière et la PIE a été mise en évidence notamment chez le chien (105, 113). Dans l'étude réalisée, on utilisait la méthode de tape stripping, bien connue pour reproduire des lésions cutanées similaires à celles observées, par exemple, dans la dermatite atopique. Des scotchs étaient appliqués sur certaines zones et les chercheurs badigeonnaient ensuite les chiens d'une teinture fluorescente capable de franchir la barrière cutanée qu'en cas de rupture de cette dernière. Des mesures de PIE ont ensuite été réalisées. Les chercheurs ont montré que la PIE était en moyenne dix fois plus élevée dans les zones scotchées que dans les zones non scotchées. La présence de la teinture fluorescente dans les zones scotchées prouve une lésion de la barrière ; elle est absente sur les sites témoins. Les chercheurs ont ainsi pu conclure à une corrélation positive entre une augmentation de la PIE et la détérioration de la fonction de la barrière cutanée (45, 105).
La mesure de la PIE permet d'évaluer la fonction barrière de la peau du chien de manière quantitative. C'est une procédure non-invasive, quantifiant l'état de la peau.
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. Nombre d'entre elles concluent également qu'une perte d'eau transépidermique élevée est associée à de nombreuses maladies de peau, comme la dermatite atopique, la dermatite de contact ou encore l'ichtyose (31, 46, 104, 105, 125).

La perte insensible en eau est donc un paramètre très utile qui caractérise la fonction barrière cutanée. L'altération de la barrière cutanée provoque des modifications dans la différenciation épidermique qui diminuent la capacité du *stratum corneum* à retenir l'eau. Ces altérations conduisent donc, le plus souvent, à l'état de peau sèche.
Les produits hydratants ont pour rôle d'améliorer la fonction barrière de la peau en hydratant la couche cornée. En effet, les valeurs de perte insensible en eau sont, en général, inversement proportionnelles à l'hydratation du *stratum corneum*.
Très rarement, et sous certaines conditions, il arrive que la PIE ne soit pas un marqueur fiable de la fonction barrière. Par exemple, le traitement topique de lésions de dermatite atopique à l'aide de corticoïdes réduit la valeur de la perte insensible en eau alors qu'il n'y a pas eu de réparation de la barrière (95).

ii) Facteurs de variation chez le chien

1) Facteurs intrinsèques

De nombreux articles s'accordent pour dire qu'il existe des variations significatives de mesure de PIE, avec un même appareil, en fonction du site du corps et de l'individu. Dans les études comparatives, il est donc important de réaliser des mesures répétées. Pour des mesures objectives, des variations inférieures à 10% sont souhaitées, mais avec un paramètre comme la PIE, les fluctuations biologiques mènent inévitablement à de plus hauts coefficients de variation même quand des mesures répétées sont réalisées. Ainsi, il est fréquent d'obtenir des coefficients de variation avoisinant les 20-35%, dépendant du chien et du site.
Plus important, une variation de la PIE a été observée, sur les mêmes sites, des jours différents. Il est probable que la quantité d'eau sortant de la peau change de jour en jour, mais tous les auteurs ne s'entendent pas à ce sujet. Pour parer à ce problème éventuel, une longue période d'acclimatation à l'intérieur de la pièce où les mesures sont effectuées est conseillée (57).
En tout cas, les mesures d'hydratation de la peau par cornéométrie révèlent des différences statistiquement significatives selon la localisation du site (34, 45, 57, 79, 116, 125). Ce sont la richesse en glandes de la peau, sa température, l'irrigation sanguine, l'hémodynamique locale,

le degré de formation des cornéocytes et le contenu lipidique de la couche cornée qui influent sur la PIE pour chaque site du corps.
D'autres facteurs semblent affecter les mesures de PIE chez le chien (3). Tous les auteurs ne s'accordent pas à ce sujet. Pour certains, les chiens à poils longs ont une valeur de PIE plus élevée que ceux à poils courts, tandis que pour d'autres, plus le pelage est dense et plus la PIE est faible. Les animaux au pelage foncé vont perdre plus d'eau que ceux au pelage clair. L'âge et le sexe n'auraient que peu d'influence sur la valeur de PIE (57, 116). La position de l'animal au moment de la mesure pourrait en revanche la modifier. Il semblerait que la tonte des poils n'influe pas sur les mesures, si l'on n'effectue pas les mesures de PIE immédiatement après la tonte, mais là encore les résultats diffèrent selon les études (57, 82, 116). Enfin, la race et l'alimentation joueraient un rôle primordial dans les mesures de PIE (3, 45).
Malgré le nombre important d'appareils de mesure disponibles et les améliorations technologiques, il apparaît que les variations biologiques de la PIE gênent son utilisation sur les animaux domestiques dans les études cliniques. Il faut donc utiliser un processus standard qui minimise les effets de ces variations biologiques.

2) Facteurs extrinsèques

Il est important de noter que la PIE est affectée par des facteurs environnementaux tels que l'humidité ou la température ambiante (19, 31,125).
La valeur de la PIE varie significativement selon que la mesure est réalisée à une température de 18°C ou à une température de 28°C mais il n'existe aucune différence significative pour les mesures prises entre 20°C et 26°C. On peut donc s'affranchir de ce facteur de variation en réalisant les mesures dans une pièce où la température se situe entre 20°C et 26°C (125). Toutefois, la température de la pièce ne reflète pas forcément la température de la sonde et le simple fait de la tenir dans ses mains peut augmenter sa température de 6°C (19).
Les mouvements d'air du milieu extérieur peuvent perturber la mesure de la perte insensible en eau avec un appareil à chambre ouverte (49).
Les mesures de PIE peuvent aussi varier selon l'angulation ou la pression exercée sur le matériel de mesure utilisé (19, 49).

b) Les méthodes de mesures de la PIE

Il n'existe pas de méthode de mesure directe de la PIE, celle-ci est extrapolée à partir du flux de vapeur d'eau qui émane de la peau. En effet, la PIE est définie comme la densité de flux d'eau condensée diffusant à travers le *stratum corneum*. Les méthodes de mesure de la PIE se basent sur la densité du flux d'eau qui s'évapore de la surface de la peau. Si la PIE est la seule source d'eau atteignant la surface cutanée et si la surface cutanée est sèche, alors le flux de vapeur mesuré correspond véritablement à la PIE. Si le flux de vapeur à la surface de la peau est nul, alors l'humidité absolue de l'air adjacent à la peau est la même que l'humidité ambiante. Si le flux de vapeur augmente, l'humidité près de la peau est supérieure à l'humidité ambiante. Cela crée un gradient d'humidité à la surface de la peau qui est proportionnel au flux de vapeur. La plupart des appareils existant se basent sur ce gradient d'humidité pour mesurer la PIE. C'est le principe de mesure du gradient de diffusion de Nilsson.
Les appareils mesurent le flux de vapeur d'eau juste au-dessus de la couche cornée, qui dépend de la vitesse d'apparition de l'eau à la surface de la peau et du taux d'évaporation de l'eau de la surface de la peau, propriété liée au microclimat. La mesure donnée par l'appareil correspond à la PIE uniquement lorsque celle-ci est le facteur limitant, d'où l'importance de réaliser les mesures dans une pièce avec microclimat contrôlé (49).

Différents appareils de mesure ont été mis au point. Il existe deux grands types d'instruments: ceux à chambre ouverte et ceux à chambre fermée, à chambre ventilée ou non (35, 125). Les résultats des mesures par ces appareils sont fournis en $g.m^{-2}.h^{-1}$ (49). Il existe un appareil particulier qui ne rentre pas dans ces deux catégories : le Meeco®, qui fonctionne en boucle fermée et qui mesure en ppm/0,5 cm²/h (31).

i) Les instruments à chambre ouverte

Les instruments à chambre ouverte sont les premiers qui ont été mis au point. Ils ont été utilisés dans d'innombrables études scientifiques à travers le monde. On y trouve l'Evaporimeter® (EPI Servomed, Stockholm, Sweden), les Tewameter® TM 210 et TM 300 (Courage & Khazaka, Cologne, Germany) ou le Dermalab® (Cortex Technology, Hadsund, Denmark).
La chambre de mesure est constituée d'un cylindre creux de la taille d'une cartouche. L'extrémité inférieure de la chambre est ouverte et est placée en contact avec la peau. L'extrémité supérieure est également ouverte et permet à la vapeur d'eau de s'échapper dans l'atmosphère ambiante. La paroi cylindrique da la chambre protège l'air qu'il contient des perturbations causées par les mouvements de l'air ambiant. A l'intérieur du cylindre sont logés deux capteurs d'humidité et deux capteurs de température. L'air à l'intérieur de la chambre est stationnaire et la vapeur d'eau de la surface cutanée migre à travers la chambre et rejoint l'atmosphère ambiante par diffusion. Une fois l'appareil placé contre la peau, les capteurs sont parallèles à la surface cutanée et enregistrent la pression de vapeur différentielle entre deux points situés à des distances définies de la surface de la peau. Il s'agit d'une méthode basée sur le gradient de diffusion (3, 5, 9, 26, 35, 49, 64, 116).

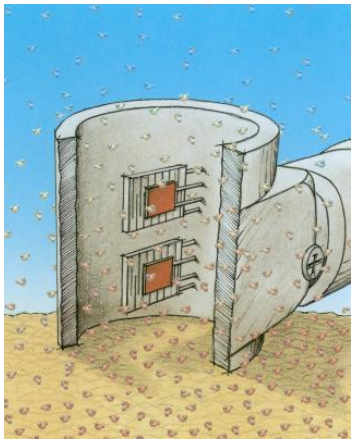


Figure 7 : Schéma d'une chambre de mesure d'un appareil à chambre ouverte, d'après 49

La chambre de mesure peut être caractérisée par une résistance à la diffusion R, qui peut être estimée par la formule suivante :

$$R = \frac{1}{D_{VA}}\left(L + \frac{\pi d}{8}\right)$$

où L est la longueur de la chambre, *d* est le diamètre de la chambre et *DVA* est le coefficient de diffusion pour la vapeur d'eau dans l'air. R représente la résistance de diffusion de la chambre cylindrique.

Ainsi, pour le Tewameter® par exemple, L = 20 mm, et d = 10 mm.
La perte d'eau transépidermique est proportionnelle au gradient mesuré par les deux capteurs.

Ces appareils sont précis et fiables mais présentent des inconvénients. Le premier est une sensibilité importante aux mouvements de l'air ambiant, que ceux-ci soient causés par des courants d'air externe (air conditionné, ouverture/fermeture de portes ou de fenêtres, respiration…) ou par des mouvements du sujet de l'étude (en particulier lorsqu'il s'agit d'animaux) (3, 81, 125). Ensuite, la prise de mesure nécessitant une longue stabilisation (d'environ 1 minute), les temps de mesure sont relativement longs (81). Certains auteurs rapportent, également, que les valeurs de PIE sont dépendantes de l'orientation (vers le haut ou le bas) du site de mesure (9). Enfin, même après tonte du pelage sur le site de mesure, l'humidité adsorbée par les poils résiduels est détectée par les capteurs hygrométriques et cause ainsi une variation dans la prise de mesure de l'appareil (125).

ii) Les instruments à chambre fermée

1) La méthode à chambre condensée

Il s'agit d'appareils mis au point récemment, à chambre fermée et ventilée. On y trouve notamment le CC-01® ou le système AquaFlux® AF200 (Biox systems Ltd, London, UK).
La chambre de mesure est constituée d'un cylindre de la taille d'une cartouche. Ses dimensions sont suffisamment petites pour que la diffusion soit le seul mécanisme de transport de l'air. La chambre est fermée à son extrémité supérieure par un condenseur maintenu à une température contrôlée, de plusieurs degrés en dessous du point de congélation de l'eau. L'extrémité inférieure de la chambre est ouverte et est placé en contact avec la surface de la peau.

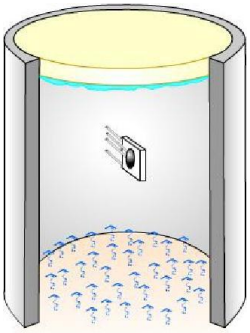


Figure 8 : Schéma d'une chambre de mesure d'un appareil à chambre condensée, d'après 49

Le condenseur possède quatre fonctions principales. Tout d'abord, il ferme la chambre de mesure et protège donc la zone de diffusion des perturbations causées par les mouvements de l'air ambiant. Ensuite, il contrôle l'humidité dans la chambre, indépendamment de l'humidité ambiante : ainsi, le taux d'humidité au niveau du condenseur est faible et stable, déterminée par sa température seule. Troisièmement, il maintient un gradient d'humidité qui oblige l'eau entrant sous forme de vapeur à diffuser vers le condenseur. Enfin, il se débarrasse de l'eau entrant sous forme de vapeur en la condensant en glace. Ce stockage de la vapeur d'eau sous une forme très condensée permet de mesurer le flux de vapeur d'eau en continu pendant plusieurs heures.
Le gradient d'humidité fournit, de même que pour les instruments à chambre ouverte, le moyen de mesure de la densité de flux par le gradient de diffusion. Le gradient peut être calculé à partir de deux valeurs d'humidité en deux points séparés dans l'espace. Dans la méthode à chambre condensée, une valeur est calculée à partir des lectures des capteurs du taux d'humidité et de la température présents dans la paroi de chambre. L'autre valeur vient

du condenseur, où l'humidité peut être calculée à partir de sa température, sans avoir besoin d'un capteur d'humidité secondaire.
Le stockage temporaire de la vapeur d'eau sous forme de glace ne peut durer indéfiniment. Le principal effet de l'accumulation de glace dans le condenseur est une perte progressive de la sensibilité. Pour le modèle AquaFlux AF200 par exemple, l'accumulation de glace réduit la sensibilité de ~ 1% pour chaque 2,5 mg de la glace accumulée.
Comme la méthode à chambre ouverte, la méthode à chambre condensée s'appuie également sur l'état d'équilibre de diffusion et peut donc être caractérisé par une résistance à la diffusion.

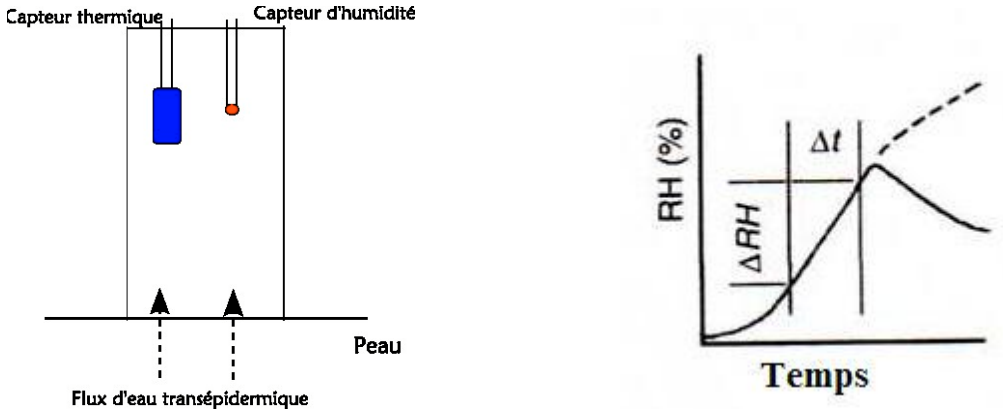
$$R = \frac{L}{D_{VA}}$$

Par exemple, pour le modèle Biox AquaFlux AF100, L =16 mm.

Les instruments de mesure à chambre ouverte et à chambre condensée permettent tous les deux des mesures continues de la PIE. Les processus de perte d'eau temps-dépendants, tels que l'activité des glandes sudoripares, peuvent être étudiés avec ces instruments.

2) <u>La méthode à chambre fermée non ventilée</u>

Elle concerne des appareils tels que le Vapometer® (Delfin Technologies Ltd, Kuopio, Finland) et le H4300®.
La chambre de mesure est constituée d'un cylindre de la taille d'une cartouche. Une extrémité du cylindre est fermée, l'autre extrémité présente un orifice ouvert qui peut être mis en contact avec la peau. La chambre est équipée de capteurs d'humidité relative et de température. La vapeur d'eau de la surface de la peau se rassemble dans la chambre et ne peut s'en échapper. Cela provoque une augmentation d'humidité avec le temps, lente au début, puis de manière linéaire. La densité de flux est calculée à partir de la pente de la courbe linéaire obtenue (49).



<u>Figure 9 : Schéma d'une chambre de mesure d'un appareil à chambre fermée non ventilée , d'après 49</u>

Une fois la mesure terminée, la chambre doit être séparée de la peau pour permettre à la vapeur d'eau accumulée de s'échapper, sinon l'humidité atteindrait le niveau de saturation. Cette nécessité de purger la chambre de mesure de la vapeur d'eau accumulée

après chaque contact avec la peau empêche d'effectuer des mesures continues. Dans le cas du Vapometer®, par exemple, il existe un temps de restauration de la chambre de mesure permettant cette purge (26). Ce temps augmente avec l'augmentation de la perte d'eau mais il n'est jamais supérieur à 2 minutes : après 2 minutes, le système se réinitialise et de nouvelles mesures sont possibles, même si la chambre de mesure n'est pas revenue aux conditions de la pièce. Des erreurs de mesures sont alors causées par la vapeur humide résiduelle contenue par la chambre. Lorsque les valeurs de PIE ne sont pas trop élevées, on peut effectuer en moyenne 2 mesures par minute (9).
Les avantages d'un appareil à chambre fermée par rapport à un appareil à chambre ouverte sont la possibilité de prendre des mesures fiables quel que soit l'angle avec lequel on applique l'appareil sur la peau, un temps de mesure réduit et une indépendance vis-à-vis des mouvements d'air extérieurs (9, 81).
Contrairement aux méthodes à chambre ouverte et à chambre condensée, la méthode à chambre non ventilée ne repose pas sur l'état d'équilibre de diffusion pour la mesure du flux, et sa chambre de mesure ne peut donc pas être caractérisée par une résistance à la diffusion.
L'utilisation de ces appareils, pour la mesure de la perte d'eau transépidermique, a été évaluée et validée chez l'homme, *in vitro* et *in vivo*, ainsi que chez les animaux, dont le chien.

III/ L'altération de la barrière cutanée

A) Altération expérimentale : le tape-stripping

Il existe de nombreuses méthodes d'altération de la barrière cutanée : application de solvants, de détergents… Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons uniquement à la méthode de tape-stripping, qui consiste en une rupture mécanique de la barrière cutanée par applications séquentielles de morceaux de cellophane adhésive, ou « strips », sur la peau. Cette méthode a été employée dans de nombreuses études portant sur le *stratum corneum*, notamment chez l'homme, la souris et le chien. Elle a permis de mieux comprendre les rapports entre la barrière épidermique et la PIE (31, 39, 105), et d'étudier les mécanismes mis en place lors d'une rupture de la barrière cutanée (2, 23, 30, 56, 62, 72, 86, 120). C'est également un bon modèle pour reproduire des peaux lésées, semblables à celles obtenues dans certaines affections comme l'eczéma chronique ou la dermatite atopique. Il semblerait en effet que le tape-stripping mime les effets du grattage et reflète ainsi plus fidèlement les conditions cliniques des dermatoses prurigineuses que d'autres méthodes de rupture expérimentale (86). De plus, une fois que la fonction barrière est altérée, on peut tester l'efficacité de certains produits ou traitements sur la restauration de celle-ci (83, 87, 124).

Par cette technique, on peut obtenir des ruptures aiguës ou chroniques de la barrière. Pour obtenir un modèle de rupture chronique, les applications successives de scotchs doivent être répétées sur plusieurs jours sur une même zone. Dans la cadre d'une expérimentation, on peut soit réaliser une rupture en fixant un nombre d'applications successives de morceaux de scotchs, soit fixer la valeur de perte insensible en eau à atteindre.

1) Technique du tape stripping

C'est une technique simple et facile à réaliser, à condition d'utiliser une procédure standardisée qui limite la variabilité et évite l'introduction de biais.
Elle consiste à appliquer un morceau de scotch sur la peau puis à le retirer, ce qui permet d'enlever la couche la plus superficielle du *stratum corneum.*

Différents types de scotchs peuvent être utilisés à condition que le revêtement adhésif soit de composition et de distribution uniforme et qu'il soit compatible avec la peau. Pour appliquer les morceaux toujours au même endroit, il est préférable de dessiner les sites avec un marqueur ou d'utiliser un pochoir. L'application de l'adhésif doit être réalisée de manière uniforme pour que la répartition du matériel retiré soit homogène. Le site choisi doit donc être le plus lisse et le plus régulier possible, les poils doivent être tondus et la peau ne doit pas avoir été préalablement lavée. La pression exercée sur l'adhésif doit être reproductible ; elle peut être réalisée avec le pouce de l'opérateur ou divers instruments (spatule, rouleau…). La vitesse de retrait doit être constante sous peine d'entrainer des variations au niveau de la répartition de ce qui va adhérer sur le scotch (56, 62).

2) Facteurs de variabilité

La méthode du tape-stripping dépend de divers paramètres, qu'il est nécessaire de contrôler pour obtenir des résultats fiables et reproductibles (62). En effet, la quantité de *stratum corneum* retirée par une seule application d'un adhésif dépend de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques. Ces différents facteurs peuvent 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.

a) Facteurs intrinsèques

La sensibilité de la peau à la rupture mécanique va dépendre de la structure et de la composition de la couche cornée et, notamment, de son nombre de couches cellulaires et donc de son épaisseur, de la taille des cornéocytes et de sa quantité en lipides. Ces facteurs dépendent eux-mêmes de l'espèce, de la race, de la localisation anatomique, de l'âge et de la saison (7, 56, 62). Ainsi, les peaux riches en lipides, ou les peaux des individus âgés, sont plus sensibles au tape-stripping. Enfin, le processus de desquamation spontané est également soumis à variation. On a donc des différences de cohésion au sein de la couche cornée et, donc, une sensibilité au «tape stripping» différente (2, 30, 38, 56).

b) Facteurs extrinsèques

Les facteurs extrinsèques qui ont une influence sur les effets du «tape stripping» sont la méthode d'application de l'adhésif, la durée et la valeur de la pression exercée, l'adhésif lui-même et le lieu de l'application (7, 56, 62).
Par exemple, plus le temps d'application d'un scotch sur une zone est grand, et plus la barrière cutanée est altérée rapidement pour un nombre de manipulations réduit. L'effet d'une pression plus élevée serait le même. Une vitesse de retrait augmentée entraîne une diminution de la quantité de cornéocytes retirés.
Selon le type d'adhésif choisi, on aura une adhérence plus ou moins marquée avec la couche cornée (56, 62). On peut utiliser du sparadrap médical transparent (de type Transpore® ou Micropore®), des disques adhésifs destinés au tape-stripping (D-squame®), ou du ruban adhésif que l'on peut trouver en grande surface (de type Scotch® crystal ou Tesa® n°5529). Dans tous les cas, la distribution homogène et la composition de la couche adhésive sur la bande doivent être garanties et la compatibilité avec la peau devrait être prouvée au préalable, dans le but d'éviter des effets néfastes.
Il faut également faire attention aux modifications que peuvent apporter les traitements topiques appliqués avant la réalisation des manipulations.

Enfin, plus le nombre d'applications d'adhésif est grand, plus la quantité de *stratum corneum* retirée par chaque ruban adhésif est faible. Cela pourrait s'expliquer par une augmentation de la cohésion entre les cornéocytes dans les couches plus profondes de la couche cornée (2, 7, 56).

3) Données disponibles chez le chien

Des études à l'origine de deux thèses vétérinaires, menées en 2011 (89, 101, 113), portent sur la création de modèles de rupture aiguë et chronique de la barrière cutanée chez le chien. Globalement, les résultats histopathologiques des biopsies réalisées montraient que 30 applications successives d'adhésif permettent de retirer la totalité de la couche cornée. Quarante-huit heures après l'altération mécanique de la barrière cutanée, la moitié environ de la couche cornée était réapparue et, à soixante-douze heures, l'aspect de la couche cornée était redevenu normal. Concernant l'inflammation, elle est observée dès la première heure suivant la procédure de tape-stripping. Elle augmente en intensité jusqu'à atteindre un pic à 18 heures. Dans le même temps, un œdème et une congestion marqués du derme sont notés. Une hyperplasie de l'épiderme commence à apparaître dès 48 heures après la rupture aiguë mais l'épaisseur de l'épiderme diminue rapidement en l'absence d'altération supplémentaire. Cette étude a permis d'établir que la restauration de la couche cornée, suite à une rupture aiguë de la barrière cutanée, s'effectue rapidement chez le chien.
Concernant la rupture chronique, elle induit une hyperplasie épidermique, marquée et durable, et une inflammation dermique durable (89, 112). Le retour à la normale a lieu moins rapidement que lors d'une rupture aiguë. L'intérêt du modèle chronique est de reproduire expérimentalement les modifications observées lors d'une dermatose inflammatoire chronique.

B) Altération de la barrière cutanée lors de dermatoses

Dans le cas de dermatoses, l'altération de la barrière cutanée, primaire ou secondaire, est souvent aggravée par le prurit et l'inflammation. On a donc une rupture chronique de la barrière cutanée, avec une augmentation de la perte insensible en eau et une déshydratation cutanée.
La diminution de la teneur en eau de la couche cornée a notamment pour conséquences une modification du pH cutané et une augmentation de la production de cytokines. La modification du pH, l'hyperkératose causée par le prurit et l'inflammation provoquent une diminution de l'activité des enzymes, notamment des enzymes responsables de la cornéodesmolyse. La desquamation est donc moins efficace. L'enveloppe cornée des cornéocytes demeure immature à cause de la baisse d'activité des transglutaminases. La synthèse de la filaggrine et du FNH diminue ; la capacité de la couche cornée à retenir les molécules d'eau s'en trouve amoindrie (118).
Chez les patients souffrant de dermatite atopique, on rapporte une diminution du taux de céramides et de filaggrine et une augmentation du taux de cholestérol. Les proportions normales des lipides dans la couche cornée n'étant plus respectées, l'organisation lamellaire des lipides intercellulaires est perturbée, aggravant encore la perte insensible en eau (90, 94, 96).
Parallèlement à ces mécanismes, il peut y avoir une prolifération de bactéries pathogènes en surface, au détriment de la flore commensale.
Le syndrome de sécheresse cutanée est un phénomène auto-entretenu nécessitant la mise en place d'un traitement.

C) Modalités de restauration de la barrière cutanée

La restauration de la barrière cutanée est un phénomène biologique très complexe, dynamique, qui se met en place après son altération de manière à rétablir le plus rapidement possible l'intégrité et l'homéostasie de la peau. Des chercheurs ont montré que, quel que soit le type d'altération de la barrière (mécanique par tape stripping séquentiel, chimique par application d'un solvant (acétone) ou d'un détergent (dodécylsulfate de sodium), les mécanismes mis en place sont les mêmes.

1) Les différentes étapes de la réparation de la barrière

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 (87).

La première étape de la réponse est la libération, en 30 à 120 minutes après la rupture, du contenu des corps lamellaires présents dans les cellules les plus externes de la couche granuleuse. Lors d'altération sévère, 70 à 90% des corps lamellaires du *stratum granulosum* vont être sécrétés (28). De nouveaux corps lamellaires sont formés en deux à six heures, en nombre plus important que la normale, et sont expulsés à leur tour (27, 72). Le contenu des corps lamellaires nouvellement formés semble être modifié par rapport à ce qui est observé lorsque la fonction barrière est intacte. En effet, des observations en microscopie électronique de coupes transversales de ces organites montrent une organisation en une seule couche continue en forme d'accordéon, plutôt qu'un empilement de structures discoïdes (72). La sécrétion accélérée de ces corps lamellaires se poursuit jusqu'au rétablissement complet de la matrice lipidique du *stratum corneum* et de la fonction barrière.

La deuxième étape, retardée de six heures environ par rapport à la rupture, consiste en l'élévation rapide et marquée de la synthèse des stérols et des acides gras, ainsi que des sphingolipides (39, 40). Des études sur la souris ont montré qu'en cas de déficience de la synthèse de ces lipides, un retard dans la réparation de la barrière et la formation de corps lamellaires anormaux sont observés. Cette étape est permise par une augmentation de l'activité de nombreuses enzymes impliquées dans leur voie de synthèse (27, 28). On note, par exemple, une augmentation de l'activité de la HMG-CoA (3-hydroxy-3-méthyl-glutarylcoenzymeA) réductase, de la HMG-CoA synthétase, de la farnesyl-diphosphate synthétase et de la squalène synthétase, enzymes impliquées dans la voie de synthèse du cholestérol (44). Les deux enzymes clés de la voie de synthèse des acides gras, l'acétyl-CoA carboxylase et l'acide-gras synthétase, voient, elles aussi, leur activité augmenter. La biosynthèse des céramides est également augmentée et il y a, notamment, une augmentation de l'activité de la sérine-palmitoyl-transférase, première enzyme dans la voie de synthèse des sphingolipides. On observe également une activation de certaines enzymes, comme la β-glucocérébrosidase et la sphingomyélinase acide, deux enzymes clés dans la formation des céramides intercellulaires (27, 28).

Enfin, on observe une stimulation de la prolifération et de la différenciation des cellules de l'épiderme. Plusieurs heures après l'augmentation de la synthèse d'acide gras et de cholestérol, il se produit une augmentation de la synthèse d'ADN épidermique qui entraîne une réponse d'hyperplasie de l'épiderme ; c'est un mécanisme de réparation appartenant à la phase tardive de la restauration de la fonction barrière (23, 27, 28, 39, 67, 68, 72, 95).

2) Les mécanismes de régulation de la réparation de la barrière cutanée

Il existe différents types de signaux qui permettent la régulation de la réparation de la barrière cutanée (Fig 10).

a) Le flux d'eau dans le *stratum corneum*

Il semblerait que le flux d'eau, créé au travers de l'épiderme suite à une rupture de la barrière cutanée, soit un des signaux déclenchant sa restauration (29, 44, 72). Ceci a été montré par des études menées sur des souries nues (39, 40). Dans une de ces expériences, la barrière cutanée était rompue par différentes méthodes, dont celle du tape stripping, puis les souris étaient séparées en deux lots. Sur les souris de l'un des lots, on appliquait une membrane occlusive complètement imperméable, en latex, tandis que sur celles de l'autre lot on apposait une membrane perméable à la vapeur d'eau de type Goretex. Il y avait soit absence, soit retard, de la survenue des événements qui mènent à la restauration de la barrière cutanée pour le lot doté de membrane imperméable.
La présence du flux d'eau permettrait notamment l'augmentation de la synthèse lipidique et la fabrication et la sécrétion de nouveaux corps lamellaires. Il régulerait également la transformation des feuillets dérivés des corps lamellaires en lamelles lipidiques intercellulaires (39, 72).

b) Les ions

i) L'ion calcium

Comme nous l'avons déjà mentionné, il existe au sein de l'épiderme un gradient de concentration en calcium (27, 29, 59). Après une rupture de la barrière cutanée, le mouvement d'eau, accru à travers le *stratum corneum* endommagé, transporte le calcium extracellulaire vers la surface de la peau, entraînant la disparition du gradient de concentration (27, 28, 95). Cette diminution de la concentration en calcium semble être le signal principal de la sécrétion des corps lamellaires (27, 28, 29) et induirait également l'augmentation de la synthèse lipidique (59). Le calcium a aussi un rôle dans la régulation de la synthèse protéique, dans la différentiation épidermique et dans l'adhésion des cellules entre elles.

ii) L'ion potassium

Le potassium a une répartition inverse de celle du calcium, sa concentration extracellulaire étant plus élevée au niveau de la couche épineuse et plus basse au niveau de la couche granuleuse. La restauration de la barrière est inhibée par de fortes concentrations extracellulaires en K^+ et accélérée par de faibles concentrations. En outre, l'inhibition de la restauration de la barrière induite par une concentration calcique élevée est potentialisée par la présence d'une forte concentration en K^+ (59).

iii) Autres ions

Il semblerait que d'autres ions aient un rôle dans le maintien de l'homéostasie de la barrière cutanée. Le flux d'ion chlorure, via les récepteurs GABA(A)-like ou les récepteurs glycine, provoquerait la repolarisation de la membrane cellulaire, cette dernière accélérant la fusion des corps lamellaires avec la membrane cellulaire du kératinocyte (16, 58). Les ions

phosphate et magnésium interviennent également dans la restauration de la barrière cutanée, grâce à des changements de leurs concentrations (16, 58).

c) Les cytokines

Une rupture de la barrière cutanée, qu'elle soit aiguë ou chronique, entraîne une augmentation des taux d'ARNm de cytokines telles que le TNF-α (Tumor Necrosis Factor), les interleukines -1 et -6, et le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor). Il a été démontré que l'augmentation des taux d'ARNm du TNF et des interleukines -1 et -6 est associée à une augmentation des formes actives de ces protéines (115, 120, 121).
Suite à une rupture de la barrière cutanée, l'augmentation de l'interleukine-1α, forme active de l'interleukine-1 dans l'épiderme, précède l'augmentation des taux d'ARNm (115, 120). Cela suggère qu'il en existe une réserve préformée dans les kératinocytes. Concernant l'interleukine-6, l'augmentation de sa forme active est accompagnée de l'augmentation de l'expression de son récepteur lié à la membrane. Elle intervient par ailleurs dans la régulation de la synthèse du cholestérol (115).
Il a été montré que l'application topique de ces cytokines suite à une rupture de la barrière cutanée accélère sa réparation (29). A l'inverse, des souris génétiquement déficientes en ces cytokines ou en leurs récepteurs présentent une réparation de la barrière retardée par rapport aux animaux témoins (29, 95).
Enfin, on peut noter le rôle de cytokines particulières, appelées chimiokines, qui permettent une infiltration du derme par des cellules comme les lymphocytes T ou les polynucléaires éosinophiles (86).

d) L'AMPc

Le 3',5'-adénosine monophosphate cyclique (AMPc) semble également jouer un rôle dans la restauration de la barrière cutanée. En effet, l'application topique de forskoline, qui active la synthèse de l'AMPc, retarde la restauration de la barrière, tandis que l'application d'antagoniste de l'AMPc accélère sa réparation (17).
Des observations en microscopie électronique montrent que ce retard, comme cette accélération, sont corrélés respectivement à un retard et à une accélération de la sécrétion des corps lamellaires. Il semble qu'il y ait une relation entre l'AMPc et le taux de calcium intracellulaire des kératinocytes. L'AMPc pourrait intervenir via le canal calcique voltage-dépendant, une augmentation de l'AMPc provoquant son ouverture et induisant un flux de calcium vers l'intérieur des kératinocytes.
L'AMPc serait également impliqué dans l'expression des cytokines.

e) Autres messagers

De nombreuses autres molécules semblent intervenir dans la restauration de la barrière cutanée. On peut citer, notamment, le monoxyde d'azote et le récepteur 2 activé par la protéinase (PAR2), dont l'augmentation de concentration retarde la restauration de la barrière cutanée (29).

3) Les facteurs influençant la restauration de l'épiderme

La rapidité de la restauration de l'épiderme varie selon l'espèce considérée (74). Par ailleurs, 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. L'état émotionnel aurait aussi un rôle. 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 et que l'utilisation de sédatifs supprimait ce retard (15). La restauration de la barrière cutanée peut, enfin, être accélérée par l'utilisation de certains topiques (83, 87, 124).

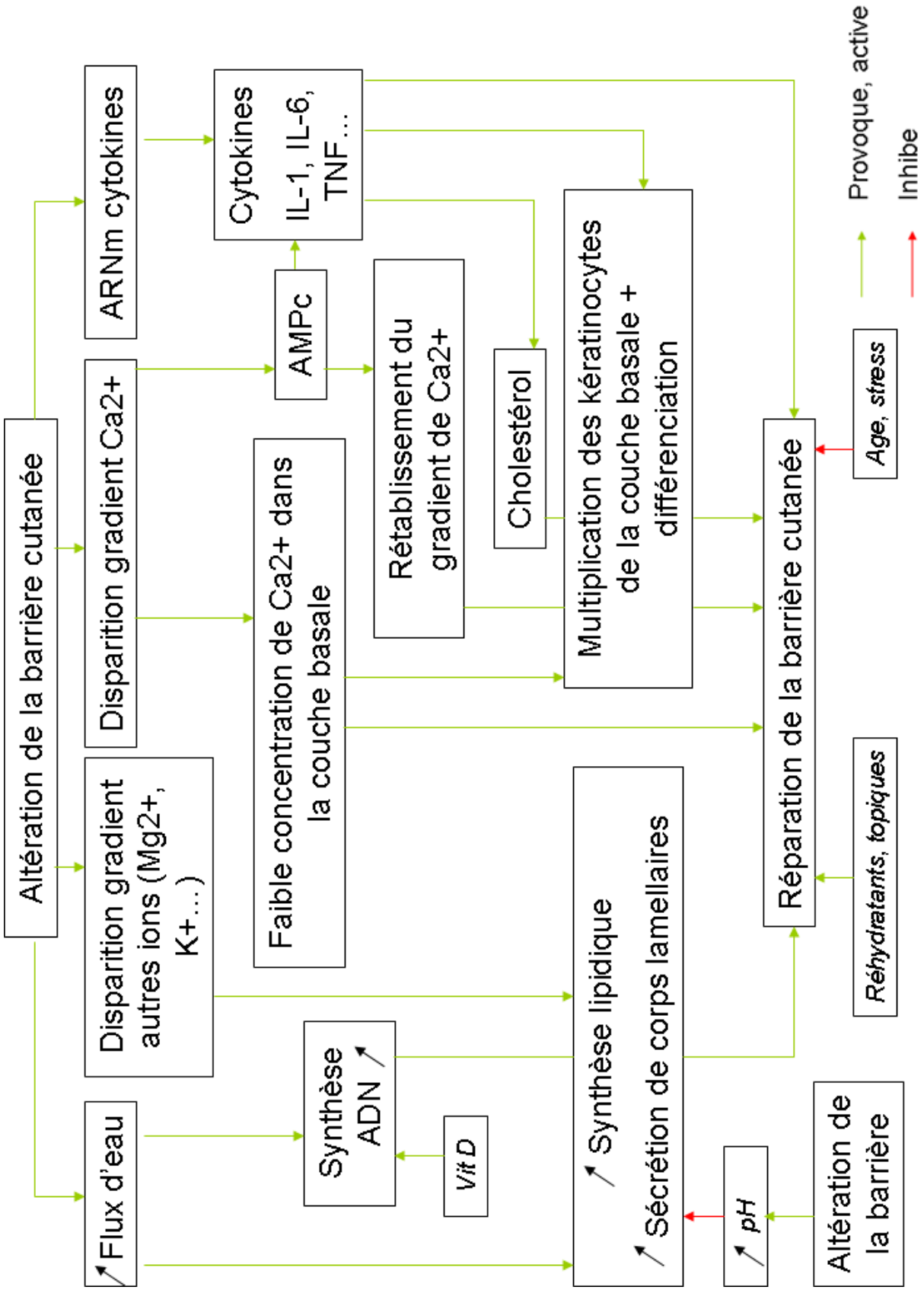


Figure 10 : Mécanismes de régulation de la réparation de la barrière cutanée

PARTIE EXPERIMENTALE

I/ Etudes pilotes

Deux études pilotes ont été menées avant de réaliser la véritable étude. Elles avaient pour but d'établir le meilleur protocole permettant d'étudier l'effet de la lotion DouxocalmND sur la réparation de la barrière cutanée. Elles sont uniquement basées sur une analyse graphique des résultats de TEWL obtenus.

A) Première étude pilote

1) Animal

La première étude pilote a été réalisée chez une chienne beagle de 2 ans, pesant 6,9 kg. L'absence d'antécédent pathologique et un examen clinique complet nous permettent d'affirmer que la chienne est en bonne santé et ne présente aucun signe cutané. Aucun traitement, systémique ou topique, autre qu'un traitement antiparasitaire interne, n'a été réalisé dans les trois mois précédant le début de l'étude.
La chienne est logée à l'Institut Claude Bourgelat – VetAgro Sup Campus Vétérinaire dans un box individuel nettoyé deux fois par jour. Ce dernier se trouve dans une pièce où la température et l'humidité sont contrôlées : 25-28°C, 25-45% d'humidité relative. Toutes les modalités de cette expérience ont été approuvées par le comité d'éthique de VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon.

2) Création des sites d'études

La chienne est tondue délicatement à droite et à gauche, au niveau du thorax et des flancs, le jour même du début de l'étude, et n'est pas retondue par la suite. Une large zone de manipulation mesurant environ 25 cm de long sur 8 cm de large est ainsi crée sur la moitié ventrale du thorax, de chaque côté du sternum. Sur les zones obtenues, cinq sites de 2 x 3 cm sont matérialisés avec un feutre indélébile (Fig 11). C'est sur ces sites que seront appliqués les scotchs. Le côté droit correspond au côté traité, le côté gauche au côté témoin.

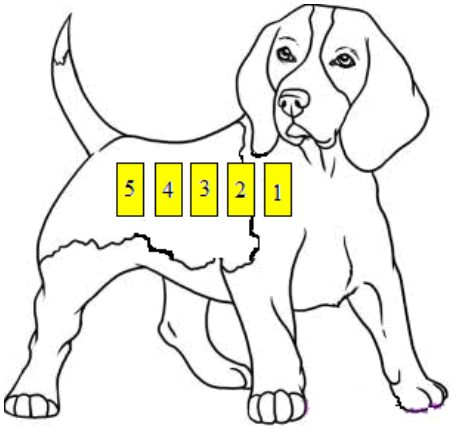


Figure 11 : Répartition des 5 sites, modifié d'après : http://www.beagle-attitude.com/t1304-jeu-concours-dessine-moi

3) Méthode de rupture de la barrière cutanée par tape-stripping

Dans cette première étude pilote, nous disposions du sujet pour un temps restreint qui ne nous permettait pas de réaliser une rupture chronique de la barrière cutanée. Nous avons donc réalisé une rupture aiguë, par application de morceaux de ruban adhésif ou « strips » sur les sites cutanés préalablement définis, afin d'obtenir une valeur de la PIE comprise entre 80 et 150 $g.m^{-2}.h^{-1}$. Le but était de déterminer pour quelles valeurs de PIE l'application de DouxocalmND semblait avoir le plus d'impact. L'application des scotchs a été réalisée immédiatement après la tonte.
Le ruban adhésif employé est du scotch cristal de 2 cm de largeur. Il est appliqué sur le site et y est maintenu 10 secondes en exerçant une pression constante avec le pouce sur toute la surface du scotch. Puis le scotch est retiré lentement, en 2 secondes environ, de façon unidirectionnelle. Pour limiter la variabilité tout en avançant rapidement le travail, deux opérateurs ont réalisés cette rupture de la barrière. Chaque opérateur appliquait 10 scotchs sur les 5 sites d'un côté, puis les places étaient échangées. La PIE était mesurée tous les 5 à 10 scotchs pour vérifier que l'on restait dans les valeurs souhaitées.
Les valeurs obtenues à la fin de la phase de rupture de la barrière sont répertoriées dans le tableau I.

	Valeur moyenne de la PIE du côté droit	Valeur moyenne de la PIE du côté gauche	Nombre moyen de scotchs appliqués à droite	Nombre moyen de scotchs appliqués à gauche
Chien pilote 1	121,2	179 ,8	55	86

Tableau I : Valeurs moyennes de la PIE à la fin de la procédure de rupture aiguë de la barrière cutanée

4) Application du DOUXOCALMND

Les sites 1, 2 et 5 du côté droit reçoivent une application de DOUXOCALMND mousse MO une fois par jour. Les sites 3 et 4 du côté droit reçoivent une application de la lotion après chaque mesure. Du côté gauche, côté témoin, les sites évoluent spontanément. Avant application, le produit est homogénéisé par agitation douce du flacon. La quantité de produit équivalente à une pression maximale est étalée sur l'ensemble de la zone, soit sur environ 200 cm^2, en massant délicatement pendant 20 secondes.

5) Mesures de la PIE

La première étude pilote s'est déroulée sur trois jours. Le suivi de la restauration de la barrière cutanée s'effectue entre autre par la mesure de la perte insensible en eau. Cette dernière est mesurée avec un appareil à chambre fermée non ventilée, le VapoMeter® (Delfin Technologies Ltd, Kuopio, Finlande). Cet appareil contient un capteur d'humidité directement intégré à la sonde. Un écran digital affiche le résultat de la mesure en $g.m^{-2}.h^{-1}$. L'humidité et la température de la chambre sont mesurées avant l'application de la sonde sur la peau. Le VapoMeter® est activé via un bouton puis la sonde est placée perpendiculairement à la surface de la peau. La pression appliquée sur la sonde est modérée, juste assez pour éviter les flux d'air entre la chambre et le milieu extérieur. Les valeurs sont directement transmises à un logiciel de traitement des données installé sur un ordinateur portable.

Photographie 1 : Le VapoMeter Delfin®

Pour chaque site, on réalise 3 mesures successives et la moyenne des trois valeurs obtenues est utilisée pour l'étude graphique.
Le premier jour de mesure, la PIE a été mesurée toutes les 3 h sur tous les sites jusqu'à 9h après la première application du produit. Le deuxième jour de l'étude, trois mesures ont été effectuées à 5h d'intervalle. Le troisième et dernier jour de l'étude, nous avons réalisé une mesure le matin et une mesure le soir.
En plus des mesures de la PIE des sites étudiés, une mesure de la PIE en peau saine est réalisée tous les jours, aussi bien du côté témoin que du côté traité. Toutes les mesures sont réalisées dans une pièce à ambiance contrôlée : la température est de 25°C +/- 1°C et l'humidité relative de 30% +/- 5%. La chienne disposait de 15 minutes dans la pièce pour s'acclimater avant la mesure. Le relevé de toutes les mesures de la première étude pilote est disponible en annexe 1.

Photographie 2 : Mesure de la PIE à l'aide du VapoMeter Delfin®

6) Résultats graphiques

La moyenne de la PIE des 5 sites de chaque côté est calculée pour chaque mesure. On obtient le graphique disponible ci-dessous (Fig 12). On remarque que la courbe obtenue du côté témoin décroit plus rapidement que celle du côté traité pendant les 9 premières heures, puis les deux courbes sont d'aspect similaire. Le tracé des régressions linéaires montre que la pente du côté traité est un tout petit peu moins importante que celle du côté témoin.

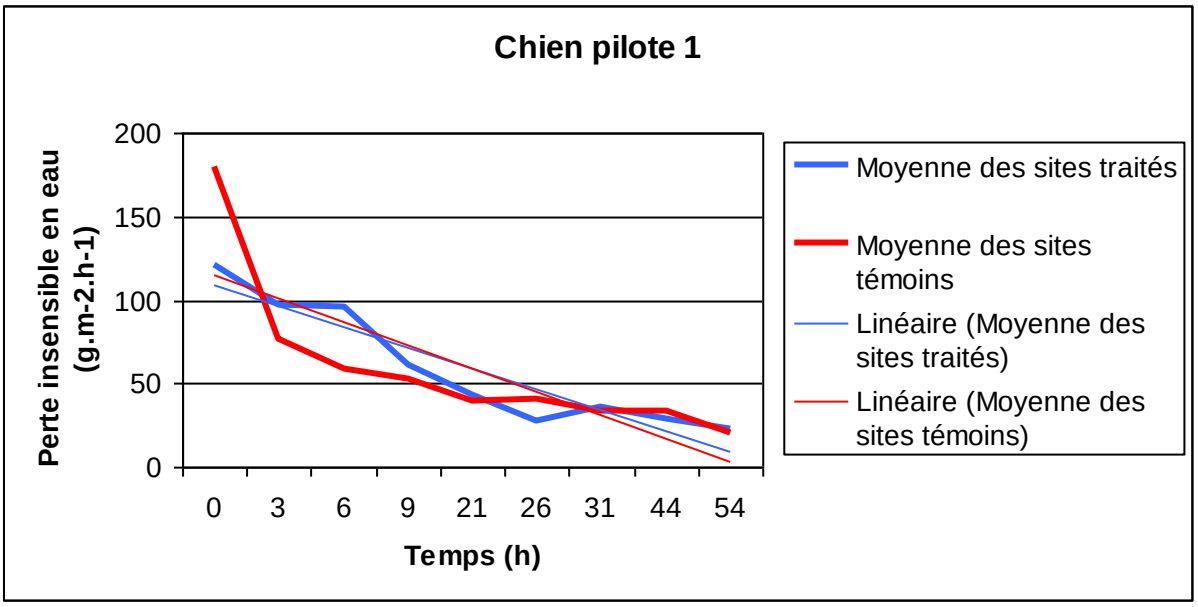


Figure 12 : Graphique représentant la PIE en fonction du temps chez le premier chien pilote

B) Deuxième étude pilote

1) Animal

La deuxième étude pilote a été réalisée chez une chien beagle mâle entier de 3 ans pesant 9 kg. De même que l'animal précédent, le chien est jugé en bonne santé et n'a reçu aucun traitement dans les trois mois avant l'étude pilote. Le chien est également logé à l'Institut Claude Bourgelat – VetAgro Sup Campus Vétérinaire dans un box individuel remplissant les mêmes conditions que celui du premier chien pilote.

2) Création des sites d'études

Les sites d'études sélectionnés sont identiques à ceux de la première étude. Les mêmes manipulations sont effectuées sur le sujet.

3) Méthode de rupture de la barrière cutanée par tape-stripping

Dans cette deuxième étude pilote, c'est à nouveau une rupture aiguë de la barrière cutanée qui a été employée. Les scotchs ont été appliqués sur les sites afin d'obtenir une valeur de la PIE comprise entre 30 et 40 $g.m^{-2}.h^{-1}$, qui correspondent davantage à des valeurs de perte insensible en eau rencontrées dans les maladies visées par le produit. L'application des scotchs a été réalisée immédiatement après la tonte. Le ruban adhésif employé répond aux mêmes critères que précédemment et est appliqué de la même manière.
Les valeurs obtenues à l'issue de la phase de rupture de la barrière sont répertoriées dans le tableau II.

	Valeur moyenne de la PIE du côté droit	Valeur moyenne de la PIE du côté gauche	Nombre moyen de scotchs appliqués à droite	Nombre moyen de scotchs appliqués à gauche
Chien pilote 1	35,6	33,7	28	21

Tableau II : Valeurs moyennes de la PIE à la fin de la procédure de rupture aiguë de la barrière cutanée

4) Application du DOUXOCALMND

Les sites 1, 2 et 3 du côté droit reçoivent une application de DOUXOCALMND mousse MO une fois par jour. Les sites 4 et 5 du côté droit reçoivent une application de la lotion après chaque mesure. Du côté gauche, côté témoin, les sites évoluent spontanément. De même que dans la première étude, le produit est homogénéisé avant application. La quantité de produit équivalente à une pression maximale est étalée sur l'ensemble de la zone, soit sur environ 200 cm^2, en massant délicatement pendant 20 secondes.

5) Mesures de la PIE

La seconde étude pilote s'est également déroulée sur trois jours. Le suivi de la restauration de la barrière cutanée s'effectue par la mesure de la perte insensible en eau avec le VapoMeter®. Pour chaque site, on réalise 3 mesures successives et la moyenne des trois valeurs obtenues est utilisée pour l'étude graphique.
Le premier jour de mesure, la PIE a été mesurée toutes les 3 h sur tous les sites jusqu'à 9h après la première application du produit. Les deuxième et troisième jours de l'étude, trois mesures ont été effectuées à 5 h d'intervalle.
En plus des mesures de PIE sur les sites étudiés, une mesure de la PIE en peau saine est réalisée tous les jours, aussi bien du côté témoin que du côté traité. Toutes les mesures sont réalisées dans une pièce à ambiance contrôlée : la température est de 25°C +/- 1°C et l'humidité relative de 30% +/- 5%. La chienne disposait de 15 minutes dans la pièce pour s'acclimater avant la mesure.
Le relevé de toutes les mesures de la deuxième étude pilote est disponible en annexe 1.

6) Résultats graphiques

La moyenne de la PIE des 5 sites de chaque côté est calculée pour chaque mesure. On obtient le graphique disponible ci-dessous (Fig 13). On remarque qu'aux alentours de 9h, les deux courbes remontent, ce qui peut s'expliquer par le fait que le chien se soit gratté. Cette partie est donc difficilement interprétable. Au-delà de 9h, la courbe du côté traité semble décroître plus rapidement que celle du côté témoin. Le tracé des régressions linéaires montre que la pente du côté traité est un peu plus importante que celle du côté témoin.

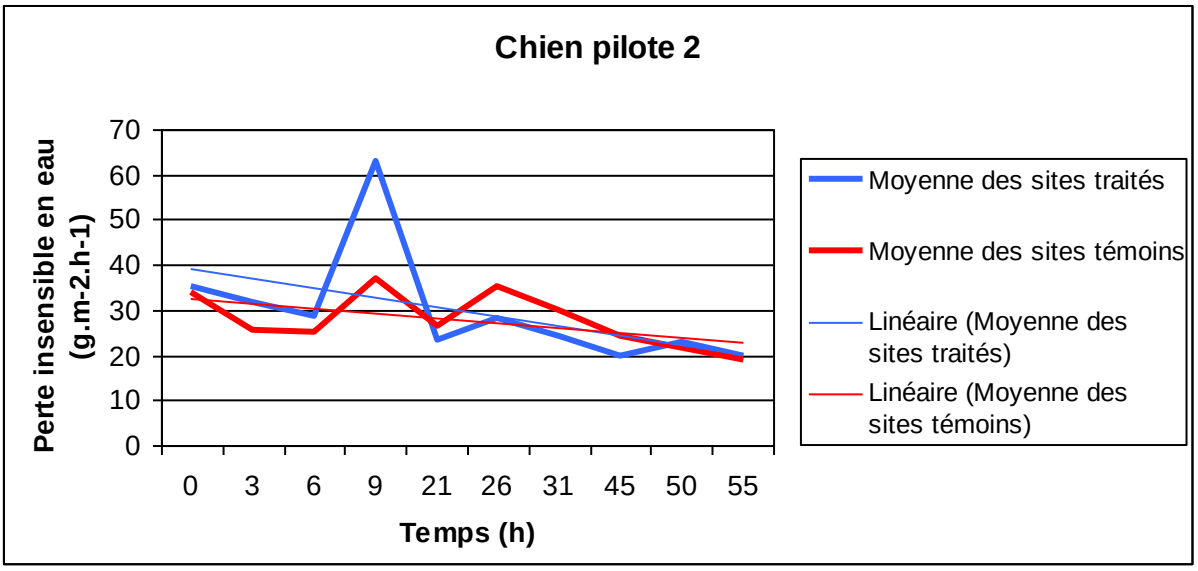


Figure 13 : Graphique représentant la PIE en fonction du temps chez le second chien pilote

C) Conclusions

De ces deux études, on peut retenir plusieurs éléments intéressants. Tout d'abord, il semble qu'on obtienne de meilleurs résultats quand la valeur de PIE initialement choisie est comprise entre 30 et 40 $g.m^{-2}.h^{-1}$. En effet, la pente de la régression linéaire du côté traité du deuxième chien pilote est plus forte que celle du côté témoin, ce qui montre une récupération plus importante de la fonction barrière. Avec des valeurs de PIE initiales plus élevées, la valeur de cette pente est à l'inverse plus faible que celle du côté témoin. Cela est plutôt intéressant car les valeurs moyennes de PIE sont plus proches de celles des conditions recommandées pour l'utilisation du produit. Par ailleurs, le fait de mettre une ou plusieurs fois du produit ne semble pas avoir d'influence, il est donc préférable pour l'expérience de respecter l'utilisation préconisée, à savoir une application quotidienne. Enfin, on n'a pas plus d'effet sur les 9 premières heures qu'au-delà ; réaliser des mesures quotidiennes est donc suffisant, exception faite du premier jour où il est préférable de réaliser une mesure biquotidienne car c'est dans les 24 premières heures qu'on a le plus fort pourcentage de récupération.

D'un point de vue pratique, les études pilotes ont mis à jour plusieurs problèmes. Tout d'abord, le temps nécessaire pour atteindre des valeurs élevées de PIE par tape-stripping est très important. De plus, les sites 4 et 5 des deux côtés sont difficilement exploitables : il faut généralement plus de 3 mesures de PIE pour obtenir des valeurs proches et il faut, en moyenne, un plus grand nombre de scotch pour atteindre les mêmes valeurs de PIE que sur les sites 1, 2 ou 3. Dans l'expérience principale, il sera donc intéressant de changer l'emplacement de ces sites. Enfin, effectuer la mesure de PIE de tous les sites prend environ 1 h par chien. Il est donc impossible de réaliser des mesures de PIE toutes les 3 h s'il y a 5 chiens qui participent à l'étude.

L'ensemble de ces observations permet donc d'établir un protocole le plus adapté possible pour le déroulement de l'étude principale. Il faut toutefois préciser qu'au vu des premiers graphiques, les courbes obtenues à partir des valeurs de TEWL mesurées du côté traité et du côté témoin sont dans l'ensemble très semblables, ce qui laisse supposer qu'il n'y aura peut-être pas de différence majeure entre les deux côtés, en ce qui concerne le TEWL, lors de l'expérience principale.

II/ Etude proprement dite

Le but de cette expérience est d'évaluer l'effet d'une lotion hydratante et anti-inflammatoire, DOUXOCALMND mousse MO, produite par le laboratoire SOGEVAL, sur la réparation de la barrière cutanée chez le chien. L'hypothèse avancée est que l'application de cette lotion sur la peau favorise la réparation de la barrière cutanée. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à une rupture chronique et d'intensité modérée de la barrière cutanée, par la méthode de tape-stripping, et nous avons suivi l'évolution de la réparation de la fonction barrière, en comparant la restauration spontanée à celle influencée par l'application de la lotion.
Concernant le modèle de rupture chronique de la barrière cutanée, les strips sont effectués sur un même site, plusieurs jours de suite, jusqu'à obtenir des valeurs de PIE comprises entre 20 et 40 $g.m^{-2}.h^{-1}$, valeurs trouvées chez des chiens présentant une dermatite atopique non traitée de manière spécifique. L'étude de la restauration de la barrière se fait par le suivi de l'aspect clinique des lésions, par le suivi de la perte insensible en eau, par le suivi du pH et par l'examen histopathologique de biopsies cutanées itératives des zones étudiées.

A) Matériels et méthodes

1) Animaux

L'expérience est menée sur cinq chiens mâles entiers de race Beagle. Ils sont âgés de 1 an à 3,5 ans. Ils pèsent de 7 à 12 kg. L'absence d'antécédent pathologique et un examen clinique complet nous permettent d'affirmer que les chiens sont en bonne santé et ne présentent aucun signe cutané. Aucun traitement, systémique ou topique, autre qu'un traitement antiparasitaire interne, n'a été réalisé dans les trois mois précédant le début de l'étude.
Tous les chiens sont logés à l'Institut Claude Bourgelat – VetAgro Sup Campus Vétérinaire dans des box individuels nettoyés deux fois par jour. Il était prévu que les chiens portent un collier Elizabethain pendant le déroulement de l'étude pour diminuer les léchages, mais les chiens ne s'y habituant pas, il a été décidé de procéder sans. Les logements se trouvent tous dans la même pièce, où la température et l'humidité sont contrôlées : 25-28°C, 25-45% d'humidité relative. Avant le début de l'expérience, les chiens ont été acclimatés pendant une semaine à leur nouvel environnement. Ils sont nourris avec des croquettes physiologiques depuis plus de 12 semaines avant le début de l'étude et disposent d'eau à volonté. Ils sont identifiés par tatouage. Ils sont promenés en laisse et ont accès à des jeux surveillés régulièrement au cours de l'étude. Pour différencier les chiens au cours de l'étude, un numéro leur est attribué et est tracé sur les 2 oreilles à l'aide d'un marqueur indélébile (Photo 3).
Toutes les modalités de cette expérience ont été approuvées par le comité d'éthique de VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon.

Photographie 3: Identification des sujets à l'aide d'un numéro tracé au marqueur noir sur l'oreille

2) Création des sites d'études

L'étude s'est déroulée sur 10 jours, selon le planning suivant (Tab III):

	Induction						Récupération				
Jour	0 Lu	1 Ma	2 Me	3 Je	4 Ve	5 Sa	6 Lu	7 Ma	8 Me	9 Je	10 Ve
Tonte	x		x		x		x		x		x
Strips		x	x	x	x	x	x				
PIE	peau saine	x*	x*	x*	x*	x*	x#	x+	x+	x+	x+
pH	peau saine	x*	x*	x*	x*	x*	x#	x+	x+	x+	x+
Application de DouxocalmND							x	x	x	x	x
Biopsie	peau saine						x		x		x

Tableau III : Planning de l'étude

Avec :
- x* = mesure une fois par jour après les strips
- x# = mesure immédiatement après les strips et 8h après application de DouxocalmND
- x+ = mesure une fois par jour, avant application de DouxocalmND

Tous les chiens sont tondus délicatement à droite et à gauche, au niveau du thorax, 24 heures avant le début de l'étude puis un jour sur deux jusqu'à la fin de l'étude. Une large zone de manipulation mesurant environ 20 cm de long sur 10 cm de large est ainsi créée sur la moitié ventrale du thorax, de chaque côté du sternum. Il s'agit en effet de zones peu velues, relativement planes et aisées à biopsier. Sur les zones obtenues, cinq sites de 2 x 3 cm sont matérialisés avec un feutre indélébile (Photo 4). C'est sur ces sites que seront appliqués les strips. Le côté droit correspond au côté traité, le côté gauche au côté témoin (Fig 14).

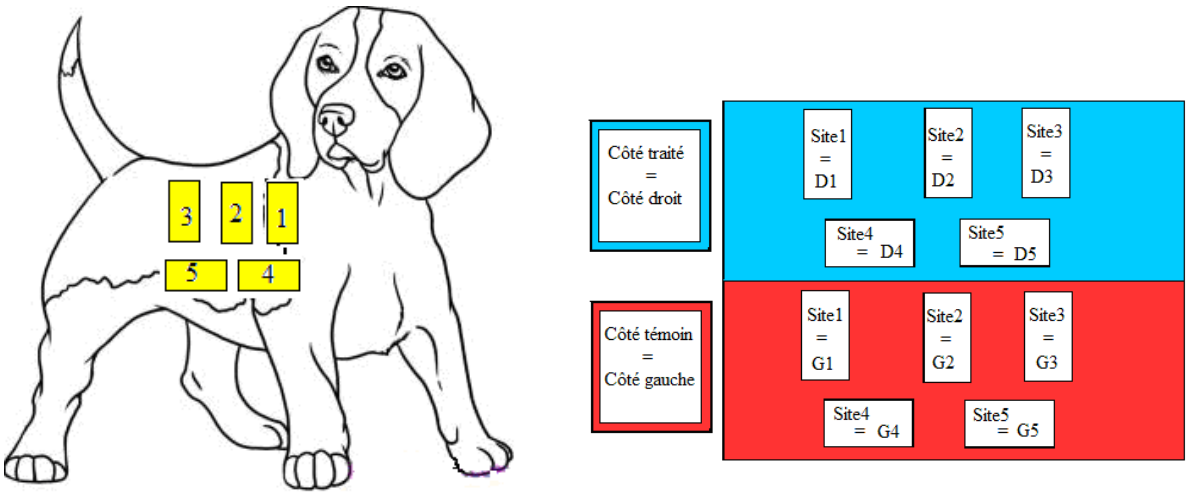


Figure 14 : Répartition des 5 sites, modifié d'après : http://www.beagle-attitude.com/t1304-jeu-concours-dessine-moi

Photographie 4 : Répartition des 5 sites de mesure

3) Méthode de rupture chronique de la barrière cutanée par tape-stripping

La rupture chronique de la barrière cutanée a été obtenue par une application répétée de morceaux de ruban adhésif ou « strips », tous les jours de J1 à J6, sur des sites cutanés préalablement définis, afin d'obtenir des valeurs de la PIE comprises entre 20 et 40 $g.m^{-2}.h^{-1}$, valeurs trouvées chez des chiens présentant une dermatite atopique non traitée de manière spécifique, et en accord avec les conclusions des études pilotes préalablement menées .
La méthode de tape-stripping employée est la même que celle des études pilotes. Le ruban adhésif employé est du scotch cristal de 2 cm de largeur. Il est appliqué sur le site, et y est maintenu 10 secondes en exerçant une pression constante avec le pouce sur toute la surface du scotch. Puis le scotch est retiré lentement, en 2 secondes environ, de façon unidirectionnelle. Pour limiter la variabilité tout en avançant rapidement le travail, deux opérateurs ont réalisé cette rupture de la barrière. Chaque opérateur appliquait 10 scotchs sur les 5 sites d'un côté, puis les places étaient échangées. La PIE était mesurée tous les 5 à 10 scotchs pour vérifier que l'on restait dans les valeurs souhaitées.

Le modèle de rupture chronique permet de tester l'efficacité d'un produit à la fois sur la restauration de la barrière imperméable, évaluée par la mesure de la perte insensible en eau et du pH, et sur les modifications induites par une rupture chronique, telles que l'hyperplasie épidermique et l'inflammation dermique persistante, évaluées par l'examen histopathologique.
Une biopsie est effectuée avant les premiers strips à J0, en peau saine. Un examen clinique des sites ainsi qu'une biopsie à J6 permettent d'illustrer les lésions macroscopiques (Photo 5) et microscopiques induites par le stripping et de les corroborer à la mesure de la PIE et du pH.

Au terme de cette première partie d'une durée d'une semaine, la moyenne des valeurs de la perte insensible en eau est de 31,15 $g.m^{-2}.h^{-1}$ du côté témoin et de 30,16 $g.m^{-2}.h^{-1}$ du côté traité. Quant au pH, la moyenne des valeurs est de 7,12 du côté témoin et de 7,2 du côté traité. Le tableau IV regroupe les moyennes des valeurs de la PIE et du pH à J0 des sites témoins et des sites traités pour chaque chien, ainsi que le nombre moyen de scotchs qu'il a fallu appliquer pour atteindre ces valeurs.

	Valeur moyenne du côté traité (droit)		Valeur moyenne du côté témoin (gauche)		Nombre moyen de scotchs appliqués à droite	Nombre moyen de scotchs appliqués à gauche
	De la PIE	Du pH	De la PIE	Du pH		
Chien 1	31,43	6,54	31,26	6,54	88	78
Chien 2	29,1	7,12	29,5	7,54	116	105
Chien 3	30,2	7,52	29,96	7,48	74	67
Chien 4	30,2	7,64	36,4	7,14	101	77
Chien 5	29,88	7,16	28,64	6,9	66	86
Moyenne	30,16	7,2	31,15	7,12	89	69

Tableau IV : Valeurs moyennes de la PIE, du pH, et du nombre de scotchs appliqués à la fin de la procédure de rupture chronique de la barrière cutanée

Photographie 5 : Erythème bien visible sur les 5 sites au terme de la semaine de rupture chronique de la barrière cutanée par tape-stripping, à J6

Le nombre de scotchs appliqués quotidiennement pour chaque site est disponible en annexe 2.

L'analyse des biopsies réalisées à la fin de l'établissement du modèle de rupture chronique de la barrière cutanée sera présentée ultérieurement (cf. p 79).

4) Le DOUXOCALMND mousse MO

a) Objectifs

Le produit DouxocalmND mousse MO a pour objectifs thérapeutiques la gestion du prurit dans le cas de maladies telles que la dermatite atopique ou la dermatite allergique aux piqûres de puces. Son mécanisme serait la normalisation de la structure et du fonctionnement de la

barrière cutanée, l'apaisement des démangeaisons et la gestion de la flore cutanée de surface. A plus long terme, il diminuerait la survenue des crises allergiques.
DouxocalmND mousse MO se veut être un produit d'application facile, améliorant l'aspect de la peau et du pelage du chien. Un effet « rémanent » permettrait de diminuer le nombre d'applications.

b) Mode d'action théorique

Le DouxocalmND mousse MO favoriserait la restauration de la fonction barrière de la peau en agissant de 4 manières différentes.

i) Il permet la reconstruction de la barrière

Le DouxocalmND mousse MO contient divers éléments qui vont favoriser la reconstruction de la barrière épidermique.

1) Le SK-influx V

Il rentre dans la composition du DouxocalmND à hauteur de 1%.
Il s'agit d'un mélange de divers céramides (3, 6 II, 1), de phytosphingosine, de cholestérol et d'acides gras. Il mime la formation naturelle de la barrière lipidique, en jouant le rôle des corps lamellaires. Les céramides, les acides gras et le cholestérol agissent en synergie. Ils permettent la restauration de la fonction barrière protectrice et l'amélioration de l'hydratation de la peau (126).
L'apport de céramides se fait sous une forme directement assimilable par le *stratum corneum* ; il s'agit d'une structure multi-lamellaire de type cristaux liquides qui pénètrent dans les couches profondes de l'épiderme.
Le SK-influx V permet une meilleure assimilation par rapport à d'autres émulsions. Il est utilisé sur les peaux sèches et sensibles.

2) La pseudo-filaggrine

Elle rentre pour 0,5% dans la composition du DouxocalmND. Il s'agit d'un peptide riche en glutamate. Sa formule est voisine de celle de la filaggrine. Elle est extraite de levures. Elle permet une augmentation de l'hydratation cutanée, notamment en favorisant la formation de FNH.

3) Le lipidure PMB

Il compose 0,1% du DouxocalmND. Le Lipidure PMB (Polyquaternium-51 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine and Butyl-methacrylate) est un phospholipide qui améliore la capacité de rétention d'eau de l'épiderme. Les polymères de phosphorylcholine miment les bicouches lipidiques des membranes cellulaires. C'est un hydratant biocompatible. Outre sa capacité de rétention d'eau et de prévention de la perte insensible en eau, il renforce la fonction barrière de la peau en formant un hydrogel protecteur à sa surface. Cet effet persiste même après plusieurs rinçages. Le Lipidure PMB possède également des propriétés anti-inflammatoires ; il inhibe la production d'interleukine-1α et diminue l'irritation.

4) La phytosphingosine hydrochloride

Elle compose 0,05% du DouxocalmND. Elle est synthétisée par génie génétique, c'est un pro-céramide universel. Elle va promouvoir la restauration de la barrière en jouant le rôle des céramides. Elle possède également un effet anti-inflammatoire en inhibant l'activité de l'interleukine-1α. Enfin, elle a un rôle antimicrobien (79).

ii) Il calme rapidement le prurit

Ce rôle est assuré essentiellement par les avenanthramides, qui composent 1% du DouxocalmND. Les avenanthramides sont extraites d'une fraction purifiée d'extraits colloïdaux d'avoine.
Elles possèdent un fort effet anti-inflammatoire, grâce à leur action antihistaminique et aux polyphénols à action anti-oxydante. Parmi un groupe d'au moins 25 avenanthramides, trois prédominent dans les grains d'avoine: Bc (ou avenanthramide C), Bf (ou avenanthramide B) et Bp (ou avenanthramide A). *In vitro*, des expériences montrent que les effets antioxydants varient avec le type d'avenanthramide, avec Bc> Bf> Bp. Des études menées chez l'homme ont montré, par des tests cutanés *in vivo* combinés avec un test *in vitro*, que l'activité inhibitrice des avenanthramides sur l'histamine bloque la libération de mastocytes. Ces résultats illustrent l'action anti-inflammatoire et anti-démangeaison des avenanthramides. Plus récemment, des extraits contenant des avenanthramides ont été utilisés en médecine vétérinaire dans divers topiques, tels que des shampooings, des sprays et des produits de nettoyage auriculaire, pour soulager les animaux présentant des maladies cutanées, y compris la dermatite atopique (128).

iii) Il contrôle l'inflammation persistante

C'est notamment le rôle principal du Stimutex AS, qui rentre à hauteur de 1% dans la composition du produit. Il s'agit d'un mélange de fraction de cire de graine d'orge obtenue par CO_2 supercritique, de beurre de karité et d'huile d'argan. *In vitro*, il inhibe la sécrétion d'interleukine-1α et la libération d'histamine.
D'autres constituants dont nous avons déjà parlé, comme les avenanthramides, la phytosphingosine hydrochloride ou encore le lipidure PMB, jouent également un rôle anti-inflammatoire.

iv) Il contrôle les flores de prolifération

Ce rôle est assuré par la phytosphingosine hydrochloride, dont nous avons déjà parlé. La phytosphingosine fait partie des défenses naturelles de l'épiderme, et elle agit avec des concentrations minimales inhibitrices très basses. Elle permet ainsi la régulation des flores bactériennes et fongiques.

c) Application du DouxocalmND mousse MO

Pour chaque chien, les sites du côté droit reçoivent une application de DouxocalmND mousse MO (Photo 6) une fois par jour à partir de la deuxième semaine, tandis que les sites du côté gauche, côté témoin, évoluent spontanément. Avant application, le produit est homogénéisé par agitation douce du flacon. La quantité de produit équivalente à une pression maximale est étalée sur l'ensemble de la zone, soit sur environ 150 cm^2, en massant délicatement pendant 20 secondes.

Photographie 6 : La lotion Douxocalm, sous sa forme commerciale à gauche, sous forme d'échantillon au centre, et les deux côte à côte à droite

5) Etude histopathologique des biopsies cutanées

Au cours de l'étude, plusieurs biopsies ont été effectuées (Photo 7). La première série de biopsie a été réalisée en peau saine, à J0, avant l'application des scotchs. Puis une seconde série a été réalisée à J6, au terme de la rupture chronique de la barrière cutanée par la méthode de tape-stripping et avant application de la lotion. La troisième série a été réalisée à J8, soit trois jours après la première application de DouxocalmND mousse. Enfin une dernière série à été effectuée au terme de l'étude, à J10.

Photographie 7 : Deux sites de biopsies

Les biopsies cutanées ont été réalisées à l'aide de trépans à biopsie de 6 mm de diamètre, et sous anesthésie locale, obtenue par une injection 5 minutes avant la manœuvre de 0,5 mL de xilocaïne sous cutanée.
Pour chaque biopsie, un site du côté traité et un site du côté témoin sont choisis au hasard. Les biopsies cutanées sont fixées dans du formol à 10% et inclues en paraffine ; des sections de 5 µm sont réalisées et colorées à l'hémalun-éosine. Cette coloration permet entre autre d'apprécier l'épaisseur et la nature de la couche cornée, ainsi que l'épaisseur de l'épiderme.
Des colorations de Luna qui permettent la mise en évidence des polynucléaires éosinophiles ou de leurs granules sont aussi effectuées.

Enfin, une étude en immunohistochimie utilisant la technique avidine-biotine-peroxydase est réalisée. Le Ki67 permet le marquage des cellules engagées dans le cycle cellulaire et donne l'indice de la prolifération épidermique. Pour réaliser le comptage, on choisit, chez chacun des chiens, deux zones de comptage sur une section de chacune des biopsies de sites, du côté traité et du côté témoin, et on compte 100 kératinocytes de la couche basale et, parmi ces 100 cellules, combien sont marquées. La moyenne des valeurs de tous les sites est ensuite réalisée pour chacun des deux côtés, traités et témoins.

Différentes populations cellulaires sont présentes : les marquages Bla36, CD3 et Mac387 identifient, respectivement, les cellules dendritiques, les lymphocytes T et les monocytes/histiocytes. Pour réaliser le comptage des populations cellulaires, on choisit pour chaque chien un site en région dermique et un site en région épidermique pour chaque côté étudié. Pour chacun des sites, on évalue approximativement le nombre de cellules colorées. Ce n'est pas un vrai comptage cellulaire qui est réalisé, il s'agit d'avoir une idée globale. Selon l'impression ressentie, on classe les sites de la manière suivante : absence = 0, faible densité = 1, densité moyenne = 2, densité intense = 3. Puis, pour chacun des côtés, on effectue la moyenne des nombres obtenus pour chaque site. Si les cellules peuvent être normalement présentes dans le derme et l'épiderme, on divise par le nombre total de sites, sinon on divise par la moitié du nombre total de sites.

Les moyennes de tous les immunomarquages réalisés, pour les sites témoins ou traités, aux différents temps, sont indiquées dans le tableau V, ci-dessous.

	Peau normale	J0	J3 sites témoins	J3 sites traités	J5 sites témoins	J5 sites traités
Lymphocytes T (CD3)	0,15	0,65	0,25	0,12	0,6	0,12
Cellules dendritiques (Bla36)	1	1,7	1,7	1,3	1,7	1
Monocytes-macrophages (Mac387)	0	1	0,7	0,7	0,9	0,3
Cellules en cycle (Ki67)	12	35	37	30	38	22

Tableau V : Valeurs moyennes obtenues d'après le comptage de chaque population cellulaire, pour les côtés traités et témoins, aux différents temps, suite à l'étude en immunohistochimie

6) Mesures de la PIE

Le suivi de la restauration de la barrière cutanée s'effectue entre autres par la mesure de la perte insensible en eau. Cette dernière est mesurée avec un appareil à chambre fermée non ventilée, le VapoMeter® (Delfin Technologies Ltd, Kuopio, Finlande) (cf. p 45).

Pour chaque site, on réalise 3 mesures successives et la moyenne des trois valeurs obtenues est utilisée pour l'étude. A J6, le premier jour de mesure de la PIE, les mesures sont réalisées immédiatement après la réalisation des derniers strips. La lotion DouxocalmND mousse MO est ensuite appliquée. Une seconde série de mesure est réalisée 8 h après la première application du produit. Pour les jours suivants, de J7 à J10, la PIE est mesurée avant l'application quotidienne de la lotion. De plus, une mesure de la PIE en peau saine est réalisée tous les jours, aussi bien du côté témoin que du côté traité. Toutes les mesures, qu'il s'agisse du TEWL ou du pH, sont réalisées dans une pièce à ambiance contrôlée : la température est de 25°C +/- 1°C et l'humidité relative de 30% +/- 5%. Les sujets disposent systématiquement de 15 minutes dans la pièce pour s'acclimater avant la mesure.
Le relevé de toutes les mesures est disponible en annexe 3.

7) Mesures du pH

Le suivi de la restauration de la barrière cutanée peut aussi s'effectuer par la mesure du pH cutané. Pour ce faire, on utilise le pH-mètre Hanna HI 83141 (Photo 8). Il s'agit d'un pH-mètre portatif robuste, facile d'utilisation, fiable et pratique. Un étalonnage de pH simple est réalisé manuellement au moyen de deux potentiomètres d'ajustement, l'un de pH 7, et l'autre de pH 4 ou 10. Les mesures de pH sont automatiquement compensées pour les variations de température et sont exactes à 0,01 près pour une gamme de température de 0 à 70°C. En effet, ce pH-mètre possède un capteur de température intégré dans le capteur pH.
Entre chaque série de mesure, la sonde doit être recouverte d'un bouchon contenant une solution de conservation, afin que la sonde ne sèche pas. Avant toute mesure, il faut rincer l'électrode à l'eau claire ou à l'eau distillée pour la débarrasser des sels de KCL. Il faut également vérifier l'absence de bulle d'air au niveau du bulbe en verre de la sonde et, le cas échéant, l'évacuer en secouant doucement l'électrode.

Photographie 8: Le pH-mètre HI 83141

Pour chaque site, une seule mesure est réalisée. Après avoir rincé la sonde, il faut la placer le plus perpendiculairement possible contre la zone à mesurer, en exerçant une pression modérée. A J6, le premier jour de mesure du pH, les mesures sont réalisées immédiatement après la réalisation des derniers strips. La lotion DouxocalmND mousse MO est ensuite appliquée. Une seconde série de mesure est réalisée 8 h après la première application du produit. Pour les jours suivants, de J7 à J10, le pH est mesuré avant l'application quotidienne de la lotion. De plus, une mesure du pH en peau saine est réalisée tous les jours. Le relevé de toutes les mesures de pH est disponible en annexe 4.

8) Analyse statistique

L'ensemble des graphiques ont été réalisé avec les logiciels R et/ou Excel. Pour tracer les graphiques avec le logiciel R, la réalisation d'une matrice ergonomique a été nécessaire. Chaque ligne de cette matrice comprend les informations suivantes : le nombre d'heures écoulées depuis la première application du produit, le chien concerné, le site et le côté sur lesquels la mesure a été effectuée, et la valeur de TEWL ou de pH correspondante, selon le graphique souhaité. Un extrait de la matrice réalisée pour le TEWL est disponible en annexe 5.

Pour réaliser l'analyse statistique proprement dite, il faut comparer les valeurs de PIE ou de pH à J6 aux valeurs obtenues lors des mesures suivantes, notamment à celles obtenues à la fin de l'expérience, à J10. Dans cette étude, on voudrait comparer des moyennes de séries appariées, avec un petit nombre d'échantillon.
Il existe deux tests statistiques pour comparer deux séries dépendantes à variable quantitative. Le premier d'entre eux est le test T de comparaison des moyennes sur séries appariées. Pour pouvoir l'utiliser, il faut que les données soient réparties selon une loi normale. Le deuxième est le test paramétrique des rangs signés de Wilcoxon, qui peut être en théorie utilisé lorsque les données ne suivent pas une loi normale, ou lorsque les effectifs sont faibles. Mais dans le cas de notre étude, on obtient pour chaque série de mesures 5 moyennes du côté traité à comparer à 5 moyennes du côté témoin. Or, avec un si faible effectif, même dans la meilleure configuration, c'est-à-dire dans le cas où toutes les mesures d'un groupe sont supérieures à celle de l'autre, la p-value ne peut être inférieure à 5%, limite retenue pour considérer un test comme significatif. Ainsi, il n'est pas possible d'avoir une différence significative avec un si petit effectif en utilisant un test de Wilcoxon et il n'existe pas de test plus puissant si l'on ne peut supposer la distribution des différences normales, ce qui est difficile à observer sur cinq valeurs. Il ne présente donc pas d'intérêt de réaliser ce test dans le cas de notre étude.
Par acquis de conscience, nous tracerons tout de même les graphiques de distributions des valeurs pour voir si l'on peut se rapprocher d'une distribution normale et, le cas échéant, nous utiliserons le test T. Dans le cas contraire, nous accorderons crédit uniquement aux statistiques descriptives, représentées par les divers graphiques réalisés.

B) Résultats

1) La perte insensible en eau

a) Etude graphique

Pour chaque chien, un graphique représentant la perte insensible en eau relevée pour chaque site en fonction du temps est réalisé (Fig 15). Sur ces graphiques, on ajoute également les courbes moyennes de PIE obtenues pour chaque chien en fonction du temps, qui sont celles

sur lesquelles l'analyse descriptive sera basée. A première vue, les courbes sont extrêmement semblables, surtout au-delà de 24h après la première application du produit. Pendant les 24 premières heures, la courbe de la moyenne des sites témoins décroit de manière plus importante que celle des sites traités pour les chiens 1, 2 et 4. Pour le chien 3, elle décroit plus rapidement jusqu'à 8 h, puis plus lentement jusqu'à 24 h. Pour le chien 5, c'est la courbe de la moyenne des sites traités qui décroît le plus rapidement sur cette période.

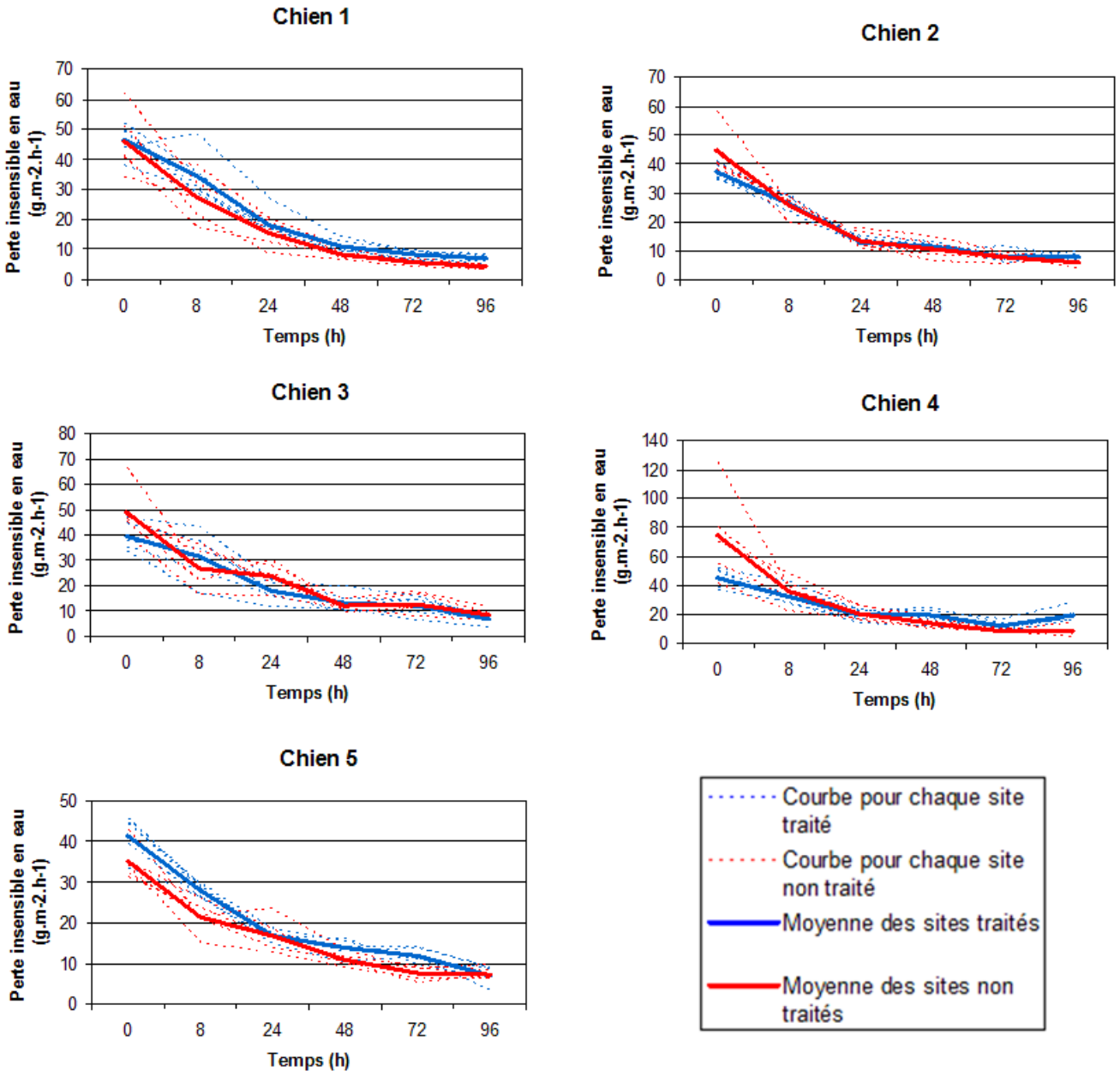


Figure 15 : Evolution de la PIE en fonction du temps chez les 5 chiens

Une moyenne des valeurs de la PIE sur les cinq chiens est calculée pour chaque temps, du côté traité et du côté témoin. Le graphique représentant l'évolution de ces valeurs (Fig 16) montre des décroissances très semblables des deux courbes tout au long de l'expérience, peut-être un peu plus marquée pour le côté témoin les 8 premières heures. Les courbes de régression linéaire correspondant aux deux côtés ont également été tracées sur ce graphique.

On voit que la droite correspondant à la régression linéaire du côté traité a une pente un peu moins importante que la celle du côté témoin. Or plus la pente est importante, plus la récupération se fait rapidement.
L'ensemble de ces observations tend à montrer qu'il n'y a pas de différence entre les deux côtés.

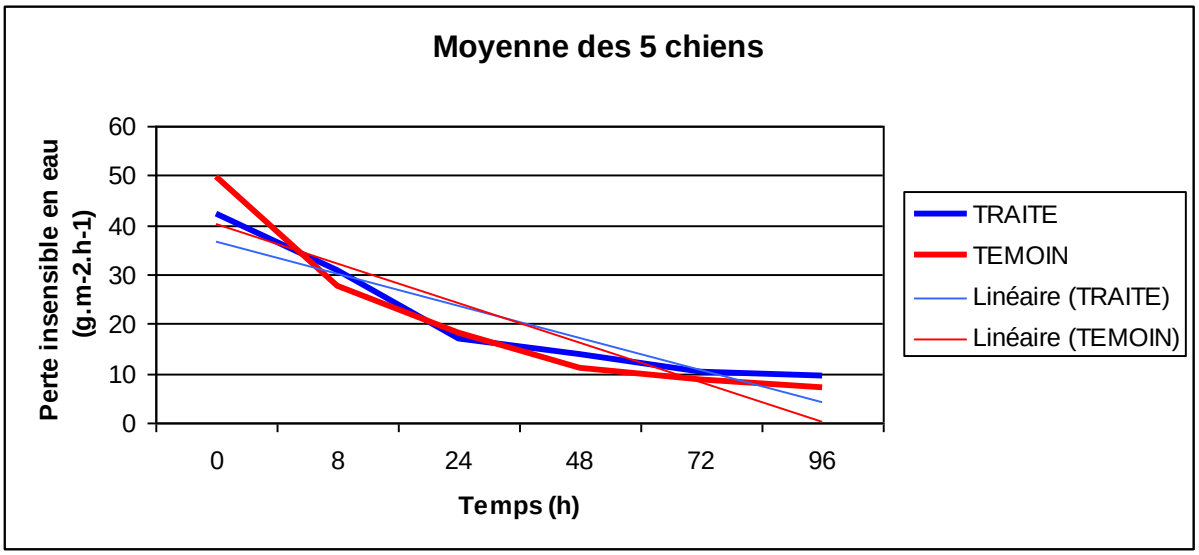


Figure 16 : Evolution de la moyenne de la PIE en fonction du temps

Cependant, on remarque que la valeur des basales varie de manière quotidienne, parfois de manière très importante (cf. annexe 3), ce qui pourrait fausser les pentes des courbes précédentes. On a donc réalisé des graphiques à partir des valeurs de PIE mesurées, que l'on a divisés par la valeur du TEWL basal obtenue quotidiennement du côté correspondant, afin de lisser ce paramètre. Sur les courbes obtenues (Fig 17), on remarque que l'évolution est très similaire à celle des graphiques précédents. Les courbes sont quasiment confondues pour les chiens 1 et 2. Pour le chien 3 c'est d'abord le côté non traité qui décroit le plus vite, puis le côté traité. Pour le chien 4, le côté témoin a une pente plus importante sur les 8 premières heures, tandis que chez le chien 5, c'est le côté traité qui a la pente la plus forte sur les 24 premières heures. Au-delà de 24h, les courbes sont quasiment confondues chez tous les sujets.

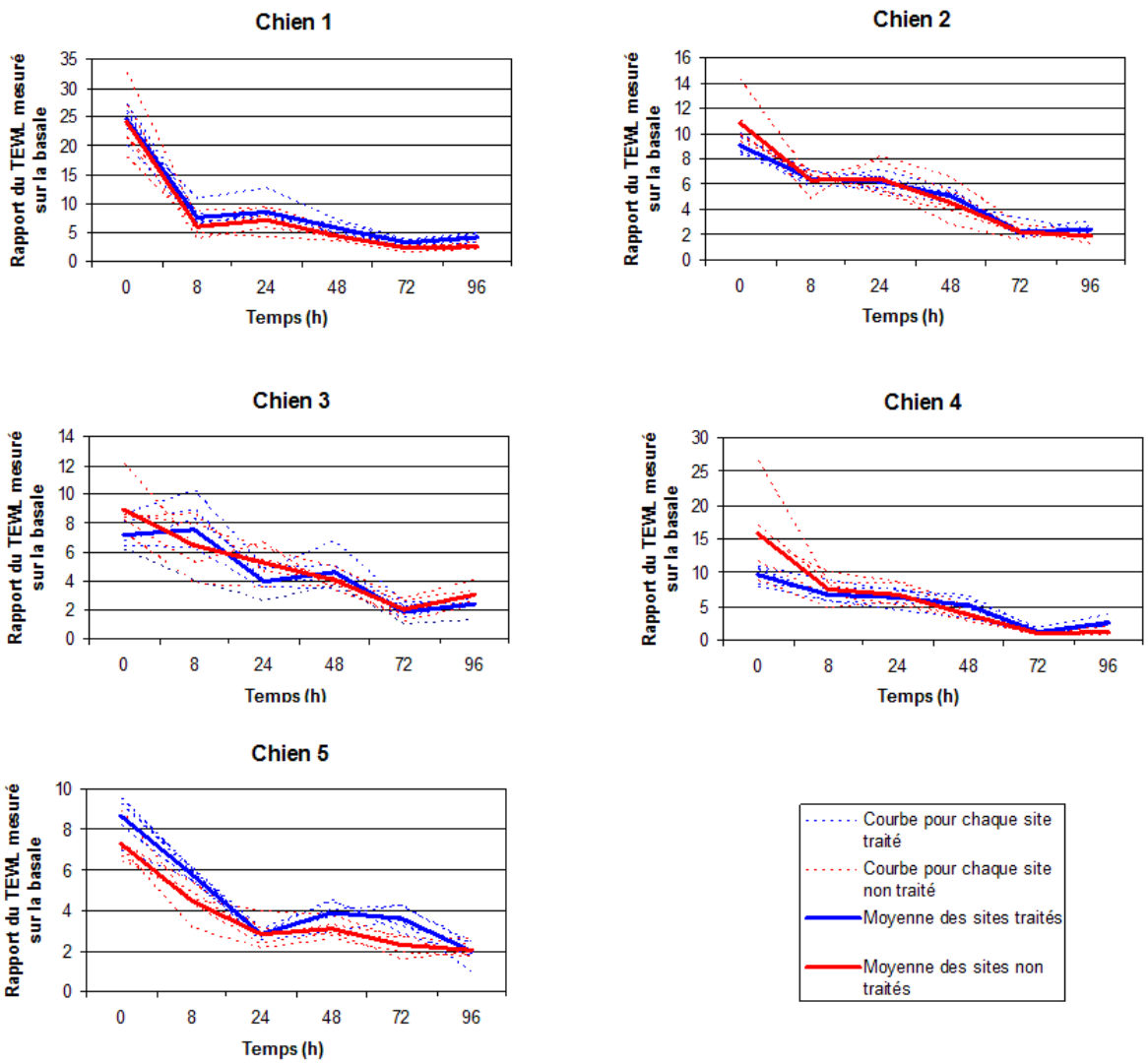


Figure 17 : Evolution du rapport de la PIE mesurée sur la basale en fonction du temps chez les 5 chiens

Le tracé des courbes correspondant à la moyenne des 5 chiens est réalisé (Fig 18). Les courbes des deux côtés sont ici encore très similaires. Les courbes de régression linéaires obtenues pour les deux côtés montrent une fois encore une pente plus importante pour le côté témoin.

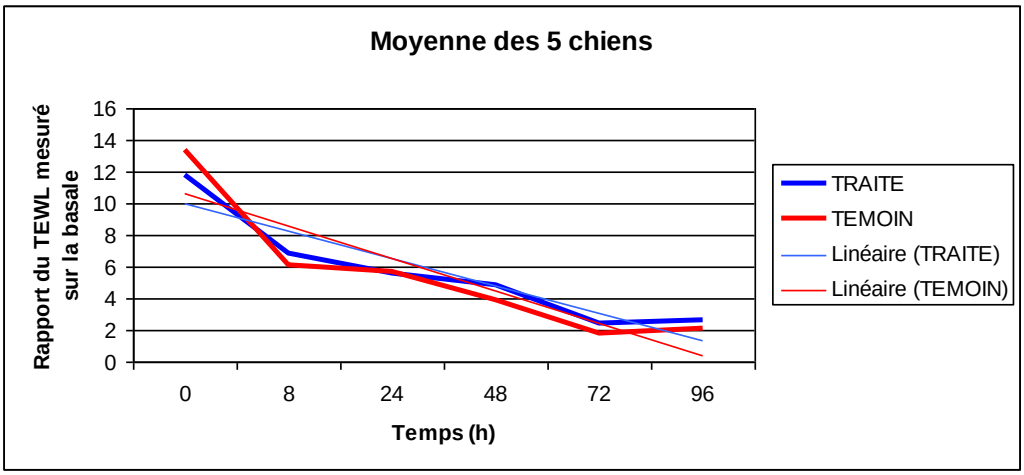


Figure 18 : Evolution de la moyenne du rapport de la PIE mesurée sur la basale en fonction du temps

Enfin, on s'intéresse au pourcentage de réparation de la peau. Ce dernier est calculé à partir des valeurs de PIE mesurées et à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ de réparation de la peau} = \left(1 - \frac{\text{PIE à un instant donné-PIE basale}}{\text{PIE à T0- PIE basale}}\right) * 100$$

On remarque que, ici encore les courbes sont très semblables (Fig 19). Cela laisse supposer que le produit ne favorise pas particulièrement une récupération de la fonction barrière.

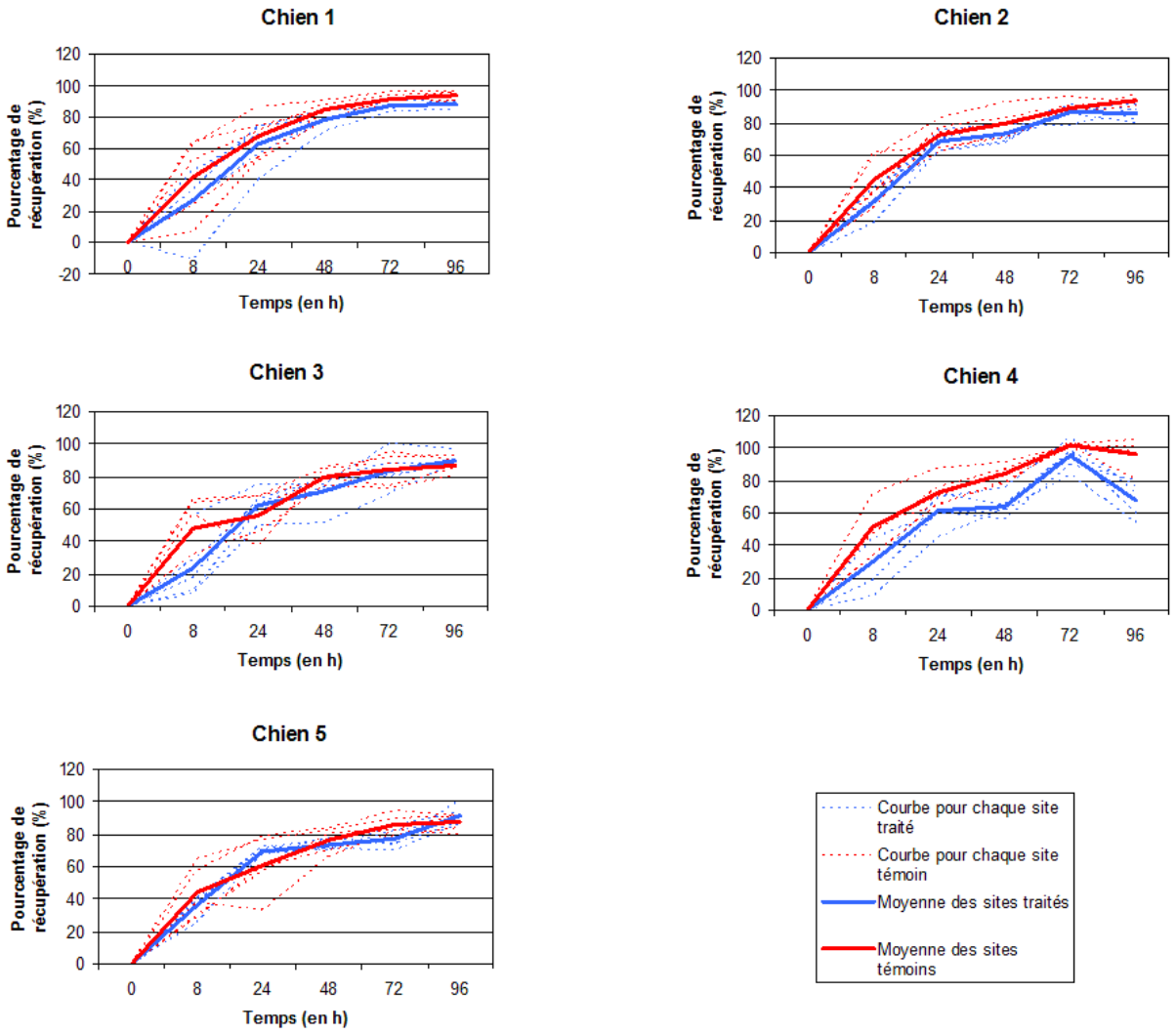


Figure 19 : Evolution du pourcentage de récupération en fonction du temps chez les 5 chiens

On trace ensuite la moyenne du pourcentage de récupération obtenue pour les 5 chiens des deux côtés (Fig 20). On remarque qu'une valeur donnée est quasiment atteinte de manière systématique plus précocement du côté traité.
En revanche, les courbes de régression linéaire obtenues sont parallèles, leur pente est donc exactement la même, ce qui laisse supposer que la vitesse de récupération est la même dans les deux cas.

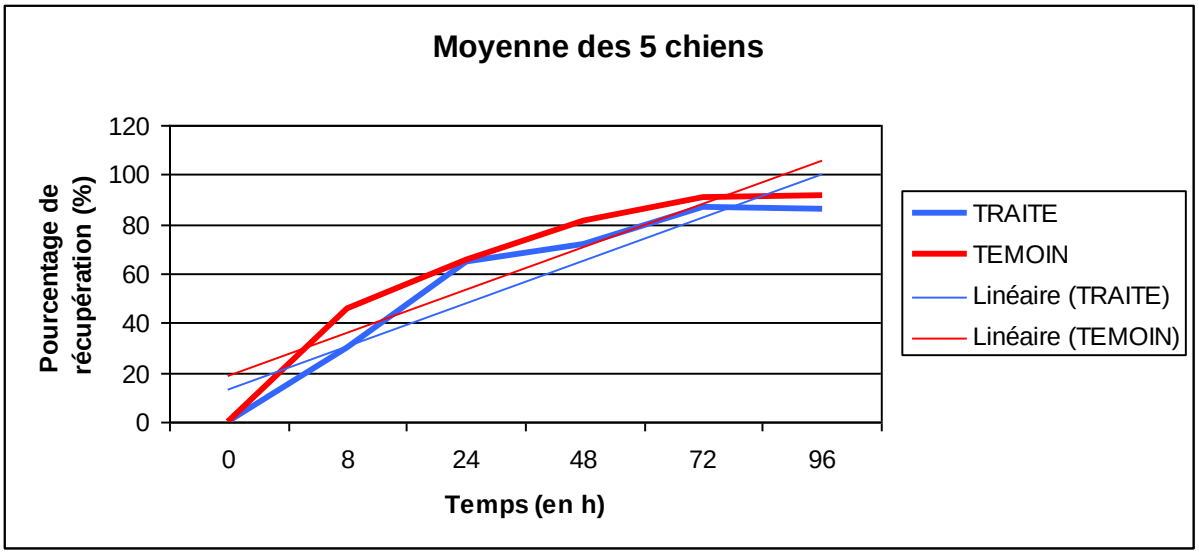


Figure 20 : Evolution de la moyenne du pourcentage de récupération en fonction du temps

Ainsi, à l'issue de l'étude graphique des valeurs obtenues de la perte insensible en eau, il semblerait que la lotion DouxocalmND ne favorise pas la réparation de la barrière. En effet, les courbes obtenues sont toujours très semblables.

b) Etude statistique

On souhaite comparer les différences entre les valeurs de PIE à T0 et les valeurs au bout de 96h, c'est-à-dire à la fin de l'étude. On commence par réaliser un graphique qui permet de visualiser la répartition des différentes valeurs (Fig 21), afin de voir si les données suivent ou non une loi normale, et choisir un test statistique adapté selon le résultat.

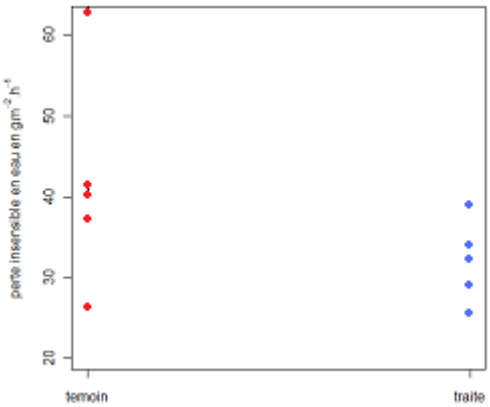


Figure 21: Répartition des valeurs moyennes de PIE mesurées chez les 5 chiens

Dans la même optique, nous avons réalisé un graphique de type box (Fig 22) qui permet de la même manière que le graphique précédent de visualiser les différences des valeurs de la PIE du côté traité et du côté témoin sur l'ensemble de l'étude. On observe que la médiane de la différence de la PIE pour les sites traités est de 33 $g.m^{-2}.h^{-1}$ alors qu'elle est de 40,5 $g.m^{-2}.h^{-1}$ pour les sites témoins.

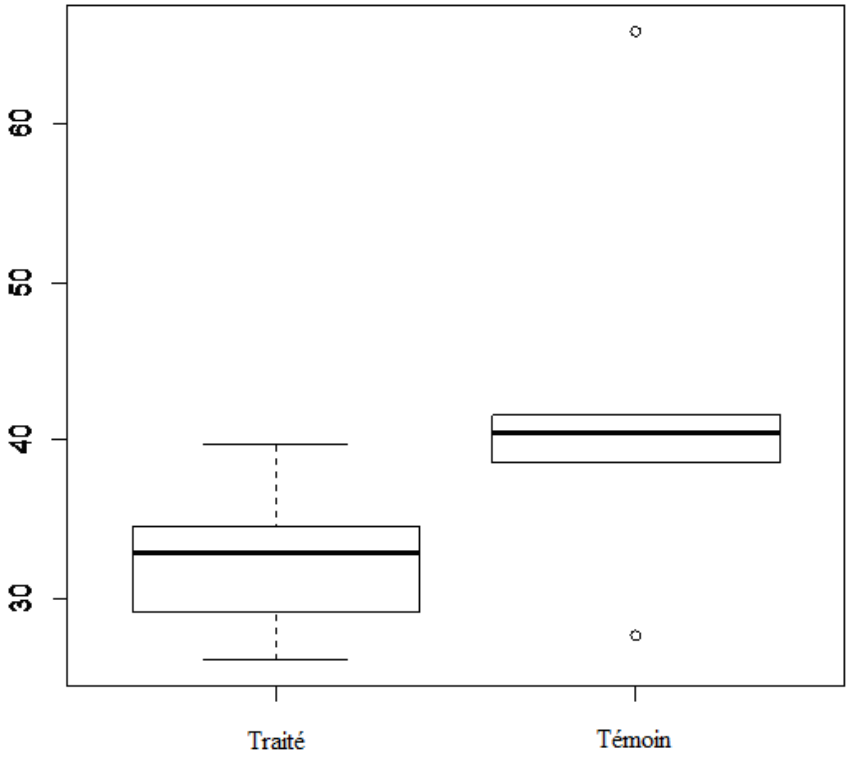


Figure 22: Diagramme en boîte de la répartition des valeurs moyennes de PIE mesurées chez les 5 chiens

On a de petits effectifs et la distribution ne suit pas une loi normale: on devrait donc utiliser le test non paramétrique bilatéral des rangs signés de Wilcoxon de comparaison de deux moyennes observées sur deux séries appariées, mais celui-ci n'est pas assez puissant pour nos effectifs. L'analyse statistique ne sera donc pas interprétable, c'est pourquoi il est inutile de calculer la p-value.

2) Le pH

a) Etude graphique

Pour chaque chien, un graphique représentant la moyenne du pH du côté traité et du côté témoin en fonction du temps est réalisé (Fig 23). Sur ces graphiques, on ajoute également les régressions linéaires obtenues pour chacun des côtés étudiés.
On remarque qu'au-delà de 24h, la courbe de la moyenne des sites traités est toujours plus basse que celle de la moyenne des sites témoins, sauf chez le chien 4. Quand on compare les courbes de régression linéaire, on s'aperçoit que chez les cinq chiens, la pente de la droite représentant les sites traités est toujours inférieure à celle de la pente des sites témoins. Or, plus la pente est faible, moins les valeurs de pH atteintes sont basiques, et un pH acide favorise la réparation de la barrière cutanée.

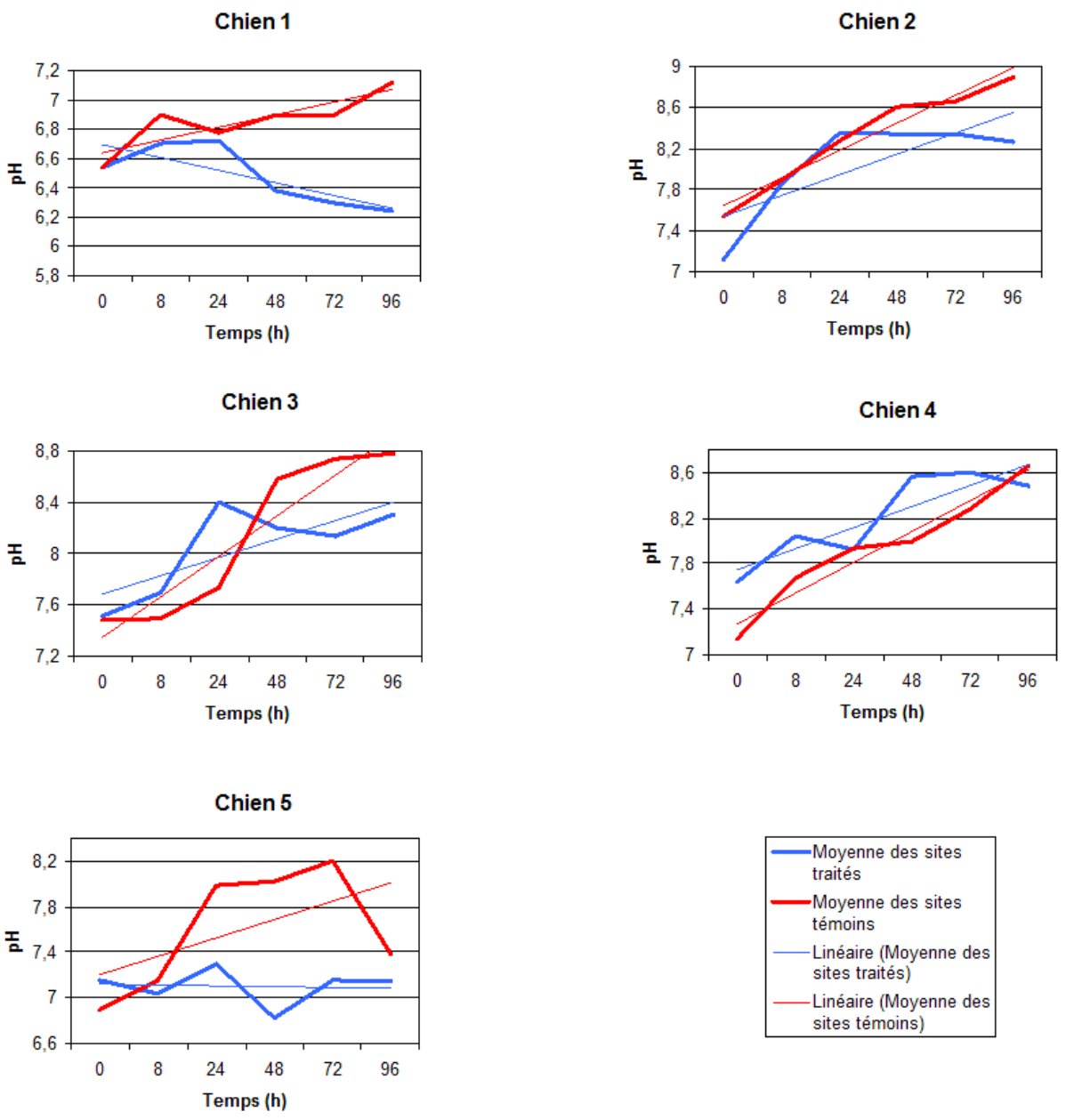


Figure 23 : Evolution du pH en fonction du temps chez les 5 chiens

Une moyenne des valeurs de pH sur les cinq chiens est calculée pour chaque temps, du côté traité et du côté témoin. Le graphique représentant l'évolution de ces valeurs (Fig 24) montre des courbes semblables les 24 premières heures. Puis les valeurs de pH continuent d'augmenter du côté témoin tandis qu'elles stagnent pour le côté traité. Les courbes de régression linéaire correspondant aux deux côtés ont également été tracées sur ce graphique. On voit que la droite correspondant à la régression linéaire du côté témoin a une pente beaucoup plus marquée que celle du côté traité. Enfin on a représenté sur ce graphique la valeur moyenne de la basale pour les cinq chiens. Juste après la fin du stripping, les deux côtés présentent des valeurs de pH plus basses que la valeur basale. Pendant les 24 premières heures, ces valeurs remontent jusqu'à cette basale. Puis, les valeurs du côté traité stagnent autour de la basale, voire se situent en dessous, tandis que l'on a des valeurs beaucoup plus basiques pour le côté témoin.

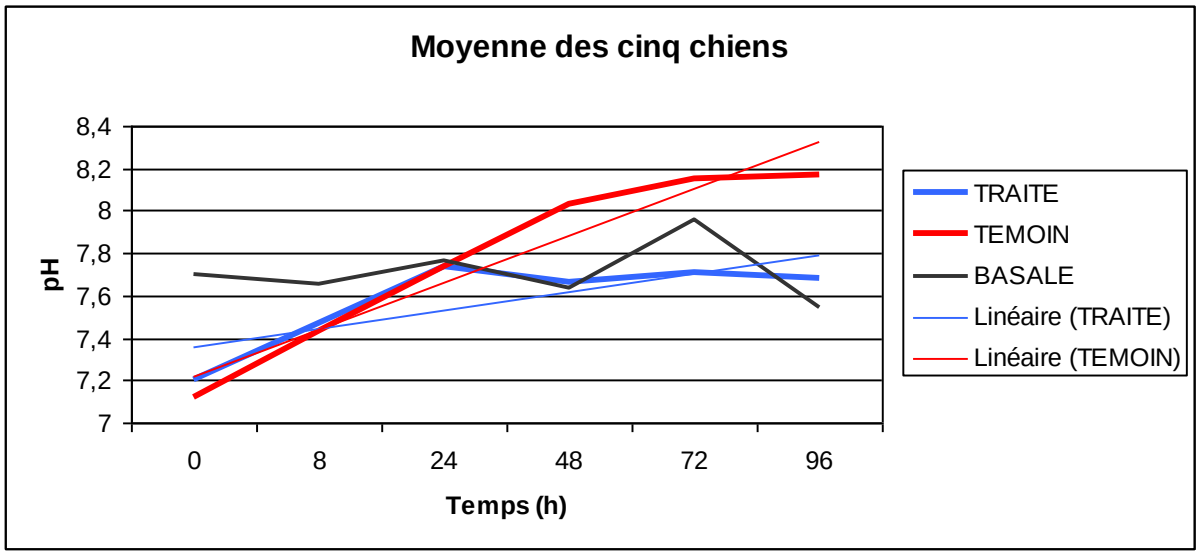


Figure 24 : Evolution de la moyenne du pH en fonction du temps

L'ensemble de ces observations laisse penser qu'on a une différence significative en faveur du côté traité. Il semblerait que l'application du produit favorise un maintien du pH acide ou proche de la normale, défavorable au développement des bactéries mais favorable à la régénération de la barrière cutanée.

b) Etude statistique

On souhaite comparer les différences entre les valeurs de pH à T0 et les valeurs au bout de 96h, c'est-à-dire à la fin de l'étude. On commence par réaliser un graphique qui permet de visualiser la répartition des différentes valeurs (Fig 25), afin de voir si les données suivent ou non une loi normale, et choisir un test statistique adapté selon le résultat.

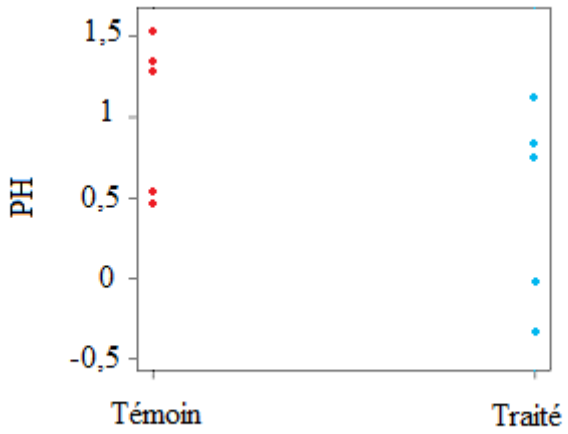


Figure 25: Répartition des valeurs moyennes de pH mesurées chez les 5 chiens

Dans la même optique, nous avons réalisé un graphique de type box (Fig 26) qui permet de la même manière que le graphique précédent de visualiser les différences des valeurs de pH du côté traité et du côté témoin sur l'ensemble de l'étude. On observe que la médiane de la différence de la PIE pour les sites traités est de 0,77 alors qu'elle est de 1,31 pour les sites témoins.

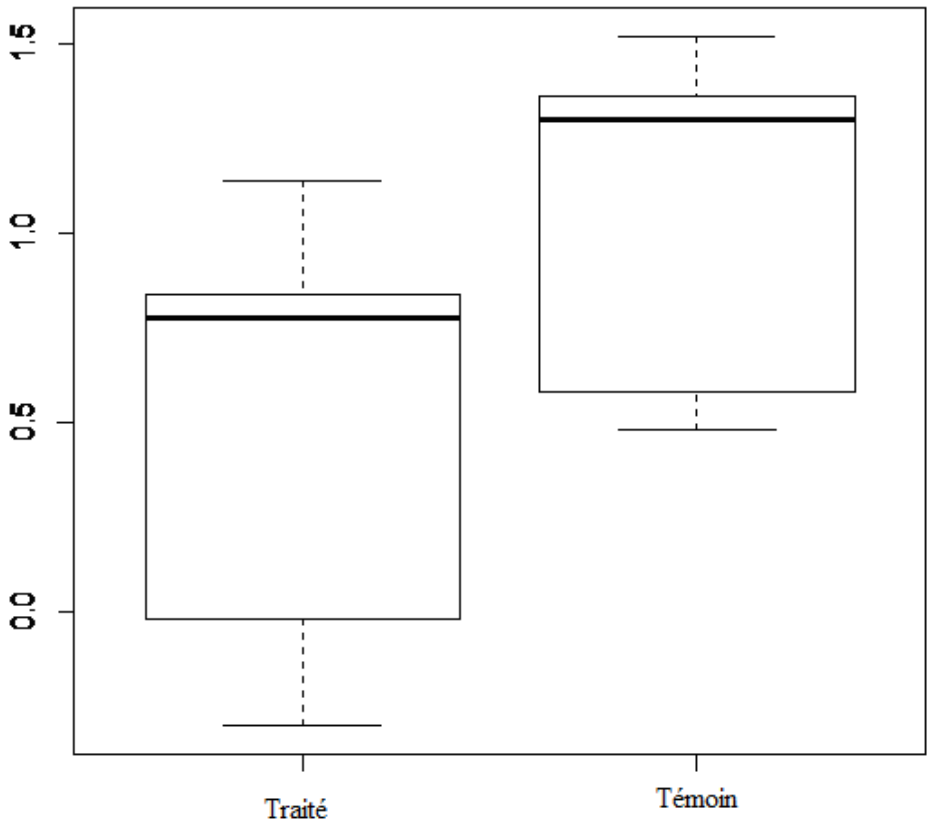


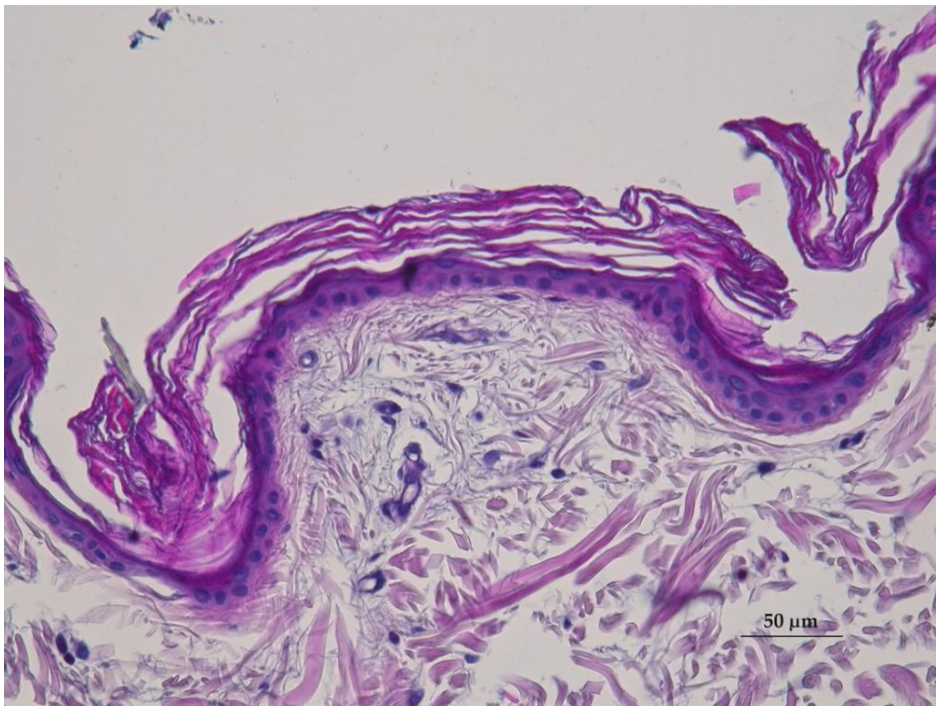
Figure 26: Diagramme en boîte de la répartition des valeurs moyennes de pH mesurées chez les 5 chiens

On a de petits effectifs et la distribution ne suit pas une loi normale: on devrait donc utiliser le test non paramétrique bilatéral des rangs signés de Wilcoxon de comparaison de deux moyennes observées sur deux séries appariées, mais celui-ci n'est pas assez puissant pour nos effectifs. L'analyse statistique ne sera donc pas interprétable, c'est pourquoi il est inutile de calculer la p-value.

3) Histologie

L'aspect des biopsies des cinq chiens est similaire à tous les stades. Les photographies sélectionnées pour illustrer cette partie constituent un échantillon très représentatif de ce qui est observable chez les cinq animaux.

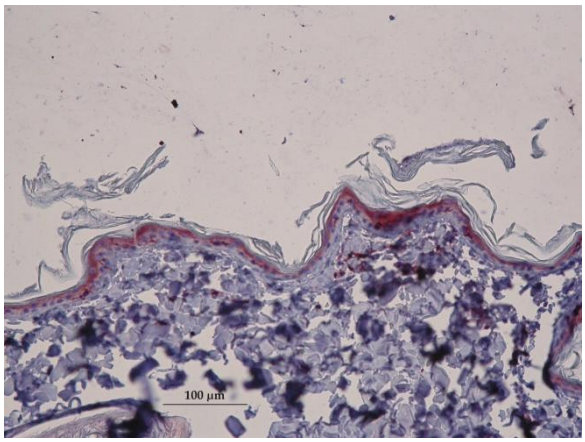
a) Biopsies en peau saine, avant « tape-stripping »



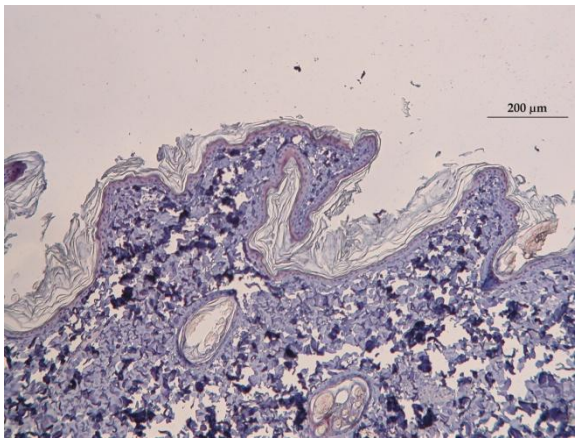
Photographie 9 : Peau saine avant « tape-stripping », x 200, HE

La peau est ici d'un aspect tout à fait normal (Photo 9). L'épiderme compte 2 à 3 couches cellulaires, son épaisseur est donc correcte. La couche cornée est bien visible et présente un aspect normal, avec une couche cornée compacte fine, le *stratum compactum*, bien distincte de la couche cornée exfoliante et aérée, le *stratum disjunctum*. Le derme est silencieux, il est lui aussi d'aspect normal.

Quand on utilise les colorations immunohistochimiques, il n'y a pas d'infiltrat cellulaire dans le derme (Photo 10). La coloration de Luna n'a mis en évidence de polynucléaires éosinophiles dans aucune des biopsies, quel que soit le chien et quel que soit le moment du prélèvement.



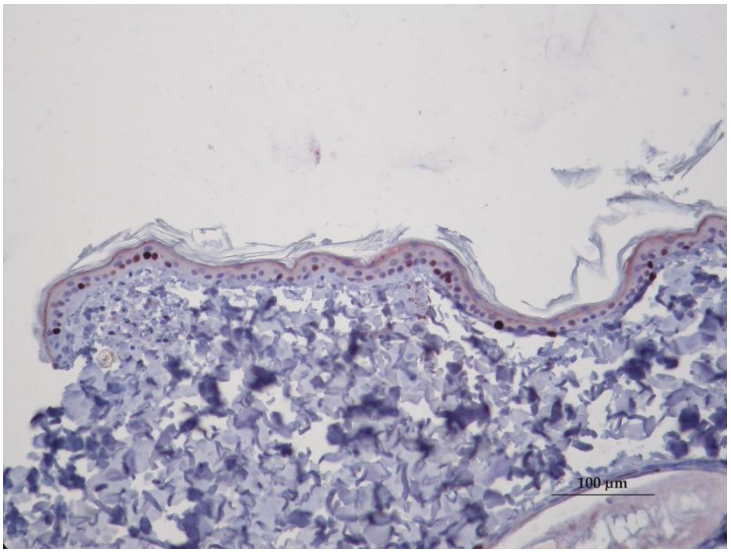
x 200, BLA36



x 200, CD3

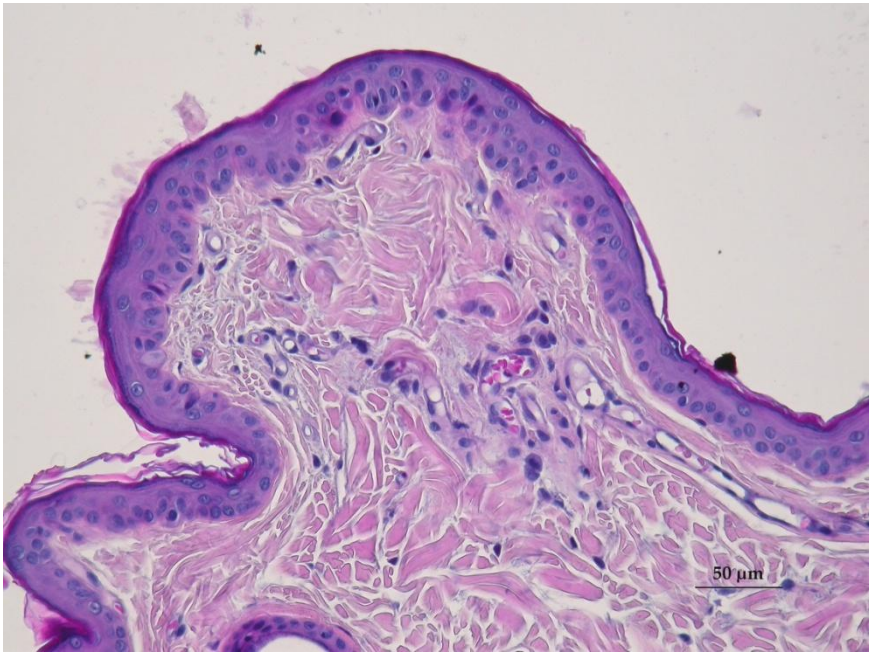
Photographie 10 : Peau saine avant « tape-stripping »

Enfin, l'index mitotique de la couche basale de l'épiderme est faible lorsque la peau est saine, de 12% en moyenne (Photo 11).



Photographie 11 : Peau saine avant « tape-stripping », x 200, Ki67

b) Biospses réalisées après une semaine de « tape-stripping » et avant application du DouxocalmND mousse MO.

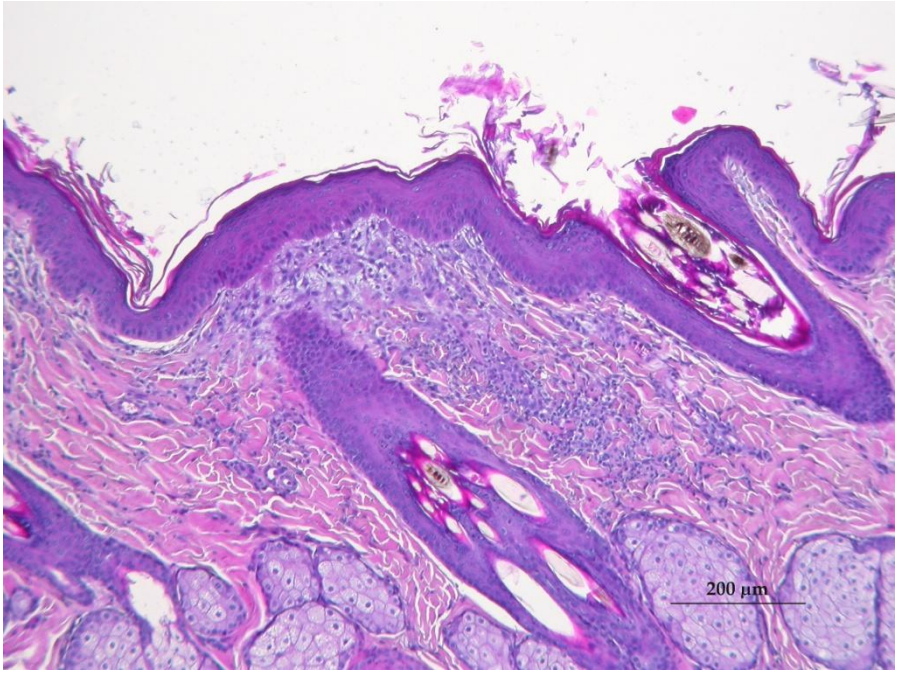


Photographie 12 : Peau à J6, x 300, HE

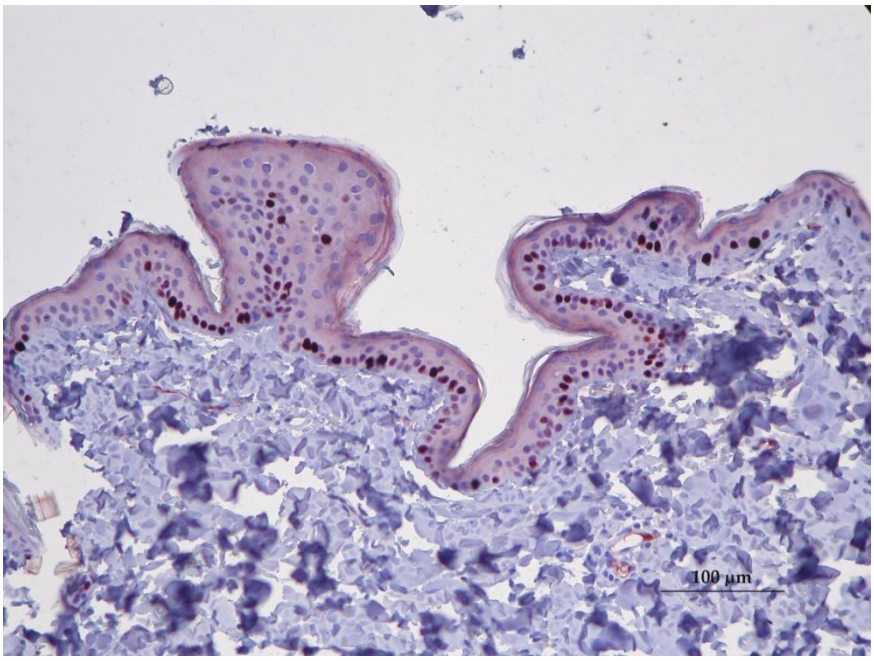
L'aspect de l'épiderme est anormal (Photos 12 et 13). La couche cornée est absente, remplacée à quelques endroits par une fine couche de kératine compacte. On a une acanthose marquée, avec un nombre de couches cellulaires variant de 6 à 12. La spongiose, c'est–à-dire la distension oedémateuse des espaces intercellulaires, réalisant parfois de petites vésicules, est faible à modérée. On ne visualise pas d'exocytose. On a un bourgeonnement épidermique à l'origine des crêtes épidermiques qui donne un aspect ondulé à la membrane basale. Les

kératinocytes des couches basale et suprabasales ont un aspect de cellules basales ; en effet on trouve des cellules de petite taille, arrondies, au noyau central et au cytoplasme peu étendu. Le rapport nucléo-cytoplasmique est fort, ce qui traduit le caractère prolifératif de l'épiderme. Cela est confirmé par le marquage du Ki67, avec un indice à 35% en moyenne (Photo 14). La couche granuleuse est d'épaisseur normale à augmentée.

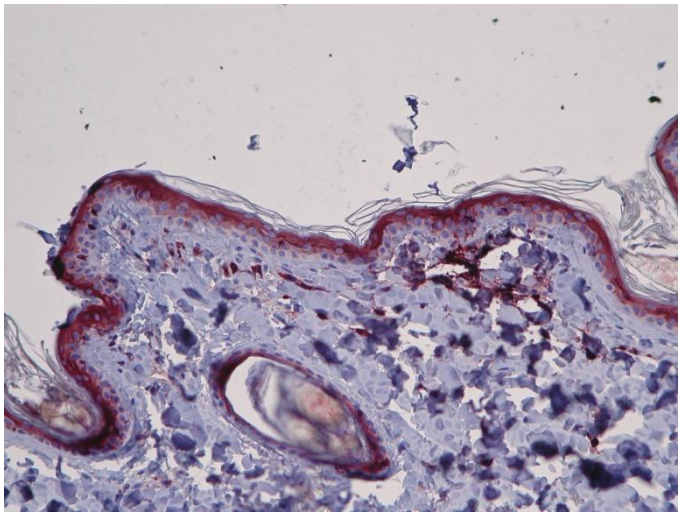
Concernant l'aspect du derme, il est également anormal (Photos 12 et 13). On observe un œdème et une congestion. De plus, un infiltrat inflammatoire, d'intensité moyenne à importante est réparti de manière périvasculaire à diffuse. On trouve, essentiellement, des mastocytes, des lymphocytes et des histiocytes (Photos 15, 16 et 17).



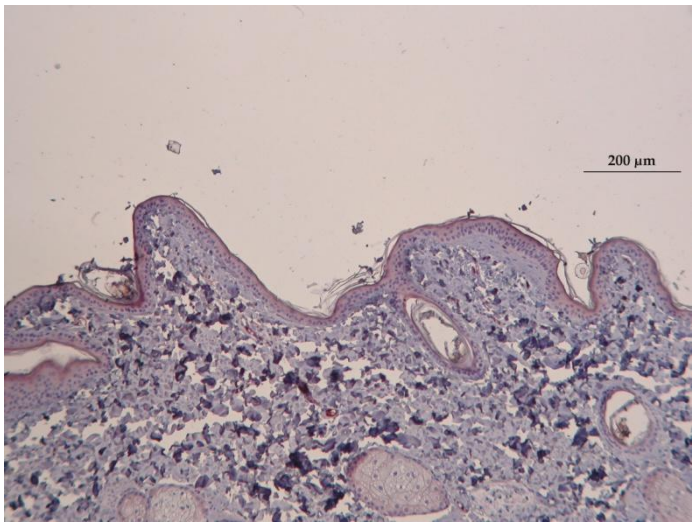
Photographie 13 : Vue d'ensemble de la peau à J0, x 100, HE



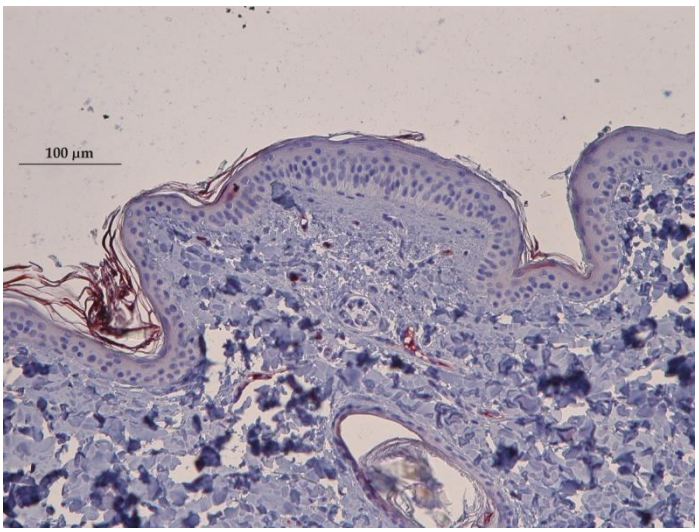
Photographie 14 : Peau à J0, x 200, Ki67



Photographie 15 : Peau à J0, x 200, BLA36



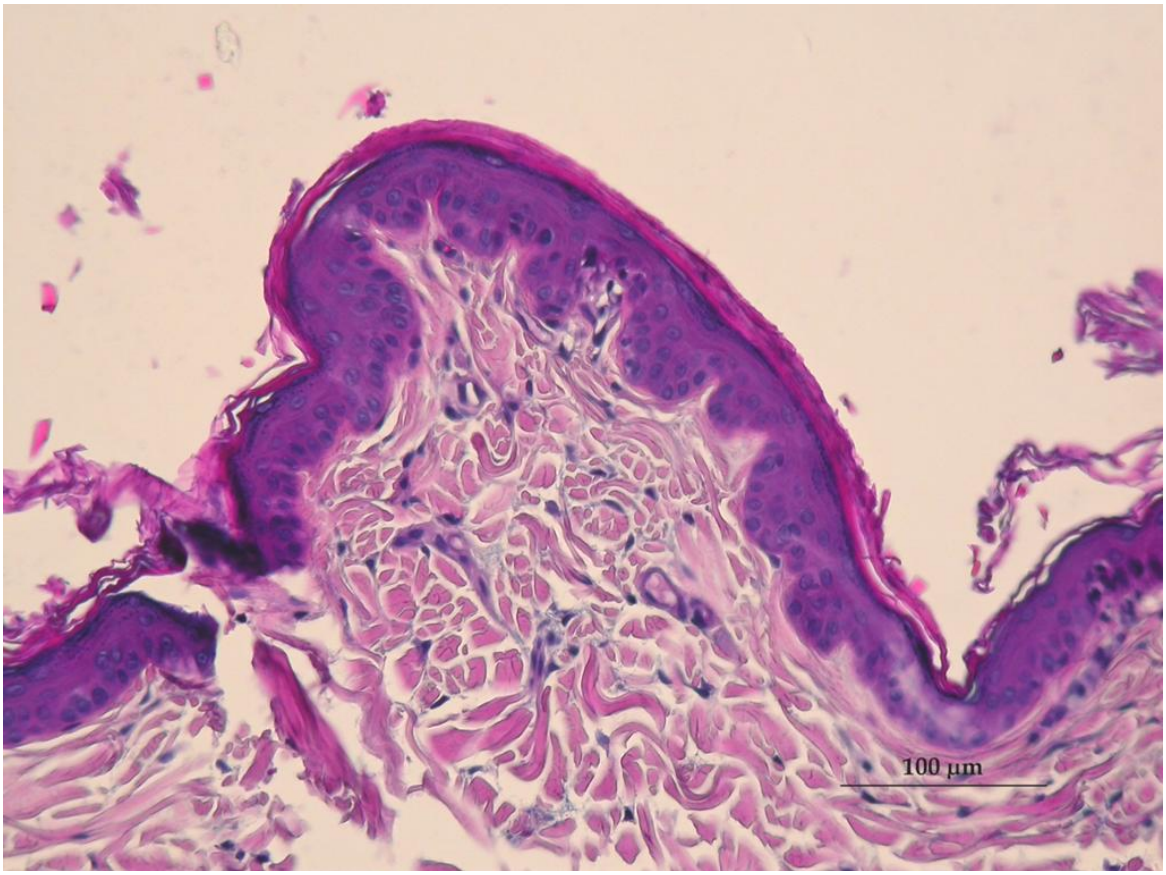
Photographie 16 : Peau à J0, x 100, CD3



Photographie 17 : Peau à J0, x 200, Mac 387

c) Après 3 jours d'application quotidienne de DouxocalmND mousse MO

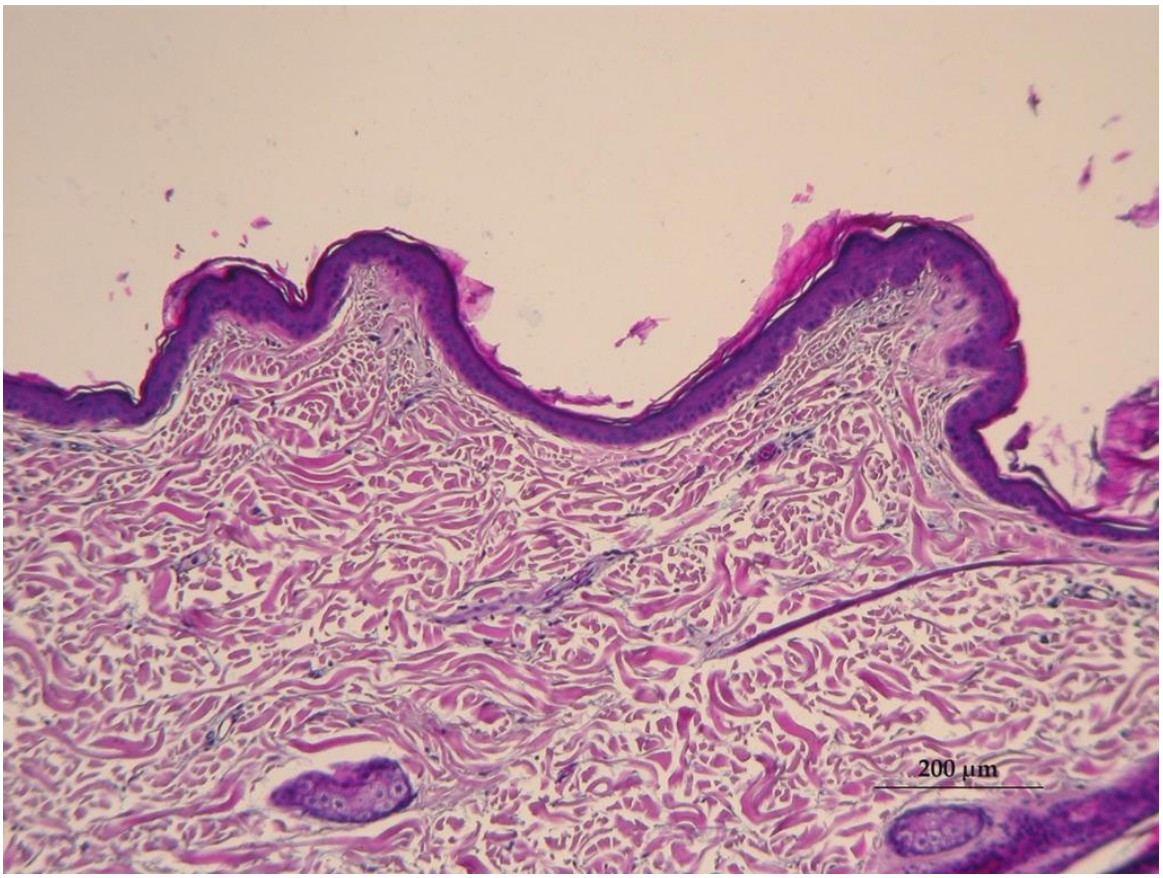
i) Sites témoins



Photographie 18 : Peau du côté témoin à J8, x 250, HE

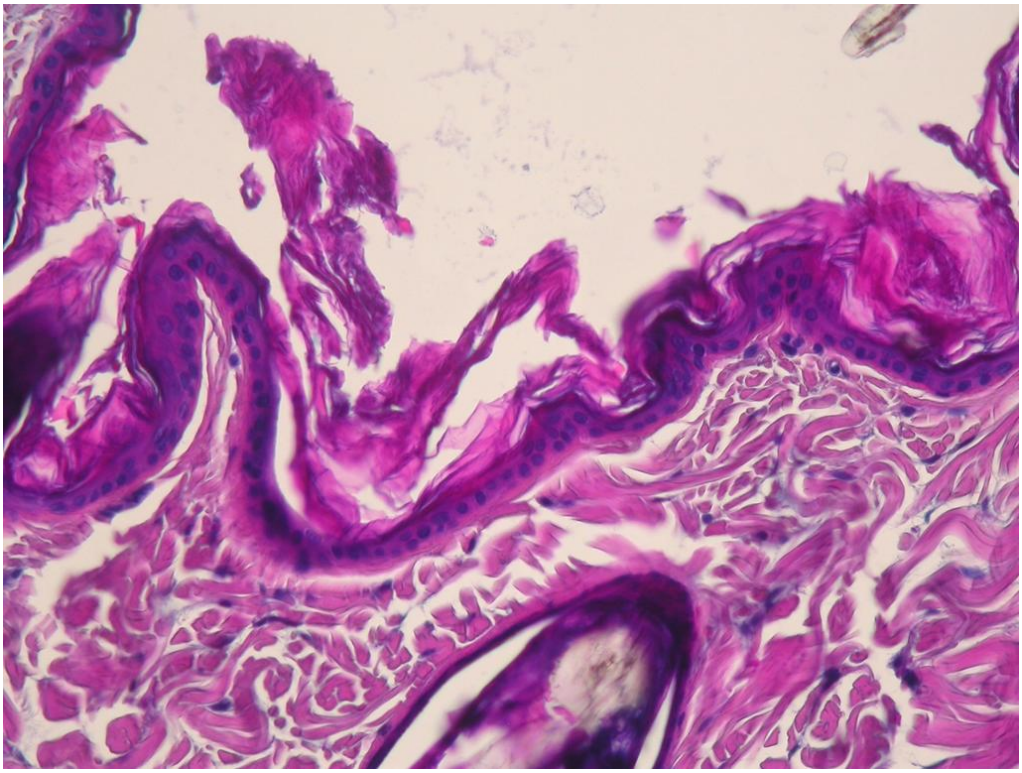
L'épiderme conserve un aspect anormal (Photos 18 et 19). On note toutefois la réapparition de la couche cornée, mais avec une kératine très compacte et d'aspect anormal. On a une persistance de l'acanthose, même si le nombre de couches cellulaires est un peu plus faible et oscille entre 5 et 7. La spongiose a complètement disparu. On a persistance du bourgeonnement épidermique et de l'aspect ondulé de la membrane basale. On observe quelques kératinocytes apoptotiques au sein des couches basales, ce qui traduit une régulation de l'hyperplasie et un retour à l'homéostasie.

Concernant le derme (Photos 18 et 19), on a une diminution de la congestion et de l'œdème. L'infiltrat cellulaire est d'intensité faible à modérée et à disposition périvasculaire (Photo 22, à gauche). L'index de prolifération est évalué à 37% en moyenne.



Photographie 19 : Vue d'ensemble de la peau du côté témoin à J8, x 100, HE

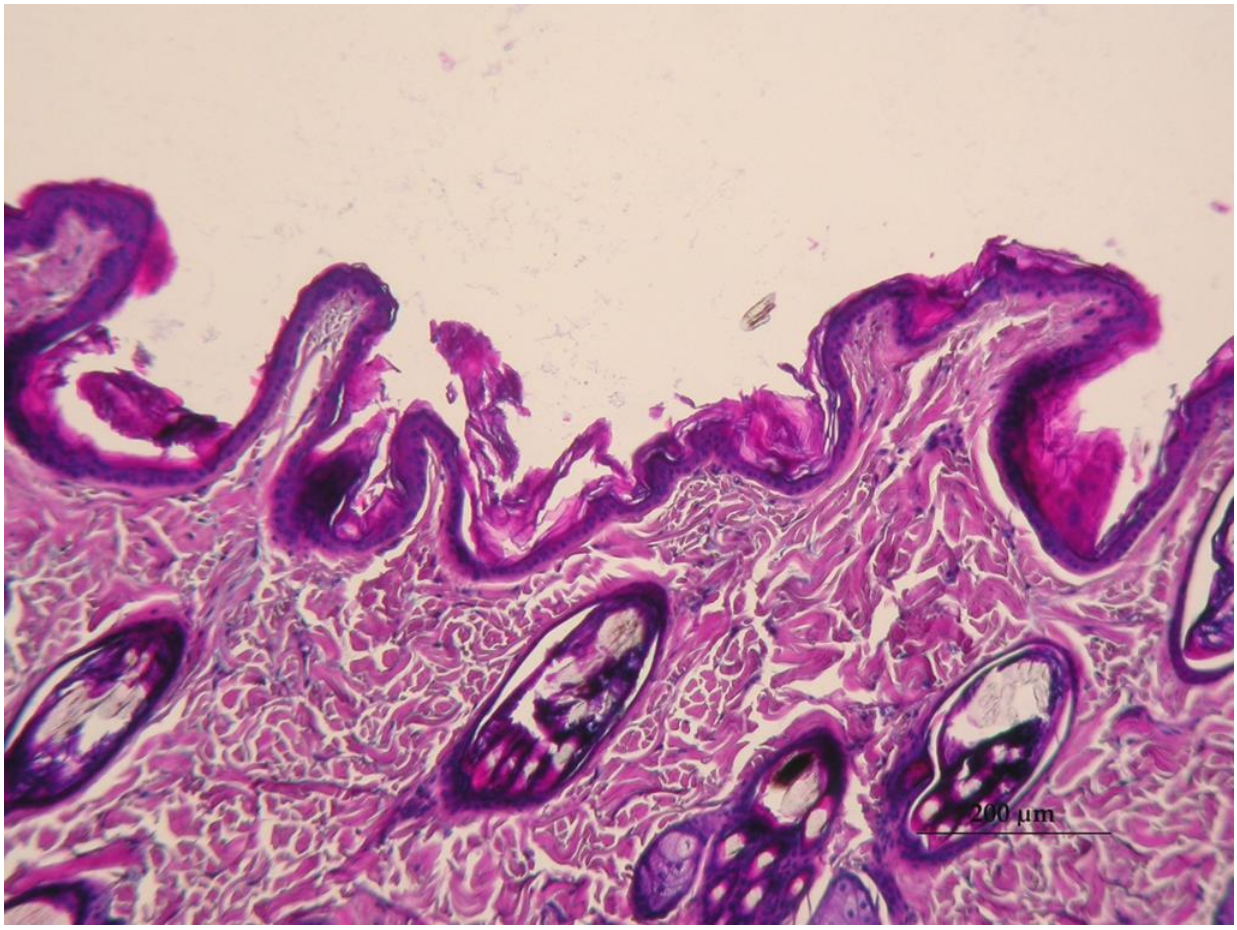
ii) Sites traités



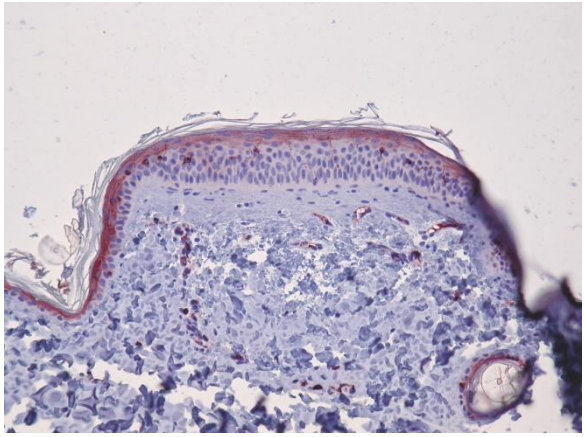
Photographie 20 : Peau du côté traité à J8, x 250, HE

On a la réapparition d'une couche cornée plus proche de la normale avec une couche compacte mince surmontée d'une couche aérée nette sur la majorité des biopsies (Photos 20 et 21). L'épaisseur de l'épiderme est très proche de la normale avec 3 à 5 couches cellulaires. On a disparition de la spongiose. Le bourgeonnement épidermique a nettement diminué avec une membrane basale qui paraît plus rectiligne et horizontale. Les kératinocytes de la couche basale ont récupéré un aspect proche de la normale (cellules plus hautes que larges), et on ne visualise pas d'image d'apoptose de ces kératinocytes.

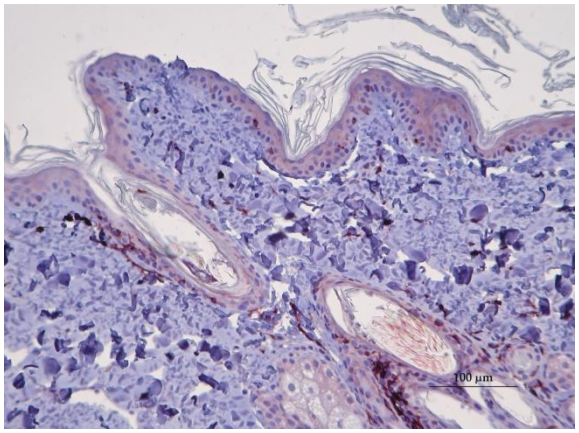
Concernant le derme (Photos 20 et 21), on a une quasi-disparition de la congestion et de l'œdème. On note également une très nette diminution de l'intensité de l'infiltrat (nulle à faible), avec une disposition périvasculaire (Photo 22, à droite). L'index de prolifération est évalué à 30% en moyenne.



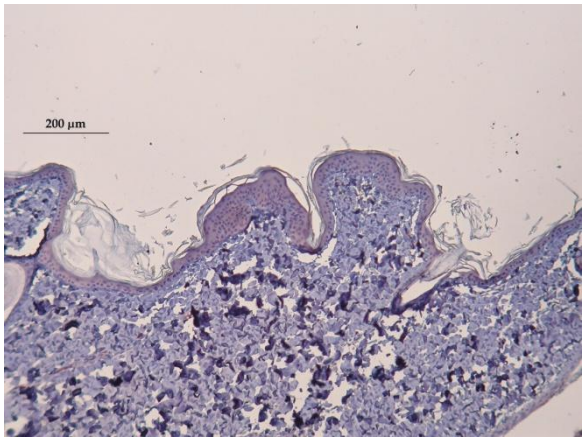
Photographie 21 : Vue d'ensemble de la peau du côté traité à J8, x 100, HE



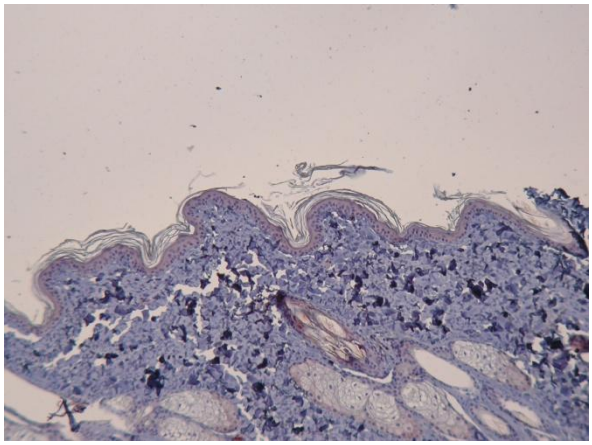
Témoin,x 200, BLA36



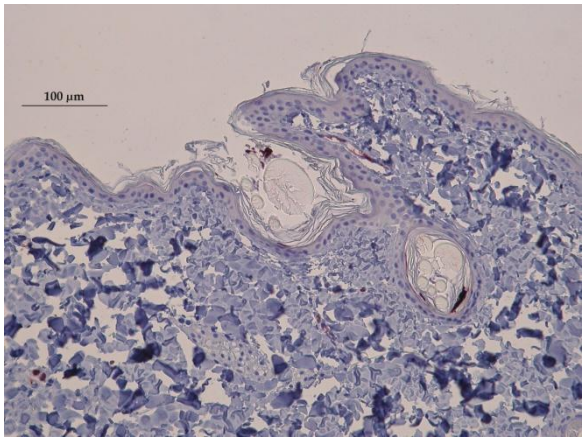
Traité,x 200, BLA36



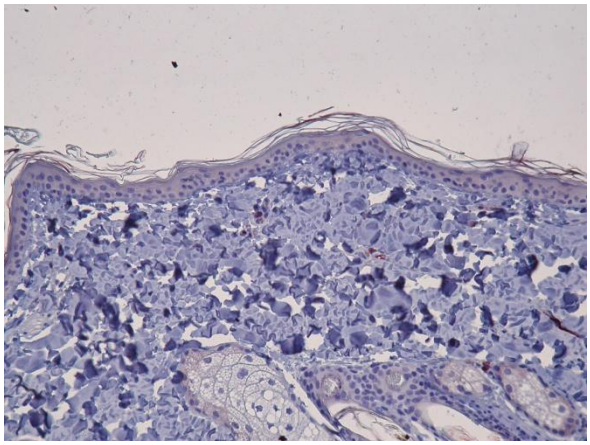
Témoin,x 100, CD3



Traité,x 100, CD3



Témoin,x 200, Mac 387

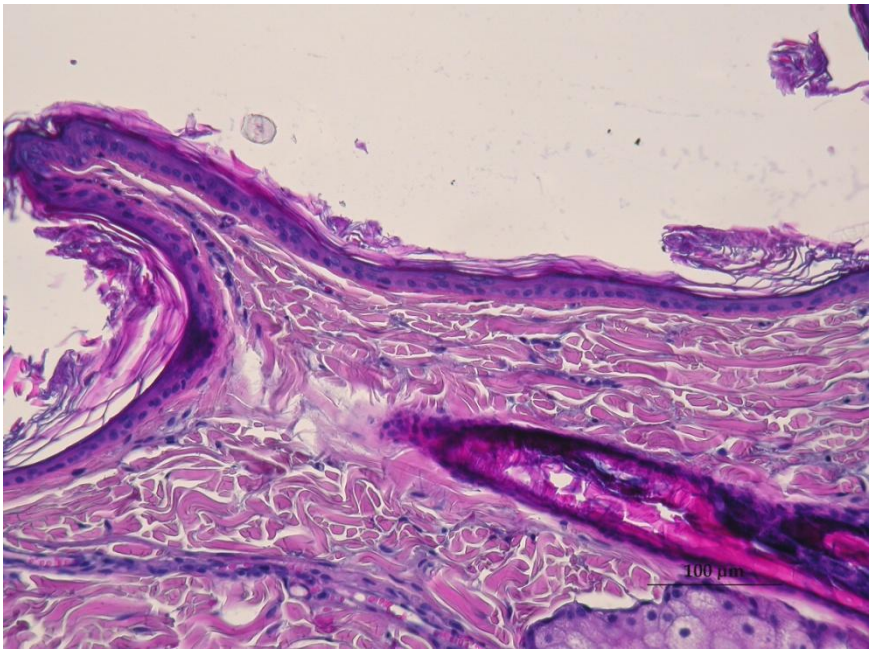


Traité,x 200, Mac 387

Photographie 22: Marquages immunohistochimiques à J8, des côtés traités et témoins

d) Biopsies après 5 jours d'applications quotidiennes de DouxocalmND mousse

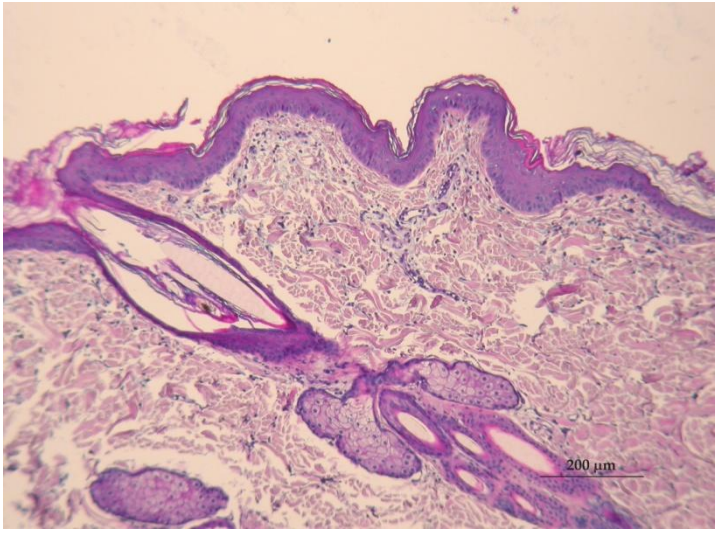
i) Sites témoins



Photographie 23 : Peau du côté témoin à J10, x 250, HE

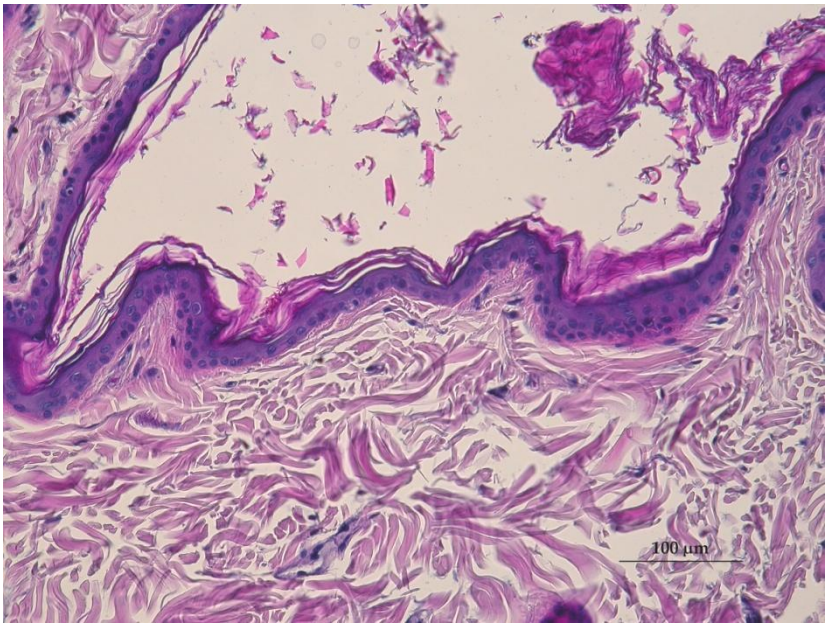
La couche cornée est complète ; le *stratum compactum* et le *stratum disjunctum* sont présents et bien disjoints, mais la couche compacte est plus épaisse que la normale (Photos 23 et 24). On trouve de nombreux foyers de parakératose. L'acanthose persiste nettement, avec un nombre de couches cellulaires variant de 6 à 9. On a une absence de spongiose et d'exocytose. Le bourgeonnement épidermique, qui donne un aspect ondulé à la membrane basale, est atténué mais toujours présent.

Concernant le derme (Photos 23 et 24), la congestion et l'œdème sont toujours présents, mais de manière beaucoup moins prononcée, ils sont d'intensité faible à modérée. L'infiltrat inflammatoire est moins important, il est à disposition périvasculaire (Photo 27, à gauche). L'index de prolifération est évalué à 38% en moyenne.



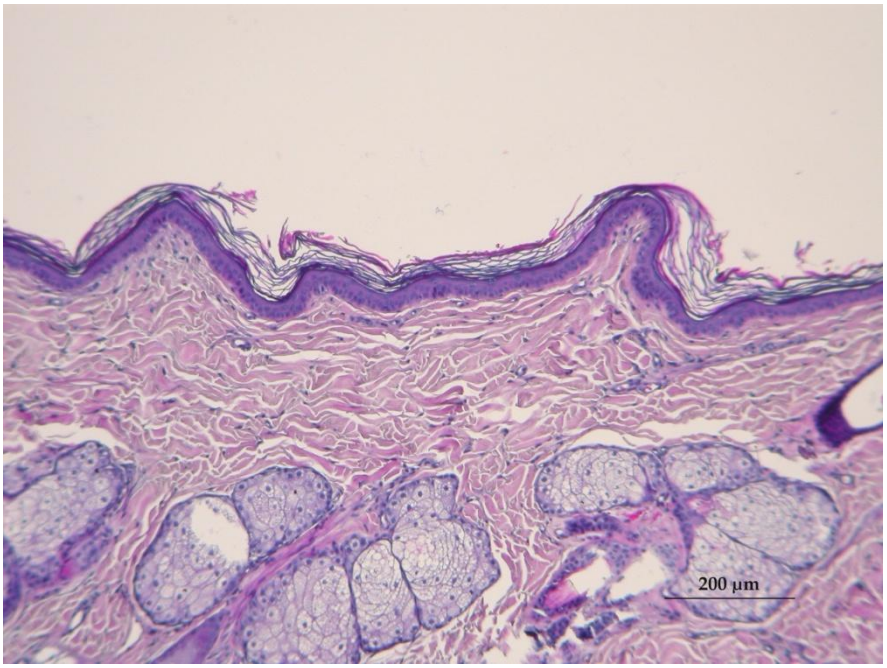
Photographie 24 : Vue d'ensemble de la peau du côté témoin à J10, x 100, HE

ii) Sites traités

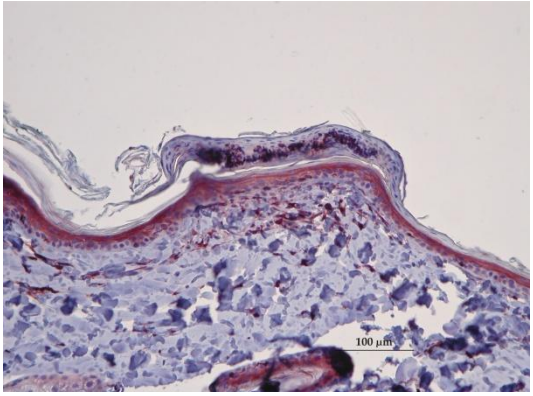


Photographie 25 : Peau du côté traité à J10, x 200, HE

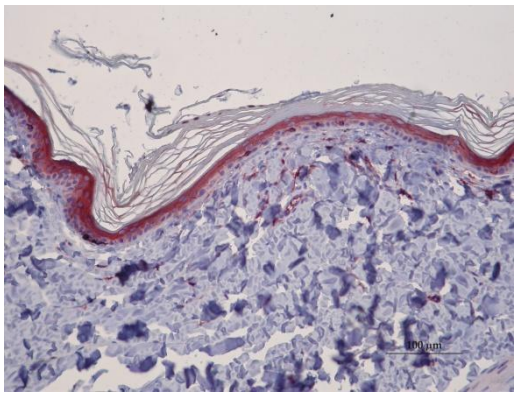
La couche cornée a récupéré un aspect très proche de la normale, avec un *stratum compactum* et un *stratum disjunctum* bien visibles, d'épaisseur normale (Photos 25 et 26). Quelques foyers de parakératose persistent. L'épaisseur de l'épiderme se maintient entre 3 et 5 couches cellulaires. On a une absence de spongiose et d'exocytose. Le bourgeonnement épidermique est stable avec une membrane basale qui paraît quasiment rectiligne et horizontale. Les kératinocytes de la couche basale ont récupéré un aspect proche de la normale (cellules plus hautes que larges).
Concernant le derme, on a une quasi-disparition de la congestion et de l'œdème, et l'intensité de l'infiltrat cellulaire est quasi-nulle, les rares cellules visibles étant à disposition périvasculaire (Photo 27, à droite). L'index de prolifération est évalué à 22% en moyenne.



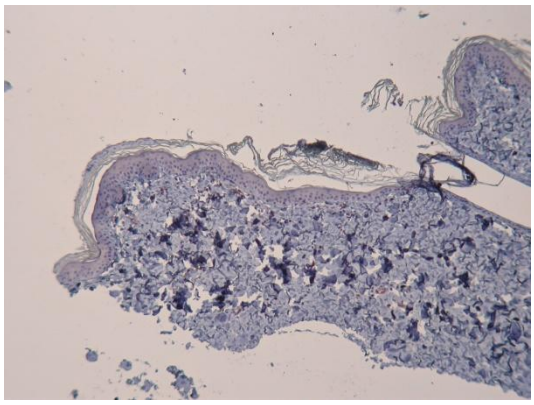
Photographie 26 : Vue d'ensemble de la peau du côté traité à J10, x 100, HE



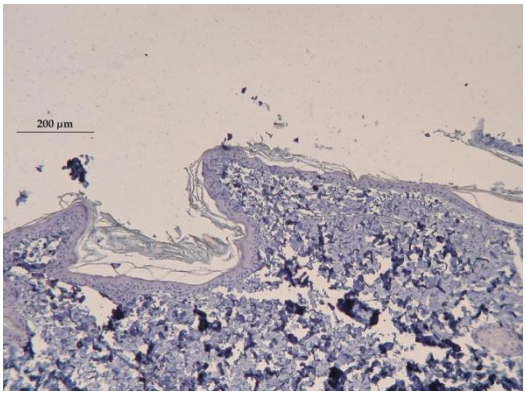
Témoin, x200, BLA36



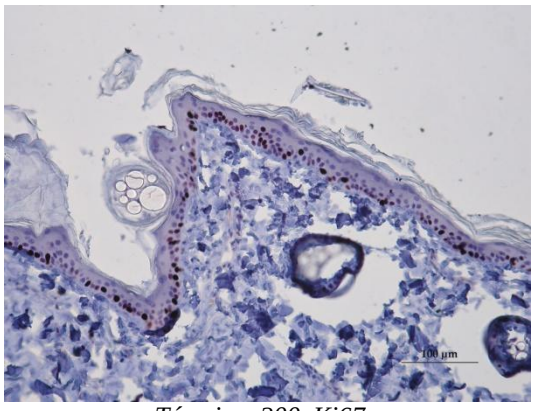
Traité, x200, BLA36



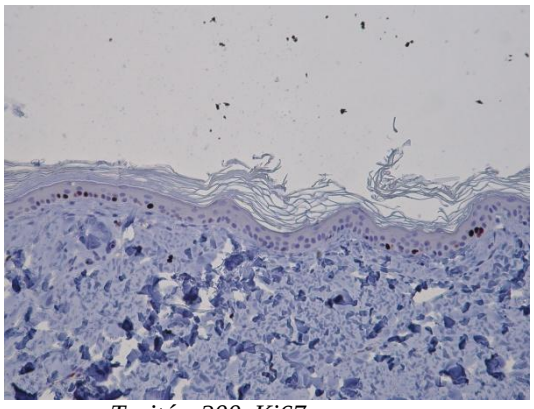
Témoin, x100, CD3



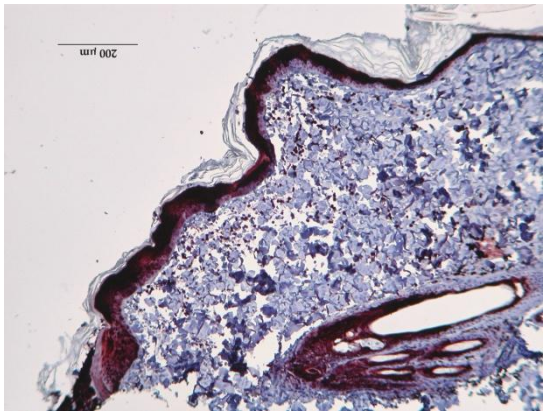
Traité, x100, CD3



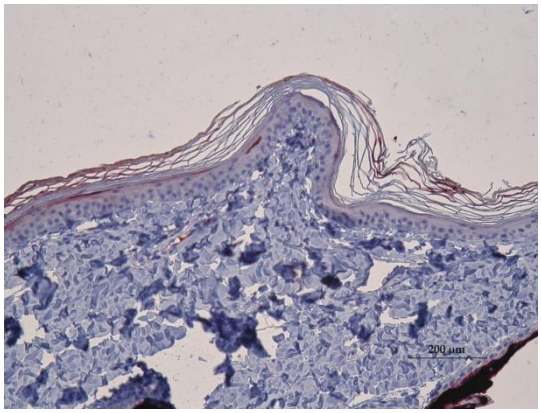
Témoin, x200, Ki67



Traité, x200, Ki67



Témoin, x200, Mac 387



Traité, x200, Mac 387

Photographie 27 : Marquages immunohistochimiques à J10, des côtés traités et témoins

e) Evolution de l'infiltrat inflammatoire au cours du temps

Pour chacun des immunomarquages réalisés au cours de l'étude, un comptage cellulaire, comme détaillé p.68, a été effectué. Les résultats des moyennes de ces comptages, obtenus pour chaque chien et pour chaque site, sont résumés dans les graphiques suivants.

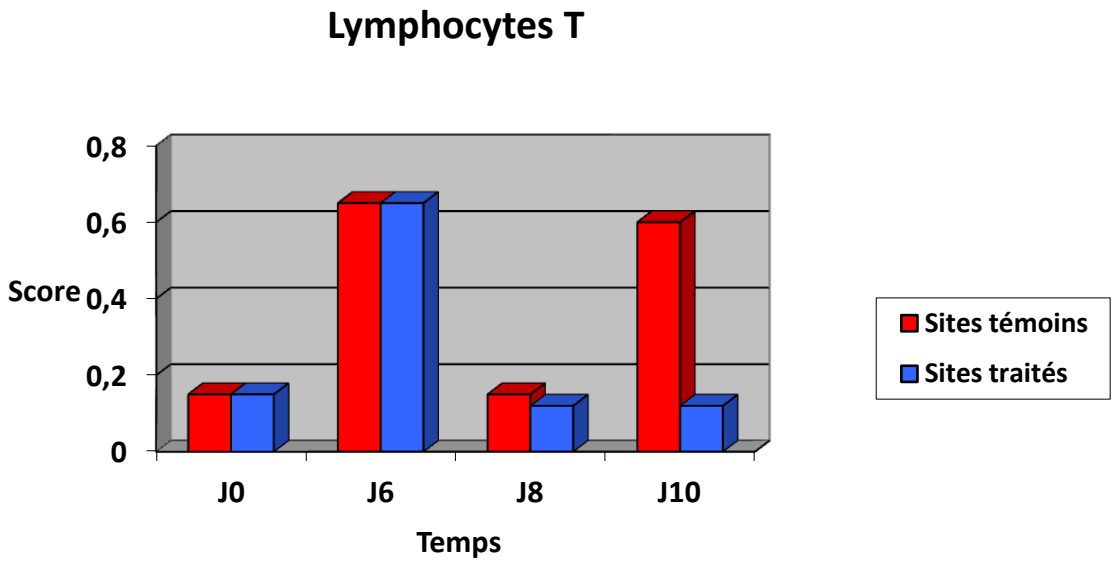


Figure 27 : Moyenne des lymphocytes (CD3) comptabilisés pour chaque site, des côtés traités et témoins

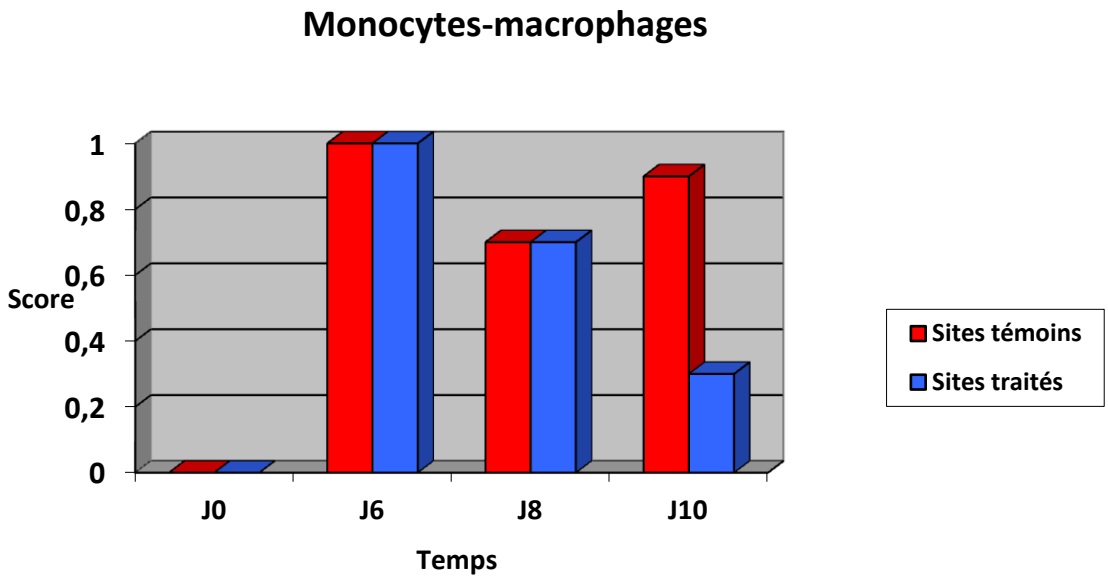


Figure 28 : Moyenne des monocytes et histiocytes (MAC387) comptabilisés pour chaque site, des côtés traités et témoins

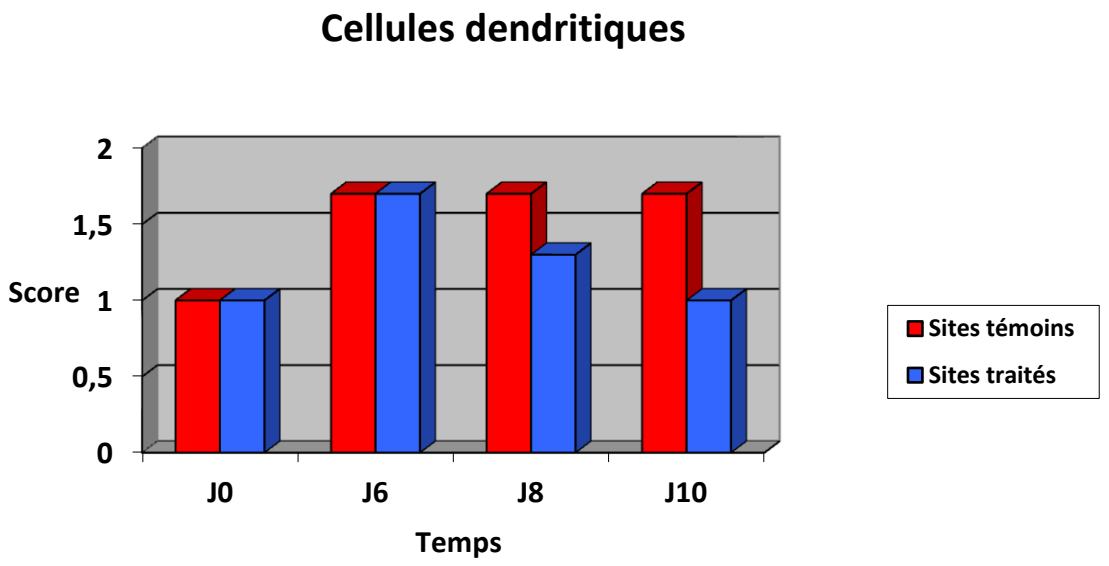


Figure 29 : Moyenne des cellules dendritiques (Bla36) comptabilisées pour chaque site, des côtés traités et témoins

Les résultats de ces trois graphiques (Fig 27, 28 et 29) montrent qu'au bout de 5 jours, les différentes cellules marquant l'inflammation sont toutes en nombre moins important pour les sites traités. L'application de DouxocalmND favorise donc une diminution de l'inflammation cutanée.

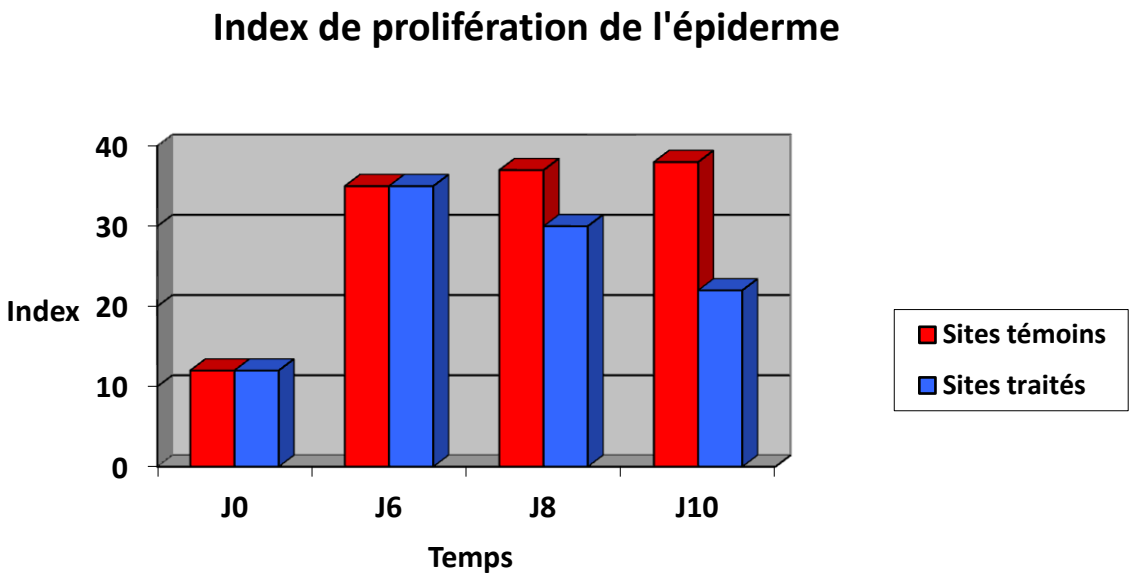


Figure 30 : Moyenne de la prolifération cellulaire (Ki67) de chaque site, des côtés traités et témoins

Ce graphique (Fig 30) montre qu'au bout de 5 jours, la prolifération cellulaire est beaucoup plus élevée pour les sites témoins que pour les sites traités. Ces résultats montrent donc également que la réparation de la barrière cutanée est favorisée par l'application de DouxocalmND.

C) Discussion

1) Choix des sites d'étude

Il fallait un nombre de sites par chien suffisamment important pour que des moyennes parlantes puissent être établies, tout en ayant des sites assez grands et faciles à créer. Le nombre de 10 sites par chien, 5 pour chaque côté, a donc été retenu. Les sites devaient avoir une surface suffisamment grande pour que des biopsies puissent y être réalisées sans perturber la suite de l'expérience. Une taille de 3 cm de longueur a été retenue, les biopsies étant réalisée vers les bords du rectangle. La largeur choisie est de 2 cm, taille correspondant à la largeur du scotch employé, afin qu'une seule apposition de ce dernier suffise.
Le choix de l'emplacement des sites sur le corps de l'animal a été effectué selon le raisonnement suivant. Il fallait des zones suffisamment grandes pour que cinq sites puissent y être dessinés, tout en étant le moins possible soumises aux irritations. De plus les manipulations nécessitant une immobilisation longue des sujets, elles devaient être situées sur un endroit du corps facile d'accès dans une position naturelle pour les chiens. Les études pilotes avaient également révélé que la zone des flancs se prêtait moins facilement aux manipulations que les zones thoraciques. Notre choix s'est donc naturellement porté sur ces dernières. Cette localisation présente toutefois des inconvénients. Tout d'abord, la densité importante du pelage oblige à la réalisation de tontes régulières pouvant interférer avec les mesures. Ensuite, les animaux peuvent se gratter aisément cette partie de leur corps avec les pattes postérieures. Enfin, chez les animaux les plus maigres, le positionnement des sondes est gêné par la présence des côtes.

2) Etablissement du modèle de rupture chronique de la barrière cutanée

Dans la partie bibliographique, nous avons vu que la procédure de tape-stripping était soumise à de nombreux facteurs de variabilité, aussi bien intrinsèques qu'extrinsèques.
Pour limiter les facteurs intrinsèques précédemment décrits, nous avons utilisé des chiens de même race, jeunes adultes. L'expérience ayant été menée sur 15 jours et dans un environnement contrôlé en hygrométrie et en température, on peut considérer que les effets de l'environnement extérieur ont été limités. Ainsi, seules les variations individuelles devraient interférer. Concernant la réalisation de la rupture chronique de la barrière cutanée, nous avons, selon les recommandations de certains auteurs, essayé de standardiser la procédure. Pour ce faire, les scotchs ont été appliqués sur le site et maintenus 10 secondes en exerçant une pression constante avec le pouce sur toute la surface du scotch. Puis le scotch a été retiré lentement, en 2 secondes environ, de façon unidirectionnelle. Pour limiter la variabilité tout en avançant rapidement le travail, deux opérateurs ont réalisés cette rupture de la barrière. Chaque opérateur appliquait 10 scotchs sur les 5 sites d'un côté, puis les places étaient échangées. Le scotch choisi avait une bonne adhérence avec la couche cornée, une distribution homogène de la partie adhésive et n'entraînait pas de réaction d'irritation. Les facteurs extrinsèques étaient donc eux aussi limités dans la mesure du possible.
D'une manière générale, la variabilité pouvant affecter la rupture chronique de la barrière cutanée n'est importante que si cette dernière repose sur un nombre défini de scotchs pour chaque site ; en effet, si dans ce cas, tous les scotchs ne sont pas appliqués de la même manière, il peut y avoir une différence majeure au niveau de la PIE obtenue pour chacun des sites. Mais dans note étude, pour limiter ce facteur, c'est la valeur de PIE moyenne à atteindre qui a été définie et non le nombre de scotchs nécessaires pour y parvenir.
Cependant, il faut souligner que la quantité de couche cornée retirée par chaque scotch décroît de façon non linéaire avec le nombre de scotchs déjà appliqués sur un même site, donc avec la

profondeur de couche cornée atteinte. Cela pourrait s'expliquer par une cohésion plus importante des cornéocytes entre eux dans la couche cornée profonde (2, 56). Comme la mesure de PIE n'était contrôlée que tous les 5 à 10 scotchs, pour des raisons évidentes de gain de temps, chaque mesure de PIE prenant environ 30 secondes, des disparités entre les PIE mesurées pour chaque site et pour chaque animal, au terme de la semaine d'induction (cf. annexe 3, colonne J6, pour les différents sites) sont notés et ce, malgré le processus de standardisation le mieux respecté possible.

3) Mesure de la perte insensible en eau

Chez le chien, plusieurs articles ont montré que la mesure de la perte insensible en eau est un bon moyen d'évaluer la qualité de la barrière cutanée et d'en suivre l'évolution (105, 113). Cette méthode a également pour avantage d'être non invasive et la réalisation des mesures ne demande pas de compétences particulières. C'est pourquoi nous l'avons retenue dans le cadre de notre expérience.

a) Contrôle des facteurs de variation influençant la mesure de la perte insensible en eau

L'appareil de mesure qui a été utilisé dans notre expérience est le VapoMeter® (Delfin Technologies Ltd, Kuopio, Finlande). Il s'agit d'un appareil à chambre fermée non ventilée, capable de détecter de faibles variations de PIE et dont la reproductibilité est considérée comme très bonne (31).
Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, la mesure de la perte insensible en eau est soumise à de nombreux facteurs de variation, à la fois intrinsèques et extrinsèques.

Concernant les facteurs de variation intrinsèque, le premier d'entre eux est la variation significative de mesure de la perte insensible en eau selon le site du corps choisi. En effet, l'influence du site corporel sur les valeurs de PIE a été clairement établie. Pour limiter ce paramètre, nous avons choisi des sites relativement proches, situés dans une même zone à savoir les deux côtés de la cage thoracique. De plus, nous avons observé que les valeurs de perte insensible en eau varient entre le côté gauche et le côté droit. Cela avait déjà été mis en évidence dans une étude de Lau-Gillard, qui avait montré que sur 20 chiens, 7 présentaient des valeurs de PIE significativement différente des deux côtés (57). Pour s'affranchir de ce paramètre, il est important de se baser sur les pourcentages de récupération de la barrière cutanée et non sur les valeurs brutes. La comparaison des pentes des régressions linéaires est aussi un moyen. Plus important, une variation de la perte insensible en eau a été rapportée sur les mêmes sites des jours différents (57), lorsque les conditions environnementales ne sont pas stables. Les animaux étaient donc placés dans la pièce d'expérimentation au moins 15 minutes avant les mesures et la température et l'hygrométrie de la pièce étaient fixes pendant toute la durée de l'étude. Malgré tout, la sonde était tenue à la main, et il se peut que sa température ait donc augmenté de manière importante, faussant les valeurs de PIE mesurées, même si aucun élément ne vient renforcer cette hypothèse.

Pour le pelage, les différents auteurs ne s'accordent pas sur la conduite à suivre. Pour notre part, nous avons décidé de tondre régulièrement l'animal pour des raisons pratiques : il est en effet beaucoup plus facile de placer la sonde de l'appareil au contact de la peau quand celle-ci est tondue. De même, il est plus facile d'y faire pénétrer le produit. Cependant, pour que la tonte n'influe pas sur les mesures de PIE, cette dernière était réalisée de manière très délicate, avec une petite tondeuse placée bien parallèlement à la peau pour éviter d'éventuelles

blessures qui fausseraient les résultats. La première tonte a été réalisée 24 h avant le début du tape-stripping, puis effectuée tous les deux jours. Les mesures de PIE étaient réalisées avant les tontes, de manière à ce qu'il y ait toujours 24 h d'écart au moins.

Ensuite, il semble que la race de chien et l'alimentation jouent un rôle primordial dans les mesures de PIE. C'est pourquoi les chiens choisis appartiennent tous à la même race, Beagle, et sont nourris exclusivement avec des croquettes physiologiques depuis plus de 12 semaines au début de l'étude. Bien que l'âge et le sexe ne semblent avoir que peu d'influence (57, 65, 116), nous avons préféré choisir des mâles, jeunes adultes. Quant à l'effet du rythme nycthéméral sur les valeurs de la PIE décrit chez l'homme (14), le fait que les animaux n'aient pas d'accès à l'extérieur et soient dans un chenil, à température et humidité constantes, nous permet de supposer l'absence d'influence de la variation du rythme nycthéméral dans notre étude. De plus, les mesures étaient réalisées à heures fixes, entre 8 h et 13 h, et les chiens étaient manipulés toujours dans le même ordre, donc 24 h séparaient précisément deux mesures.

Enfin, il semble que la position de l'animal au moment de la prise de mesure ait une influence assez importante sur les mesures de PIE. Dans notre étude, ces dernières étaient réalisées sur des animaux vigiles. L'emploi d'un appareil de mesure à chambre fermée avait ici tout son intérêt. En effet, outre le temps de mesure requis relativement court, le VapoMeter® est assez peu sensible aux mouvements d'air extérieurs et à l'angle de mesure donné. Cela nous a donc a priori permis de limiter l'impact des éventuels mouvements des sujets au cours de la mesure, sans toutefois s'en affranchir. Il aurait été souhaitable d'avoir des animaux parfaitement immobiles lors de la réalisation des mesures. On aurait pu, par exemple, dresser les chiens au clicker : cela a été réalisé dans plusieurs études (45, 116), avec l'obtention de très bons résultats. Cependant, dans le cadre de notre expérience, le temps qui nous était imparti était beaucoup trop court pour qu'un tel dressage soit entrepris. Une autre solution pour une immobilité parfaite des animaux aurait été de les anesthésier. Cependant, l'étude se déroulant sur une semaine, il n'était éthiquement pas correct d'endormir quotidiennement les animaux pendant au moins une heure, cela pouvant être dangereux pour eux. De plus, une étude (3) a montré qu'une tranquillisation à la médétomidine chez un chien réduit la perfusion cutanée de 70 à 90%, interférant ainsi avec les mesures de PIE. Enfin, il est important de noter que les animaux dont nous disposions étaient relativement calmes pendant les manipulations. Quand l'animal avait fait un écart trop important, perturbant la mesure, la valeur n'était pas retenue (rappelons que chaque mesure indiquée dans les tableaux de l'annexe 3, est en fait, la moyenne de 3 mesures réalisées sur le site).

Bien que le VapoMeter® soit très fiable, son principal défaut d'utilisation réside dans le fait que la sonde se réinitialise automatiquement après deux minutes, même si le microclimat dans la chambre de mesure n'est pas encore revenu à la normale et ne correspond pas au milieu extérieur (9). L'humidité dans la chambre de la sonde lors de la mesure suivante peut donc parfois être plus élevée que l'humidité du milieu extérieur et fausser la valeur de la mesure. Cependant, nous n'avons observé le problème que dans la première étude pilote, pour laquelle les valeurs de PIE à atteindre étaient très élevées, comprises entre 80 et 120 $g.m^{-2}.h^{-1}$. Pour ces valeurs, il nous est effectivement arrivé d'attendre 2 minutes avant que la sonde ne se réinitialise et on ne pouvait alors pas être sûrs des valeurs suivantes. Mais, pour l'étude principale, les valeurs de PIE étaient beaucoup plus basses, ne dépassant quasiment jamais les 50 $g.m^{-2}.h^{-1}$ et nous n'avons jamais attendu plus d'une minute avant que l'appareil ne se réinitialise. On peut donc penser que toutes les mesures qui ont été effectuées sont correctes.

Le fait que deux opérateurs effectuent les mesures a aussi pu constituer un facteur de variation, notamment parce que la pression exercée sur la sonde n'était peut-être pas la même.

Pour limiter les variations de mesures liées à l'environnement ou à la peau du chien, il a été réalisé tous les jours une mesure du TEWL basal, aussi bien du côté traité que du côté témoin. Cela nous a permis, lors de la création des graphiques, de nous affranchir de ces variations, notamment en présentant nos résultats en pourcentage de récupération. Les valeurs des basales sont très différentes d'un jour à l'autre et même d'un côté à l'autre, avec des valeurs variant de 1 à 15 $g.m^{-2}.h^{-1}$ et une moyenne de 5 $g.m^{-2}.h^{-1}$environ, ce qui prouve l'intérêt de ces mesures pour pouvoir interpréter correctement les résultats. De même, les résultats de notre étude diffèrent un peu de ce que l'on trouve dans la littérature. Des études réalisées sur des chiens de race Beagle et des chiens croisés rapportent des valeurs basales autour de 20 $g.m^{-2}.h^{-1}$ (105, 125) tandis que d'autres situent leurs valeurs basales autour de 10 $g.m^{-2}.h^{-1}$ (3, 45, 46, 104). Ces différences peuvent être dues à de nombreux facteurs, tels que l'appareil de mesure ou la race des chiens, qui rendent les études difficilement comparables.

Enfin, la dernière remarque concerne le refus du port de la collerette. En effet, malgré le fait que nous ayons essayé d'habituer les chiens, au cours de la phase d'induction, nous avons préféré y renoncer, les sujets ne la supportant véritablement pas. Il nous a donc semblé préférable de risquer un léchage possible des sites, qu'une blessure de l'un des chiens. De plus, ces derniers se démenant, en se roulant, pour se débarrasser de leurs collerettes, les sites rentraient en contact avec le sol, ce qui pouvait modifier la valeur de PIE. Enfin, les sites étant situés sur la cage thoracique, il était assez difficile pour les chiens de les lécher. Notre observation des animaux nous a d'ailleurs montré que les animaux ne se léchaient jamais les sites ; quand ils y touchaient, c'était en se grattant avec les pattes postérieures, ce à quoi la collerette n'aurait rien changé. Cela peut d'ailleurs expliquer quelques valeurs étranges observées ponctuellement sur un chien.

b) Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats est essentiellement basée sur une analyse descriptive des diverses courbes obtenues au cours de l'expérience. Que l'on soit du côté traité ou du côté témoin, on observe une décroissance rapide des valeurs de TEWL le premier jour. En effet, quel que soit le côté, au bout de 24 h, la barrière cutanée a déjà récupéré environ 60% de son imperméabilité à l'eau. Après une rupture de la barrière cutanée, des mécanismes compensateurs se mettent en place afin de la restaurer, il est donc normal d'observer une restauration spontanée avec retour aux valeurs basales sur les sites témoins. L'interprétation des résultats est basée sur une comparaison entre les sites témoins et les sites traités. La lotion DouxocalmND mousse ne semble pas diminuer la PIE dans le modèle de rupture chronique d'intensité modérée. De meilleurs résultats avaient été obtenus dans le cadre de la deuxième étude pilote, lorsqu'une rupture aiguë de faible intensité avait été entreprise, mais ne semblaient pas non plus significatifs. Pourtant, au vu des résultats de l'examen histopathologique, on est certains que le produit a une efficacité sur la réparation de la barrière cutanée. La plupart des études montrent une très bonne corrélation entre la PIE et l'état de la barrière cutanée (31, 46, 104, 105, 113…). Il est donc étonnant que les courbes obtenues du côté traité ne diffèrent pas davantage de celles du côté témoin. Seules quelques publications, portant notamment sur l'étude de corticoïdes (95), avaient rapporté un tel décalage.
L'absence d'effet sur la PIE pourrait s'expliquer de plusieurs manières. Tout d'abord, on peut envisager que l'effet hydratant est modeste à faible et ne se manifeste nettement que lors de

rupture de faible intensité. Dans ce même ordre d'idée, on peut penser que, dans le cas d'un modèle de rupture chronique, où les lésions induites sont bien installées, il aurait fallu un temps d'étude plus long pour voir l'effet hydratant se manifester. Une autre explication plausible serait que ce manque d'effet ne soit qu'apparent : l'effet hygroscopique augmentant le taux d'hydratation, il augmenterait également la PIE en l'absence d'une barrière fonctionnelle. La mesure du taux d'hydratation de la couche cornée au cours de l'étude aurait permis de trancher.

Enfin, il est évident qu'une étude statistique aurait été souhaitable. Initialement prévue, il s'est avéré que l'échantillon choisi était finalement trop petit pour réaliser un test statistique fiable et interprétable. Le nombre de sites était suffisamment important, mais le problème est que l'on travaille sur des moyennes. Augmenter le nombre de sites par chien ne présentait donc pas d'intérêt, puisque le nombre de moyennes obtenues n'aurait pas changé. Il aurait fallu avoir un nombre de chiens plus important pour pouvoir réaliser une étude statistique correcte. Une petite dizaine de chien aurait probablement convenu. Mais les mesures de PIE étant très chronophages, prenant entre 40 minutes et 1 h par sujet, il était difficile pour nous d'intégrer plus de sujets dans l'étude. Pour pouvoir réaliser les mesures sur tous les chiens, il aurait fallu créer deux sous-groupes de 5 chiens et réaliser l'étude sur deux fois 15 jours. On aurait alors rencontré des différences d'environnement entre les sous-groupes et, de toute façon, nous ne disposions pas du temps nécessaire.

4) Mesure du pH

Les mesures du pH sont beaucoup moins soumises à variation que celle de la PIE. Dans un environnement bien contrôlé, elles sont beaucoup plus reproductibles et une seule mesure suffit. Dans notre étude, les chiens ont un pH basal un peu plus élevé que ce qui est décrit dans la littérature, avec une moyenne de 7,7. Au terme de la semaine de tape-stripping, les valeurs obtenues sont plus acides, avec des valeurs proches de 7,2, c'est-à-dire proches de la neutralité, ce qui est normal pour les couches profondes de l'épiderme. Du côté traité, les sites retrouvent un pH épidermique proche de la basale rapidement, voire un peu plus acide. Cela prouve que le DouxocalmND mousse acidifie la surface de la peau, ce qui est favorable au rétablissement de la barrière et est un avantage dans la lutte antimicrobienne. L'analyse statistique aurait ici encore été intéressante, mais pour les mêmes raisons que pour les valeurs de PIE, elle n'a pas pu être effectuée, même si les mesures de pH sont beaucoup moins chronophages.

5) Examen histopathologique des biopsies cutanées

Pour évaluer les lésions de l'épiderme induites par le tape-stripping, nous avons réalisé des biopsies cutanées et des examens en immunohistochimie.
Après une semaine de tape-stripping, l'aspect de tous les sites est l'aspect classique obtenu dans le modèle de rupture chronique de la barrière. La couche cornée est absente, parfois remplacée par une couche mince et compacte de kératine. On observe aussi une acanthose épidermique, un bourgeonnement épidermique conférant à la membrane basale un aspect « ondulé », une spongiose, un épaississement de la couche granuleuse, un œdème et une congestion du derme et un infiltrat inflammatoire périvasculaire à diffus. Ces lésions microscopiques traduisent le caractère chronique de la rupture de la barrière cutanée. Elles ont disparu ou ont nettement diminué après une semaine d'application quotidienne de DouxocalmND. Au contraire, ces critères persistent ou présentent une décroissance moins importante sur les sites témoins.

Le retour à une couche cornée normale et, donc, à une barrière cutanée efficace est plus rapide lors d'applications quotidiennes de DouxocalmND. On note une régulation de la prolifération des kératinocytes plus efficace du côté traité, ce qui est mis en évidence par le marquage Ki67. Les améliorations concernent aussi bien l'épiderme que le derme, puisque l'œdème, la congestion et l'inflammation du derme régressent plus rapidement du côté traité.

Cependant, on peut émettre quelques réserves concernant ces résultats. Tout d'abord, le nombre de biopsies effectuées est relativement faible ; une biopsie par côté pour les jours J0, J6, J8 et J10. Ainsi, un seul des 5 sites a été prélevé à chaque fois, le condamnant pour des biopsies ultérieures. En effet, il n'était pas possible de réaliser plusieurs biopsies par site sans influer sur l'évolution de la réparation de la barrière cutanée. Nous avons donc supposé que les 5 sites évoluaient de la même manière tout au long de l'expérience.
Ensuite, concernant les immunomarquages, à l'exception du Ki67, ce n'est pas un vrai comptage qui est réalisé. On indique simplement s'il y a aucune, peu, ou beaucoup de cellules colorées visibles, mais la cotation est subjective.

6) Conclusion sur les effets du DouxocalmND

La synthèse des différents résultats obtenus précédemment met en évidence que le DouxocalmND a plusieurs actions, aussi bien sur l'épiderme que sur le derme. L'effet anti-inflammatoire, assuré notamment par le Stimutex AS, les avenanthramides et la phytosphingosine hydrochloride, est marqué ; en effet les lames histologiques montrent une nette diminution de l'infiltrat inflammatoire lors de l'application quotidienne du produit. L'application de DouxocalmND permet également le maintien d'un milieu acide, défavorable au développement des bactéries et favorable à la réparation de la barrière cutanée.
Les propriétés des constituants du DouxocalmND favorisent la différenciation kératinocytaire et, par conséquent, la diminution de l'hyperplasie et le retour à l'homéostasie. La synthèse lipidique est améliorée grâce au SK-influx V et à la phytosphingosine hydrochloride. Enfin, bien qu'aucune différence concernant les mesures de PIE du côté témoin et du côté traité n'ait été mise en évidence, il n'en demeure pas moins que de nombreux constituants du DouxocalmND possèdent un pouvoir hydratant, même si celui-ci n'a pu être mis en évidence dans notre étude.

CONCLUSION

Les dermatoses inflammatoires chroniques, telles que la dermatite atopique, sont relativement fréquentes chez le chien. Elles peuvent entraîner une baisse de la qualité de vie de l'animal et de son propriétaire.

Ces maladies s'accompagnent le plus souvent d'une altération de la barrière cutanée. D'un point de vue fonctionnel, cette altération a plusieurs conséquences : la perturbation des barrières, chimique et biochimique, entraîne une augmentation du pH cutané, une modification de la flore commensale et le développement d'éléments pathogènes à la surface de la peau ; l'altération concomitante de la barrière physique se traduit par une augmentation de la perte insensible en eau, entrainant une déshydratation de la couche cornée ; enfin, l'ensemble du métabolisme cutané est perturbé.

Récemment, le laboratoire Sogéval a mis au point un produit topique réparateur de la barrière cutanée, le DouxocalmND mousse MO. Le but de notre étude est d'en évaluer l'efficacité dans un modèle de rupture chronique de la barrière cutanée chez le chien.

La rupture chronique de la barrière cutanée a été obtenue par tape stripping quotidien, permettant d'atteindre une valeur de perte insensible en eau d'environ 20 à 40 $g.m^{-2}.h^{-1}$, durant 6 jours. Puis, nous avons appliqué la lotion DouxocalmND mousse MO tous les jours et en avons évalué l'efficacité par le suivi de la perte insensible en eau, du pH cutané et de l'examen histopathologique, complété par des immunomarquages, et de biopsies cutanées itératives.

Les résultats des sites traités, comparés à ceux des sites témoins, en particulier le pH et l'examen histopathologique, montrent que DouxocalmND mousse MO favorise et accélère la récupération de la fonction barrière de la peau : le pH des sites traités est maintenu dans des valeurs plus acides que celles du pH des sites témoins, ce qui est un élément favorable au rétablissement de la barrière et à la lutte antimicrobienne ; en cinq jours, toutes les lésions microscopiques, induites par la rupture chronique de la barrière épidermique, ont disparu ou se sont nettement atténuées pour les sites traités, alors qu'elles persistent ou ne sont que modérément améliorées pour les sites témoins. La perte insensible en eau des sites traités évolue de manière identique à celle des sites témoins dans ce modèle de rupture chronique d'intensité modérée. Cela peut s'expliquer, soit par un effet hydratant modeste du produit, soit par la nécessité d'un délai supérieur pour qu'il se manifeste, soit, encore, par le fait que ce manque d'effet ne soit qu'apparent.

En conclusion, la lotion DouxocalmND mousse MO accélère la restauration de la barrière cutanée et offre aux chiens, souffrant d'affections inflammatoires chroniques avec altération de la barrière cutanée, une option thérapeutique complémentaire du traitement étiologique.

Le Professeur responsable
VetAgro Sup campus vétérinaire

Le Directeur général
VetAgro Sup

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

Le Président de la thèse

CENTRE HOSPITALIER LYON SUD
69495 PIERRE BENITE CEDEX
Unité d'Immunologie Clinique et d'Allergologie
Professeur Frédéric BERARD

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 06 JUIL. 2012

Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,
Professeur F.N GILLY

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

ANNEXES

ANNEXE 1 : RELEVE DE LA PIE POUR CHAQUE SITE POUR LES CHIENS PILOTES

Premier chien pilote :

	0	3	6	9	21	26	31	44	54
D1	137	95	73	88	64	28	28	31	31
D2	73	157	213	82	32	29	31	31	11
D3	106	48	108	53	30	29	42	29	27
D4	158	85	39	31	32	27	46	25	25
D5	131	103	47	50	59	25	34	27	18
G1	117	44	86	79	63	38	36	26	23
G2	236	100	63	45	39	51	34	30	20
G3	132	71	50	46	21	30	27	21	13
G4	147	53	53	39	25	41	34	38	17
G5	267	115	41	55	51	41	35	51	26

Deuxième chien pilote :

	0	3	6	9	21	26	31	45	50	55
D1	40	42	39	150	28	30	29	27	22	18
D2	41	35	24	49	20	20	13	16	20	18
D3	30	29	30	38	26	25	21	15	16	20
D4	35	24	19	29	21	34	28	18	25	19
D5	31	28	30	48	22	31	31	24	32	25
G1	33	24	28	34	29	59	53	29	20	19
G2	33	28	27	41	32	30	27	23	22	22
G3	32	26	27	37	27	31	17	17	20	18
G4	41	25	26	58	30	28	31	28	28	20
G5	30	25	17	14	15	28	22	23	17	16

ANNEXE 2 : NOMBRE DE SCOTCHS APPLIQUES SUR CHAQUE SITE PENDANT 1 SEMAINE

Chien 1	J1	J2	J3	J4	J5	J6	TOTAL
D1	33	5	30	8	10	15	101
D2	30	5	10	11	10	15	81
D3	30	5	15	8	5	11	74
D4	33	7	20	5	5	23	93
D5	33	17	0	5	8	28	91
G1	30	4	7	8	15	20	84
G2	30	0	8	8	5	15	66
G3	30	7	10	15	5	15	82
G4	30	2	15	15	10	13	85
G5	30	7	10	3	8	15	73

Chien 2	J1	J2	J3	J4	J5	J6	TOTAL
D1	45	10	20	20	28	17	140
D2	30	3	15	20	27	16	111
D3	30	10	15	20	10	15	100
D4	55	5	15	15	13	15	118
D5	55	3	15	15	10	15	113
G1	40	6	5	18	15	13	97
G2	30	10	20	10	17	13	100
G3	40	5	15	10	15	13	98
G4	45	10	15	15	15	13	113
G5	48	15	15	15	12	13	118

Chien 3	J1	J2	J3	J4	J5	J6	TOTAL
D1	30	2	8	15	10	20	85
D2	30	0	13	5	10	15	73
D3	20	3	10	8	10	15	66
D4	20	10	3	10	10	15	68
D5	25	5	12	7	10	18	77
G1	15	6	7	5	12	15	60
G2	20	2	5	5	8	15	55
G3	30	0	8	5	8	10	61
G4	30	8	10	7	11	10	76
G5	33	5	5	9	11	18	81

Chien 4	J1	J2	J3	J4	J5	J6	TOTAL
D1	30	0	12	18	18	20	98
D2	40	1	20	10	10	20	101
D3	25	2	12	10	20	20	89
D4	25	0	18	13	20	20	96
D5	32	7	20	20	23	20	122
G1	10	0	5	15	17	20	67
G2	10	0	12	10	18	20	70
G3	15	2	10	15	15	20	77
G4	10	0	18	20	15	20	83
G5	25	1	18	15	10	20	89

Chien 5	J1	J2	J3	J4	J5	J6	TOTAL
D1	30	2	3	5	8	20	68
D2	19	2	5	5	7	15	53
D3	15	1	3	5	7	20	51
D4	40	0	0	5	15	15	75
D5	35	8	3	0	17	20	83
G1	45	5	8	5	5	20	88
G2	40	3	12	10	10	15	90
G3	30	5	5	20	5	22	87
G4	35	2	8	8	8	30	91
G5	20	3	6	10	5	30	74

ANNEXE 3 : RELEVE DE LA PIE POUR CHAQUE SITE

Chien 1	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J6,H+8	J7	J8	J9	J10
D1	25,3	22	21,8	27,7	24,1	43,8	48,2	27,1	14	9,4	8,3
D2	37,7	35,8	24,3	25	45,1	49,8	31,1	14,6	9,6	6,5	6,2
D3	26	25,6	36,9	28,4	24,8	38,3	29,5	17,8	10,2	6,1	5,4
D4	24,3	24,1	24,7	27,9	24,8	52	35,9	14,9	13	9,2	8
D5	24,3	26,6	23,4	46,9	32,2	49,2	28,7	16,9	9,5	9,8	6,5
G1	25,3	24	27,2	24,9	32,8	51,5	21,8	8,8	6,7	4,4	3,4
G2	34,3	23,2	20,9	26,5	30	40,5	38	20,3	10,7	5,9	5,4
G3	31	49,7	33,5	32,1	28,2	62,1	32	19,6	9	6,3	4,5
G4	24	23	20,5	26,6	34,6	41,2	17,4	12,2	8,2	5,9	3,6
G5	27,3	22,9	23,6	31,9	30,1	34,3	27,2	17	7,2	7	4,7
Moyenne à droite	27,52	26,82	26,22	31,18	30,2	46,62	34,68	18,26	11,26	8,2	6,88
Moyenne à gauche	28,38	28,56	25,14	28,4	31,14	45,92	27,28	15,58	8,36	5,9	4,32
BASALE	4,3	5,1	6,4	2,5	4	1,9	4,5				
gauche								1,6	2,5	1,5	1,3
droite								2,7	1,4	3,7	2,1

Chien 2	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J6,H+8	J7	J8	J9	J10
D1	20,3	23,4	19,7	22	27,5	35,1	23,6	12	12,1	8,1	9,8
D2	21,7	27,7	28,8	22	30	33,9	28,4	13,7	12,2	6,1	8,7
D3	24,1	29,7	51,7	49,3	30,7	39,8	28,8	11,3	10,2	11,3	7,3
D4	16,7	20,2	22,1	25	35,4	41	26,1	13,6	10,1	7,2	6,5
D5	35	27,1	27	22,8	27	35,6	25,2	14,8	13,1	6,7	6,9
G1	21,3	26	27	20,5	29,5	40	26,5	16,3	12,4	8,2	5,6
G2	21,2	25,4	23,5	24,3	28,4	38,4	28,8	11,5	9,6	8,4	4,1
G3	26,8	22,7	41,7	23,9	28,6	58,7	26,5	12	6,3	5,4	7,7
G4	20,8	23,7	31,4	23,9	40,8	45,5	19,8	17,3	14,9	9,4	7,2
G5	22,6	27,2	26,9	21,1	33,6	40,6	27	10,8	8,9	6,9	5,5
Moyenne à droite	23,56	25,62	29,86	28,22	30,12	37,08	26,42	13,08	11,54	7,88	7,84
Moyenne à gauche	22,54	25	30,1	22,74	32,18	44,64	25,72	13,58	10,42	7,66	6,02
BASALE	3,9	5,1	9,6	3,5	3,8	4,1	4,1				
gauche								2,2	2,6	4,4	4,4
droite								2	2	2,6	2,1

Chien 3	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J6,H+8	J7	J8	J9	J10
D1	36,4	26,6	21,6	28,1	29	44,6	37,6	18	12	14,1	7,8
D2	44,8	20,8	22,1	26,3	33,2	47,1	42,9	22	14,6	14,3	8,3
D3	19,5	24,4	23,5	23,5	32,9	37,2	34,7	21	19,6	15,7	6,7
D4	25,3	38,7	26,2	30,2	36,1	35,1	26,3	15,7	10	9,6	6,7
D5	22,9	25,7	29	26,3	35,6	33,8	17,1	11,7	10,6	6,2	3,6
G1	23,8	25,4	22,1	26,6	35	46,1	36,4	20,8	12	16,6	9,2
G2	21,7	23,7	23,8	31,4	28,7	47,3	33,2	27,7	14,5	17,4	11,4
G3	20,4	24,5	36	27,8	26,9	45,2	22,2	30	9,5	10,8	8,6
G4	20,5	25,3	25,5	26,2	32,6	39,8	16,3	15,8	11	7,8	6,4
G5	25,8	22,8	27,9	21,3	27,8	66,9	26,9	24,6	12,3	10,8	7,2
Moyenne à droite	29,78	27,24	24,48	26,88	33,36	39,56	31,72	17,68	13,36	11,98	6,62
Moyenne à gauche	22,44	24,34	27,06	26,66	30,2	49,06	27	23,78	11,86	12,68	8,56
BASALE	4,1	1,4	4,6	4,9	1,9	5,5	4,2				
gauche								2,2	1,5	8	3
droite								6,7	4,3	4,3	2,7

Chien 4	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J6,H+8	J7	J8	J9	J10
D1	23,9	28	25,7	25	34,9	50,2	30,2	21,8	24	13,7	16
D2	24,8	23,7	25	28,9	39,5	51,3	42,8	22,3	22	16,6	27,5
D3	28,4	26	28,6	24,6	29,5	49,6	26,3	16,3	19,9	10,4	17,2
D4	30,1	28,9	22,6	21,2	34,8	39,1	36	23	17	10,3	19,9
D5	24	28	26,9	25,4	21,5	36,9	27,8	13,5	11,8	7,9	15,5
G1	55	41,1	27	19,9	25,1	41,6	22,3	16,7	11,4	9,3	13,9
G2	32,6	30,1	27,4	26,8	26,3	70,1	48	26,2	18	7,5	9,1
G3	29,4	22,9	24,6	24,7	30,6	79,9	40,6	26	14,4	9,7	6,2
G4	41,2	25	26,9	19,5	35,9	125,5	38,5	18,6	14,2	8,6	9,2
G5	19,2	26	25,8	29,5	26,9	55	31,2	15,7	10,5	8,5	4,8
Moyenne à droite	26,24	26,92	25,76	25,02	32,04	45,42	32,62	19,38	18,94	11,78	19,22
Moyenne à gauche	35,48	29,02	26,34	24,08	28,96	74,42	36,12	20,64	13,7	8,72	8,64
BASALE	4,1	4,3	4,7	1,2	4,5	4,7	4,8				
gauche								2,4	2,9	11,2	5,8
droite								3,7	4,5	8,1	8,7

Chien 5	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J6,H+8	J7	J8	J9	J10
D1	25	28,4	22	26,6	35,4	44,6	28,4	17	12,8	13,8	8,8
D2	24,2	28,3	22,9	26,1	33,5	44,5	29,5	18,4	15,4	10,7	8,6
D3	20,1	27	27,4	27	28,3	33,6	26,4	14,9	10,3	11,4	3,3
D4	43,1	26,5	16,8	21,6	38,5	39,5	26,2	16	14	14	8,4
D5	31,4	21	25,6	28,2	33,7	45,7	29,1	16,9	16	9,6	6,1
G1	29,8	21,5	25,7	25	26,6	32,1	21,7	23,5	13,2	8,4	9,4
G2	21,6	22,3	28,8	28,8	26	31,1	23,7	16	11,6	9,2	8,1
G3	23,7	24,4	20,5	34,1	25,8	43,1	20,9	13,7	10,1	5,3	6,8
G4	30,1	26,6	25,9	33,7	44,6	35,1	25,9	18,5	9,7	8,9	6,1
G5	30,5	27,2	28,8	22,3	29,4	34,1	15,1	12,5	9	6,4	6,2
Moyenne à droite	28,76	26,24	22,94	25,9	33,88	41,58	27,92	16,64	13,7	11,9	7,04
Moyenne à gauche	27,14	24,4	25,94	28,78	30,48	35,1	21,46	16,84	10,72	7,64	7,32
BASALE	1,9	4,1	10	2	4,6	4,8	4,8				
gauche								4	2	2,3	3,1
droite								7,9	5	4,3	4,2

ANNEXE 4 : RELEVE DU PH POUR CHAQUE SITE

Chien 1	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J6,H+8	J7	J8	J9	J10
D1	6,4	6,9	7,1	6,5	6,7	6,8	6,9	7	6,5	6,5	6,3
D2	6,2	7,2	6,8	6,6	6,6	6,7	6,8	6,7	6,4	6,3	6,2
D3	6,3	6,8	6,6	6,1	6,4	6,5	6,6	6,7	6,2	6,1	6,2
D4	5,9	6,6	6,4	6,8	6,4	6,4	6,7	6,6	6,5	6,2	6,3
D5	5,7	6,5	6,2	6,2	6,4	6,3	6,5	6,6	6,3	6,4	6,2
G1	5,9	6,7	6,3	6,6	6,8	6,7	7,3	7	7,2	7,2	7,5
G2	6,1	6,7	6,4	6,1	6,5	6,8	7	6,8	6,9	7,2	7,1
G3	6	7,2	6,5	6,1	6,5	6,7	6,9	6,8	6,8	6,6	7
G4	5,8	6,8	6,4	6,1	6,4	6,3	6,8	6,8	7	7,1	7,4
G5	5,9	6,6	6,3	6,2	6,2	6,2	6,5	6,5	6,6	6,4	6,6
BASALE	6	6,6	6,7	6,7	6,8	6,7	6,8	6,3	6,6	6,5	6,4
Moyenne à droite	6,1	6,8	6,62	6,44	6,5	6,54	6,7	6,72	6,38	6,3	6,24
Moyenne à gauche	5,94	6,8	6,38	6,22	6,48	6,54	6,9	6,78	6,9	6,9	7,12

Chien 2	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J6,H+8	J7	J8	J9	J10
D1	8,2	8,5	8,5	8,2	8,1	7,6	8	8,4	8,6	8,5	8,6
D2	7,9	7,9	8,2	8,1	7,8	7,3	8	8,2	8,4	8,1	8,1
D3	7,5	7,7	7,4	7,7	7,5	7,4	7,7	8,2	8,2	8,1	8,2
D4	7,3	7,4	7,2	7,4	7,5	7	7,8	8,4	8,4	8,4	8
D5	7,5	7,4	7,4	7,4	6,9	6,3	7,8	8,6	8,1	8,6	8,4
G1	8,2	8,1	8	7,7	7,7	8,1	7,6	8,3	8,4	8,5	8,7
G2	8,4	8,4	8,2	8,1	8,2	8	8,3	8,6	8,9	8,8	8,8
G3	7,9	7,8	7,6	7,4	8	7,5	8,2	8,6	8,7	8,7	8,8
G4	7,7	7,4	7,3	7,5	7,6	7,2	7,8	8	8,8	8,6	8,9
G5	7,7	6,7	6,7	7,5	6,9	6,9	7,6	7,9	8,2	8,7	9,3
BASALE	7,7	7,7	7,7	8,1	8,4	8,3	7,8	8,7	8,2	8,6	7,9
Moyenne à droite	7,68	7,78	7,74	7,76	7,56	7,12	7,86	8,36	8,34	8,34	8,26
Moyenne à gauche	7,98	7,68	7,66	7,64	7,68	7,54	7,9	8,28	8,6	8,66	8,9

Chien 3	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J6,H+8	J7	J8	J9	J10
D1	7,3	7,9	7,8	7,7	7,6	7,7	7,9	8,6	8,4	8,3	8
D2	7,4	7,9	8,2	7,3	7,7	8	8	8,4	8,4	8,6	8,4
D3	6,1	6,5	8	7,4	7,3	7,5	7,6	8,2	7,9	8,1	8,3
D4	5,8	6,6	7,7	7	7,4	7,1	7,5	8,3	8,1	7,8	8,9
D5	6,5	6,1	6,7	6,9	6,9	7,3	7,5	8,5	8,2	7,9	7,9
G1	7,4	7,6	7,4	7,4	7,4	7,7	7,7	8,3	8,2	8,8	8,7
G2	7	8	7,6	7,5	7,2	7,7	7,6	7,7	8,7	9	9
G3	7,2	7,2	7,5	7,3	7,3	7,5	7,2	7	8,8	8,8	8,6
G4	7,8	7,6	7,2	7,1	7,1	7,3	7,8	7,9	8,6	8,5	8,9
G5	7,4	6,2	6,7	7,1	7,1	7,2	7,2	7,8	8,6	8,6	8,7
BASALE	6	7,9	7,8	8	7,8	7,9	7,9	8,4	8,2	8,5	8
Moyenne D	6,62	7	7,68	7,26	7,38	7,52	7,7	8,4	8,2	8,14	8,3

Chien 4	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J6,H+8	J7	J8	J9	J10
D1	7,8	7,8	8	7,6	7,6	7,7	8,2	7,4	8,7	8,7	8,8
D2	7,7	8,2	7,7	7,5	7,3	7,6	8,1	7,9	8,2	8,5	8,5
D3	7,7	7,9	7,9	7,4	7,3	7,8	8	7,8	8,5	8,5	8,8
D4	7,6	7,8	7,3	7,5	7,4	7,6	8,1	7,9	8,7	8,6	8
D5	7,5	7,7	7,6	7,4	7,2	7,5	7,8	8,6	8,7	8,7	8,3
G1	7,6	7,7	7,9	7,7	7,3	7,1	7,6	7,3	8,5	8,2	8,9
G2	7,6	7,5	7,7	7,4	6,3	7	7,6	7,7	8,5	8,6	8,8
G3	7,7	7,6	7,3	7,4	6,4	7,3	7,7	8,4	6,5	7,1	8,6
G4	7,5	7,5	7,6	7,1	6,8	7,2	7,7	8,1	8,1	8,8	8,6
G5	7,2	7,5	7,2	7,5	7,6	7,1	7,8	8,2	8,4	8,7	8,4
BASALE	8,2	7,8	7,7	7,6	7,5	7,9	8,1	7,8	8	8,6	8,2
Moyenne D	7,66	7,88	7,7	7,48	7,36	7,64	8,04	7,92	8,56	8,6	8,48
Moyenne G	7,52	7,56	7,54	7,42	6,88	7,14	7,68	7,94	8	8,28	8,66

Chien 5	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J6,H+8	J7	J8	J9	J10
D1	7,1	7,3	7,4	7,1	7,1	7	7,1	7,4	7	7	7
D2	7,2	7,3	7,7	7,3	7,6	7,3	7,1	7,2	6,6	7,1	7,3
D3	6,8	7,5	7,2	7,2	6,7	7,4	7	7,2	6,8	7,1	6,9
D4	7,1	7,3	7,7	7,2	6,8	7,3	7	7,3	6,9	7,2	7,2
D5	6,5	7,1	7,3	7	6,8	6,8	7	7,4	6,8	7,4	7,3
G1	8,3	7,9	7,4	7,3	7,8	7,1	7,8	8,5	8,5	8,2	7,7
G2	8,2	7,6	7,4	5,5	6,4	6,6	6,7	7,6	8	8,3	7,6
G3	7,9	7,4	7,5	6,4	6,9	7,1	7,4	8	8,2	8,3	7,9
G4	7,7	7,3	7,4	6,4	6,6	6,8	6,9	7,8	7,6	7,9	6,6
G5	7	7,3	6,6	6,4	6,6	6,9	7	8	7,8	8,3	7,1
BASALE	7,2	7,9	7,5	7,8	7,2	7,7	7,7	7,6	7,2	7,6	7,2
Moyenne D	6,94	7,3	7,46	7,16	7	7,16	7,04	7,3	6,82	7,16	7,14
Moyenne G	7,82	7,5	7,26	6,4	6,86	6,9	7,16	7,98	8,02	8,2	7,38

ANNEXE 5 : EXTRAIT DE LA MATRICE ERGONOMIQUE UTILISEE POUR TRACER LES COURBES DANS R

temps	chien	produit	site	TEWL
0	a	1	1	43.8
8	a	1	1	48.2
24	a	1	1	27.1
48	a	1	1	14
72	a	1	1	9.4
96	a	1	1	8.3
0	a	1	2	49.8
8	a	1	2	31.1
24	a	1	2	14.6
48	a	1	2	9.6
72	a	1	2	6.5
96	a	1	2	6.2
0	a	1	3	38.3
8	a	1	3	29.5
24	a	1	3	17.8
48	a	1	3	10.2
72	a	1	3	6.1
96	a	1	3	5.4
[...]				
0	e	0	3	43.1
8	e	0	3	20.9
24	e	0	3	13.7
48	e	0	3	10.1
72	e	0	3	5.3
96	e	0	3	6.8
0	e	0	4	35.1
8	e	0	4	25.9
24	e	0	4	18.5
48	e	0	4	9.7
72	e	0	4	8.9
96	e	0	4	6.1
0	e	0	5	34.1
8	e	0	5	15.1
24	e	0	5	12.5
48	e	0	5	9
72	e	0	5	6.4
96	e	0	5	6.2

Temps : en heure, 0 correspondant à la dernière mesure effectuée avant la première application du produit, les chiffres suivants correspondant aux heures après cette première application.

Chien : a = chien1, b = chien 2, c = chien 3, d = chien 4 et e = chien 5.

Produit : présence de produit = 1, absence de produit = 0.

Site : le numéro affecté correspond au numéro du site.

TEWL : la valeur affectée correspond à la valeur du TEWL pour ce site à cette heure.

BIBLIOGRAPHIE

1. Baker BB, Maibach HI, Park RD: Epidermal cell renewal in the dog. *Am J Vet Res*, 1973; 34, 93-94.

2. Bashir SJ, Chew AL, Anigbogu A, Dreher F, Maibach HI : Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. *Skin Res Technol* , 2001 ; **7**, (1), 40-8.

3. Beco L, Fontaine J : Cornéométrie et perte d'eau transépidermique : validation des techniques chez des chiens sains. *Ann Med Vet*, 2000; 144, 329-33.

4. Bikle DD, Pillai S: Vitamin D, calcium, and epidermal differentiation. *Endocr Rev*, 1993; 14, 3-19.

5. Blank IH: Factors which influence the water content of the stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 1952; 18, (6), 433-40.

6. Brandner JM: Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009; 72, 289-94.

7. Breternitz M, Flach M, Prässler J, Elsner P, Fluhr JW: 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*, 2007; 156, (2), 231-40.

8. Candi E, Schmidt R, Melino G: The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005; 6:328-40.

9. Cohen JC, Hartman DG, Garofalo MJ, Basehoar A, Raynor B, Ashbrenner E: Comparison of closed chamber and open chamber evaporimetry. *Skin Res Technol*, 2009; 15, (1), 51-4.

10. Coulombe PA: The cellular and molecular biology of keratins: beginning a new era. *Curr Opin Cell Biol*, 1993; 5:17-29.

11. Cornegliani L, Vercelli A, Sala E, Marcella R: Transepidermal water loss in healthy and atopic dogs, treated and untreated: a comparative preliminary study. *Vet Dermatol*, 2012; 23: 41-4.

12. Dale BA: Filaggrin, the matrix protein of keratin. *Am J Dermatopathol*, 1985, 7:65-8.

13. Dale BA, Holbrook KA, Steinert PM: Assembly of *stratum corneum* basic protein and keratin filaments in macrofibrils. *Nature*, 1978; 276:729-31.

14. Darlenski R: Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009; 72: 295-303.

15. Denda M, Tsuchyiya T, Hosoi J, Koyama J: Immobilization-induced and crowded environment-induced stress delay barrier recovery in murine skin. *Br. J. Dermatol*, 1998; 138, (5), 780-5.

16. Denda M, Fuziwara S, Inoue K: Influx of calcium and chloride ions into epidermal keratinocytes regulates exocytosis of lamellar bodies and skin permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol*, 2003; 121: 362-7.

17. Denda M, Fuziwara S, Inoue K: Association of cyclic adenosine monophosphate with permeability barrier homeostasis of murine skin. *J Invest Dermatol*, 2004; 122, 140–6.

18. Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W: Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol*, 2008; 180:451-8.

19. De Paepe K, Houben E, Adam R, Wiesemann F, Rogiers V: Validation of the VapoMeter, a closed unventilated chamber system to assess transepidermal water loss vs. the open chamber Tewameter. *Skin Res Technol*, 2005; 11, (1), 61-9.

20. Downing DT: Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J Lipid Res*, 1992; 33: 301-13.

21. Eckert RL, Crish JF, Robinson NA: The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Rev*, 1997; 77:397-424.

22. Egberts F, Heinrich M, Jensen JM, Winoto-Morbach S, Pfeiffer S, Wickel M: Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation. *J Cell Sci*, 2004; 117:2295-307.

23. Ekanayake-Mudiyanselage S, Aschauer H, Schmook FP, Jensen JM, Meingassner JG, Proksch E: Expression of epidermal keratins and the cornified envelope protein involucrin is influenced by permeability barrier disruption. *J Invest Dermatol*, 1998; 111, (3), 517-23.

24. Elias PM, Ahn SK, Denda M, Brown BE, Crumrine D, Kimutai LK: Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. *J Invest Dermatol*, 2002; 119:1128-36.

25. Elias PM, Menon GK: Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res*, 1991; 24:1-26.

26. Farahmand S, Tien L, Hui X, Maibach HI: Measuring transepidermal water loss: a comparative in vivo study of condenser-chamber, unventilated-chamber and open-chamber systems. *Skin Res Technol*, 2009; 15, (4), 392-8.

27. Feingold KR: Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J Lipid Res*, 2007; 48, (12), 2531-46.

28. Feingold KR: The outer frontier: the importance of lipid metabolism in the skin. *J Lipid Res*, 2009; 50 Suppl, S417-22.

29. Feingold KR, Schmuth M, Elais PM: The regulation of permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol*, 2007; 127: 1574-6.

30. Fluhr JW, Dickel H, Kuss O, Weyher I, Diegpen TL, Berardesca E: Impact of anatomical location on barrier recovery, surface pH and stratum corneum hydration after acute barrier disruption. *Br J Dermatol*, 2002; 146, (5), 770-6.

31. Fluhr JW, Feingold KR, Elias PM: Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent in vivo and ex vivo models. *Exp Dermatol*, 2006; 15, (7), 483-92.

32. Fluhr JW: Les protéines antimicrobiennes : les effecteurs innés de la défense cutanée. *Keratin*, 2009; 15, 18-28.

33. Fuchs E, Weber K: Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*, 1994 ; 63:345-82.

34. Gabard B: Mesure de la perte insensible en eau. *Traité EMC: Cosmétologie et dermatologie esthétique*, 2000.

35. Gabard B, Barel AO: Dynamique de l'hydratation cutanée. *Traité EMC: Cosmétologie et dermatologie esthétique*, 2008.

36. Garrod DR, Merritt AJ, Nie Z: Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 2002; 14:537-45.

37. Garthwaite G, Lloyd DH, Thomsett LR: Location of immunoglobulins and complement (C) at the skin surface and within the skin of dogs. *J Comp Pathol*, 1983; 93,185-93.

38. Ghadially R, Brown BE, Sequeira-Martin SM, Feingold KR, Elias PM : The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J Clin Invest*, 1995; 95, (5), 2281-90.

39. Grubauer G, Elias PM, Feingold KR: Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function. *J Lipid Res*, 1989; 30, (3), 323-33.

40. Grubauer G, Feingold KR, Elias PM.: Relationship of epidermal lipogenesis to cutaneous barrier function. *J Lipid Res*, 1987; 28: 746-52.

41. Gu LH, Coulombe PA: Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. *Cur Opin Cell Biol*, 2007; 19:13-23.

42. Hachem JP, Crumrine D, Fluhr J, Brown BE, Feingold KR, Elias PM: pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and *stratum corneum* integrity/cohesion. *J Invest Dermatol*, 2003; 121:345-53.

43. Haftek M, Simon M, Kanitakis J, Marechal S, Claudy A, Serre G, *et al.* : Expression of corneodesmosin in the granular layer and stratum corneum of normal and diseased epidermis. *Br J Dermatol*, 1997; 137:864-73.

44. Harris IR: Permeability barrier disruption coordinately regulates mRNA levels for key enzymes of cholesterol, fatty acid, and ceramide synthesis in the epidermis. *J Invest Dermatol*, 1997; 109: 783-7.

45. Hester SL, Rees CA, Kennis RA, Zoran DL, Bigley KE, Wright AS, *et al.:* Evaluation of corneometry (skin hydration) and transepidermal water-loss measurements in two canine breeds. *J Nutr*, 2004; 134, (8 Suppl), 2110-3.

46. Hightower K, Marsella R, Flynn-Lurie A: Effect of age and allergen exposure on transepidermal water loss in a house dust mite-sensitized beagle model of atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, 2010; 21: 89-96.

47. Hirotani T, Manabe M, Ogawa H, Murayama K, Sugawara T: Isolation and characterization of horny cell membrane. *Arch Dermatol Res*, 1982; 274:169-77.

48. Hohl D, Aeschlimann D, Huber M: *In vitro* and rapid *in situ* transglutaminase assays for congenital ichtyoses - a comparative study. *J Invest Dermatol*, 1998; 110, 268-71.

49. Imhof RE: Closed-chamber transepidermal water loss measurement: microclimate, calibration and performance. *Int J Cosmet Sci*, 2009*;* 31: 97-118.

50. Jensen JM, Schutze S, Forl M, Kronke M, Proksch E: Roles for tumor necrosis factor receptor and sphingomyelinase in repairing the cutaneous permeability barrier. *J Clin Invest*, 1999; 104:1761-70.

51. Kalinin AE, Kajava AV, Steinert PM: Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays*, 2002; 24:789-800.

52. Kazumasa M, Yoshiki M: Tight junctions in the skin. *J Dermatol Sci*, 2003; 31: 81-9.

53. Katagiri C, Sato J, Nomura J, Denda M: Changes in environmental humidity affect the waterholding property of the stratum corneum and its free amino acid content, and the expression of filaggrin in the epidermis of hairless mice. *J Dermatol Sci*, 2003; 31:29-35.

54. Kirby NA, Hester SL, Bauer JE: Dietary fats and the skin and coat of dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 2007; 230, (11), 1641-4.

55. Kligman AM: The biology of the *stratum corneum*. *The epidermis*. New York, Montagna W., Lobitz W.C. Jr, 1964; 387-434.

56. Lademann J, Jacobi U, Surber C, Weighmann HJ, Fluhr JW: The tape stripping procedure evaluation of some critical parameters. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009; 72, (2), 317-23.

57. Lau-Gillard PJ, Hill PB, Chesney CJ, Budleigh C, Immonen A: Evaluation of a hand-held evaporimeter (VapoMeter) for the measurement of transepidermal water loss in healthy dogs. *Vet Dermatol*, 2010; 21, (2), 136-45.

58. Lee SH, Elias PM, Proksch E, Menon GK, Mao-Quiang M, Feingold K: Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. *J Clin Invest*, 1992; 89:530-8

59. Lee SH, Elias PM, Feingold KR, Mauro T: A role for ions in barrier recovery after acute perturbation. *J Invest Dermatol*, 1994 ; 102, 976-9.

60. Lever WF: Histopathologie de la peau. Masson, 1969; 754.

61. Lloyd DH, Garthwaite G: Epidermal structure and surface topography of canine skin. *Res Vet Sci*, 1982; 33, (1), 99-104.

62. Löffler H, Dreher F, Maibach HI: *Stratum corneum* adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal. *Br J Dermatol*, 2004; 151, (4), 746-52.

63. Lorand L, Graham RM: Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003; 4:140-56, 2003.

64. Lundstrom A, Serre G, Haftek M, Egelrud T: Evidence for a role of corneodesmosin, a protein which may serve to modify desmosomes during cornification, in stratum corneum cell cohesion and desquamation. *Arch Dermatol Res*, 1994; 286:369-75.

65. Machado M: Assessment of the variation of skin barrier function with anatomic site, age, gender and ethnicity. *Int J Cosmet Sci*, 2010; 32: 397-409.

66. Madison KC: Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J Invest Dermatol*, 2003; 121:231-41.

67. Madison KC, Swartzendruber DC, Wertz PW, Downing DT : Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 1987; 88:714-8.

68. Mao-Qiang M, Elias PM, Feingold KR: Fatty acids are required for epidermal permeability barrier function. *J Clin Invest*, 1993; 92, (2), 791-8.

69. Marchal T, Dezutter-Dambuyant C, Magnol JP, Fournel C, Schmitt D: CD18 Birbeck granule containing dendritic cells present in dog epidermis are equivalent of human epidermal Langherans cells. *Eur J Dermatol,* 1993; 3, 149-52.

70. Marks R: The *stratum corneum* barrier: the final frontier. *J Nutr,* 2004; 134, (8 Suppl), 2017S-21.

71. McGrath JA, Uitto J: The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. *Trends Mol Med,* 2007; 14: 20-7.

72. Menon GK, Feingold KR, Elias PM: Lamellar body secretory response to barrier disruption. *J Invest Dermatol,* 1992; 98:279-89.

73. Menon GK: Epidermal calcium gradient and regulation of barrier homeostasis. *J Dermatol Sci,* 1993; 6: 118.

74. Menon GK: New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev,* 2002; 54 Suppl 1, S3-17.

75. Meyer W, Neurand K: Comparison of skin pH in domesticated and laboratory mammals. *Arch Dermatol Res,* 1991; 283, (1), 16-8.

76. Mialot M: Histologie de la peau normale, *EMC Vet Dermatol*, 1994 ; Vol 2, 100.

77. Mizutani Y, Mitsutake S, Tsuji K, KiharaA, Igarashi Y: Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie,* 2009 ; 6:91, 784-90.

78. Muller GH, Kirk RW: Anatomie de la peau et Physiologie de la peau. *Dermatologie des petits animaux,* 1975; 19-61.

79. Nenoff P, Haustein UF: *In vitro* Activity of Phytosphingosines against *Malassezia furfur a*nd *Candida albicans. Acta Derm Venereol,* 2002 ; 82: 170–3.

80. NorlenL : Skin barrier formation: the membrane folding model. *J Invest Dermatol,* 2001; 117, (4), 823-9.

81. Nuutinen J, Alanen E, Autio P, Lahtinen MR, Harvima I, Lahtinen T: A closed unventilated chamber for the measurement of transepidermal water loss. *Skin Res Tech,* 2003; 9: 85-9.

82. Oh WS, Oh TH: Measurement of transepidermal water loss from clipped and unclipped anatomical sites on the dog. *Aust Vet,* 2009; 87, (10), 409-12. 96.

83. Ohmori K, Tanaka A, Makita Y, Takai M, Yoshinari Y, Matsuda H: Pilot evaluation of the efficacy of shampoo treatment with ultrapure soft water for canine pruritus. *Vet Dermatol,* 2010 ; 21, (5), 477-83.

84. Olivry T, Muller RS, Walder EJ, Atlee BA : Anatomie et physiologie microscopiques de la peau. *EMC Vet Dermatol*, 1994; 2, 200.

85. Olivry T, Wofford J, Paps JS, Dunston SM: *Stratum corneum* removal facilitates experimental sensitization to mite allergens in atopic dogs. *Vet Dermatol,* 2011; 22(2):188-96.

86. Onoue A, Kabashima K, Kobayashi M, Mori T, Tokura Y: Induction of eosinophil- and Th2-attracting epidermal chemokines and cutaneous late-phase reaction in tape-stripped skin. *Exp Dermatol,* 2009; 18, (12), 1036-43.

87. Oudshoorn MHM, Rissmann R, Van der Coelen D, Hennik WE, Ponec M, Bouwstra JA: Development of a murine model to evaluate the effect of vernix caseosa on skin barrier recovery. *Exp Dermatol,* 2009; 18, (2), 178-84.

88. Paterson S: Manual of skin diseases of the dog and the cat. Second edition, 2008; 1-4.

89. Perrin L: Etablissement d'un modèle canin de rupture chronique de la barrière cutanée, *Thèse vétérinaire,* 2011.

90. Piekutowska A, *et al*: Effects of a topically applied preparation of epidermal lipids on the *stratum corneum* barrier of atopic dogs. *J Comp Pathol,* 2008 ; 138: 197-203.

91. Pin D: Structure et fonction de la peau normale, *Cours dispensé à l'ENVL*

92. Pinkus H: 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,* 1951; 16, (6), 383-6.

93. Popa I, Thuy LH, Colsch B, Pin D, Gatto H, Haftek M, Portoukalian J.: Analysis of free and protein-bound ceramides by tape stripping of stratym corneum from dogs. *Arch Dermatol Res,* 2010; 302, 639-44.

94. Popa I, *et al*: Atopic dermatitis in dogs is associated with a high heterogeneity in the distribution of protein-bound lipids within the stratum corneum. *Arch Dermatol Res,* 2011; 303: 433-40.

95. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM: The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol,* 2008; 17:1063-72.

96. Rawlings AV, Matts PJ: *Stratum corneum* moisturization at the molecular level: an update in relation to the dry skin cycle. *J Invest Dermatol,* 2005; 124: 1099-110.

97. Rawlings AV: Skin biology, xerosis, barrier repair and measurement. *Drug Discov Today: Disease Mechanisms,* 2008; 5, 2.

98. Ruedisueli FL, Eastwood NJ, Gunn NK, Watson TDG: The measurement of skin pH in normal dogs of different breeds, *Advances in Vet Dermatol,* 1998; 3.

99. Saijonmaa-Koulumies LE et Lloyd DH: Colonization of the canine skin with bacteria. *Vet Dermatol,* 1996; 7, 153-62.

100. Sandilands A: Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci,* 2009; 122: 1285-94.

101. Schaffo A : Création d'un modèle de rupture aiguë de la barrière cutanée chez le chien et essai de quantification par la mesure de perte insensible en eau, *Thèse vétérinaire,* 2011.

102. Schwarz R, Le Roux JM, Schaller R, Neurand K: Micromorphology of the skin (epidermis, dermis, subcutis) of the dog. *Onderstepoort J Vet Res,* 1979; 46, (2), 105-9.

103. Scott DW, Miller WH, Griffin CE, Kirk RW, Muller GH: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology 6th edition, 2001.

104. Shimada K, Yoon J-S, Yoshihara T, Iwasaki T, Nishifuji K: Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of 97dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, 2009; 20, (5-6), 541-6.

105. Shimada K, Yoshihara T, Yamamoto M, Konno K, Momoi Y, Nishifuji K, *et al:* Transepidermal water loss (TEWL) reflects skin barrier function of dog. *J Vet Med Sci*, 2008; 70, (8), 841-3.

106. Stahl J, Niedorf F, Kietzmann M: Characterisation of epidermal lipid composition and skin morphology of animal skin *ex vivo*. *Europ J Pharm and Biopharm*, 2009; 72: 310-6.

107. Steinert PM, Marekov LN: Initiation of assembly of the cell envelope barrier structure of stratified squamous epithelia. *Mol Biol Cell*, 1999; 10:4247-61.

108. Sunwoo Y, Chou C, Takeshita J, Murakami M, Tochihara Y: Physiological and subjective responses to low relative humidity. *J Physiol Anthropol*, 2006; 25, (1), 7-14.

109. Tu C-L: The role of the calcium-sensing receptor in epidermal differentiation. *Cell Calcium*, 2004; 35: 265-73.

110. Thomsett LR: Structure of canine skin. *Br Vet J*, 1946; 142, (2), 116-23.

111. Vidal S, Mercier L, Soulard Y, Biourge V: Skin pH in healthy dogs from 21 breeds, Congrès annuel ECVD/ESVD, 2009.

112. Videmont E, Ghibaudo G, Pin D: Investigation of the efficacy of a moisturizer on the skin barrier recovery in a canine model of mechanical chronic barrier disruption. *Vet Dermatol*, 2011; 22: 462.

113. Videmont E, Mariani C, Vidal S, Pin D: Characterization of a canine model of skin barrier disruption and establishment of a correlation between TEWL and the degree of skin barrier disruption in the dog. *Vet Dermatol*, 2012; *DOI: 10.1111/j.1365-3164.2011.01019.x*.

114. Walter JH: Cytokeratins in the canine epidermis. *Vet. Dermatol*, 2001; 12, (2), 81-7.

115. Wang XP, Schunck M, Kallen KJ, Neumann C, Trautwein C, Rosejohn S, Proksch E: The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis. J *Invest Dermatol*, 2004; 123, 124-31.

116. Watson A, Fray T, Clarke S, Yates D, Markwell P: Reliable use of the ServoMed Evaporimeter EP-2 to assess transepidermal water loss in the canine. *J Nutr*, 2002; 132, (6 Suppl 2), 1661S-4S.

117. Webb AJ, Calhoun ML: The microscopic anatomy of the skin of mongrel dogs. *Am J Vet Res*, 1954; 15, 274-280.

118. Wickett RR, Visscher MO: Structure and function of the epidermal barrier. *Am J Infect Control*, 2006; 34: S98-S110.

119. Wiren K, Nohlgard C, Nyberg F, Holm L, Svensson M, Johannesson A, Wallberg A, Berne B, Edlund F, Lodén M: Treatment with a barrier-strengthening moisturizing cream delays relapse of atopic dermatitis: a prospective and randomized controlled clinical trial. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2009; 23: 1267-72.

120. Wood LC, Jackson SM, Elias PM, Grunfeld C, Feingold KR: Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. *J Clin Invest*, 1992; 90, (2), 482-7.

121. Wood LC, Elias PM, Calhoun C, Tsai JC, Grunfeld C, Feingold KR: Barrier Disruption Stimulates Interleukin-1_ expression and Release from a Pre- Formed Pool in Murine Epidermis. *J Invest Dermatol*, 1996; 106: 397-403.

122. Wong R: Analysis of RNA recovery and gene expression in the epidermis using non-invasive tape stripping. *J Dermatol Sci*, 2006; 44: 81-92.

123. Xie Z, Komuves L, Yu QC, Elalieh H, Ng DC, Leary C, *et al*.: Lack of the vitamin D receptor isassociated with reduced epidermal differentiation and hair follicle growth. *J Invest Dermatol*, 2002; 118:11-6.

124. Yang L, Mao-Qiang M, Taljebini M, Elias PM, Feingold KR: Topical *stratum corneum* lipids accelerate barrier repair after tape stripping, solvent treatment and some but not all types of detergent treatment. *Br J Dermatol*, 1995; 133, (5), 679-85.

125. Yoshihara T, Shimada K, Momoi Y, Konno K, IwasakiI T: A new method of measuring the transepidermal water loss (TEWL) of dog skin. *J Vet Med Sci*, 2007 ; 69, (3), 289-92.

Liens internet:

* Relatif au SK-influx V:

126. http://www.perelohomme.com.ar/Anexos/SK-influx.pdf

* Relatif à la phytosphingosine hydrochloride :

127.http://www.centerchem.com/PDFs/Phytosphingosine%20HCL%20Product%20Lit%200509.pdf

*Relatif à l'avénanthramide :

128. http://en.wikipedia.org/wiki/Avenanthramide

BECKRICH Marie

Evaluation de l'effet d'une lotion, DouxocalmND mousse MO, sur la réparation de la barrière cutanée dans un modèle de rupture chronique de la barrière cutanée chez le chien.

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon, *27 septembre 2012*

RESUME :

La peau est un organe complexe qui participe au maintien de l'homéostasie interne et est, donc, indispensable à la vie terrestre. Son rôle essentiel, celui de barrière, est principalement assuré par l'épiderme. De nombreux éléments peuvent provoquer une altération de la barrière cutanée ; c'est notamment le cas des affections chroniques de la peau, telle que la dermatite atopique. Pour favoriser la réparation de la barrière cutanée, l'application de topiques est une solution facile à mettre en œuvre et assez efficace. C'est dans ce contexte que le laboratoire Sogéval présente son nouveau produit, le DouxocalmND mousse MO.

Le but de cette étude est d'étudier les effets de cette lotion sur la réparation de la barrière cutanée. La première partie de la thèse est consacrée à la présentation des connaissances actuelles sur la barrière cutanée et la perte insensible en eau, ainsi que sur l'organisation des couches les plus superficielles de la peau, le derme et l'épiderme. Nous y abordons également les fonctions barrières de la peau, notamment la barrière hydrique, et la mesure de la perte insensible en eau. Enfin, nous terminons en présentant une méthode de rupture de la barrière cutanée, le tape-stripping, et les phases de la réparation de la barrière cutanée.

La seconde partie de la thèse est dédiée à l'étude expérimentale du produit, en particulier aux résultats et à la discussion.

Les résultats obtenus montrent que la lotion DouxocalmND, appliquée quotidiennement, favorise la réparation de la barrière cutanée d'une peau lésée et constitue une aide intéressante dans le traitement des affections chroniques cutanées, avec rupture de la barrière, chez le chien.

MOTS CLES :

- Peau
- Chien
- Médicaments dermatologiques
- Perméabilité
- Rupture

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur Frédéric BERARD
1er Assesseur :	Monsieur le Professeur Didier PIN
2ème Assesseur :	Monsieur le Professeur Thierry MARCHAL

DATE DE SOUTENANCE : 27 septembre 2012

ADRESSE DE L'AUTEUR :

413, avenue Bourgelat
E101
69280 Marcy l'Etoile