

Université de Montréal

Étude comparative sur l'occlusion microvasculaire et l'apoptose lors de la
guérison de plaies appendiculaires et thoraciques chez le cheval

par

Lepault Elodie

Département de biomédecine
Faculté de Médecine Vétérinaire

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
Maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option biomédecine

Avril, 2005

© Elodie Lepault, 2005



SF
607
U54
2005
v.019

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

LISTE DES COAUTEURS DE L'ARTICLE DU MÉMOIRE
D'ÉLODIE LEPAULT

Christophe Céleste

Monique Doré

Daniel Martineau

Christine Théorêt

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Lepault Elodie		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Biomédecine

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Lepault Elodie, Céleste Christophe, Doré Monique, Martineau Daniel et Théoret Christine	
Titre Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse.	
Revue Wound Repair and Regeneration	Date de publication Soumis pour publication

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
<i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Lepault Elodie inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse.</i>		
Coauteur Lepault Elodie	S [REDACTED]	Date 31-03-05
Coauteur Céleste Christophe	S [REDACTED]	Date 18-04-05
Coauteur Doré Monique	S [REDACTED]	Date 14-04-05
Coauteur Martineau Daniel	S [REDACTED]	Date 13-04-05
Coauteur Théoret Christine	S [REDACTED]	Date 13-04-05
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude comparative sur l'occlusion microvasculaire et l'apoptose lors de la
guérison de plaies appendiculaires et thoraciques chez le cheval

présenté par

Lepault Elodie

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel Jean, président-rapporteur

Christine Théoret, directeur de recherche

Daniel Martineau, codirecteur

Sheila Laverty, membre du jury

Résumé

La guérison de plaies appendiculaires, par seconde intention, chez le cheval est souvent accompagnée d'une fibroplasie excessive amenant à la formation d'un « bouton de chair ». Cette condition de cicatrisation ressemble aux chéloïdes et cicatrices hypertrophiques de l'homme. Le but de cette étude était de comparer l'occlusion des microvaisseaux et le processus apoptotique entre des plaies situées sur la partie appendiculaire des membres, développant ou non un bouton de chair, avec des plaies thoraciques, guérissant normalement.

Cinq plaies de 6,25 cm² ont été créées sur les deux membres antérieurs et sur le thorax de six chevaux. Un des membres a été laissé sous bandage de façon à stimuler une fibroplasie excessive. Des biopsies, réalisées chaque semaine durant six semaines, ont été évaluées grâce à l'histologie, l'immunohistochimie pour la présence de p53 mutant, la méthode TUNEL pour localiser et quantifier l'apoptose ainsi que la microscopie électronique pour mesurer le diamètre de la lumière des microvaisseaux.

Plusieurs phénomènes pouvant expliquer la mise en place du bouton de chair ont été mis en évidence : une phase inflammatoire retardée, une réépithélialisation lente et une désorganisation des fibroblastes, ce dans les plaies de jambes et plus particulièrement celles présentant une fibroplasie excessive. Une occlusion microvasculaire marquée ainsi qu'un processus apoptotique modifié pourraient aussi expliquer la formation du bouton de chair dans les plaies appendiculaires. Ces résultats devraient aider à la mise au point de traitements préventifs et curatifs contre cette forme de cicatrisation exubérante, rencontrée lors de guérison de plaies par seconde intention chez le cheval.

Mots-clés : Fibroplasie; cicatrisation; bouton de chair; cheval; occlusion des microvaisseaux; apoptose.

Abstract

Second intention wound repair in equine limbs is often complicated by exuberant granulation tissue, a condition characterized by excessive fibroplasia and scarring, and that resembles hypertrophic scars and keloids in man. The aim of this study was to compare microvascular occlusion and apoptosis in wounds of the limb with those of the body, which heal normally.

Five, 6,25cm² wounds were created on both forelimbs and on the thorax of six horses. One limb was bandaged to stimulate excessive fibroplasia. Weekly biopsies were evaluated histologically, immunohistochemically for mutant p53 protein, by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling to localize and quantify apoptosis, and by electron microscopy to measure microvessel luminal diameters.

Histology demonstrated protracted inflammation as well as sluggish epithelialization and deficient fibroblast orientation in limb wounds, particularly those with excessive fibroplasia. Microvessels were occluded significantly more often in limb wounds, and the balance of apoptotic signals was altered against apoptosis in the former, although this could not be confirmed quantitatively.

Data suggest that microvascular occlusion and deficient apoptosis may be involved in the excessive accumulation of extracellular matrix within limb wounds. This might provide a basis for the development of targeted therapies to prevent and treat excessive fibroplasia and extensive scarring in horses.

Key words: Fibroplasia; scarring; proud flesh; horse; microvascular occlusion; apoptosis

Table des matières

	Page
Page titre	i
Page d'identification du jury	ii
Résumé en français	iii
Résumé en anglais	iv
Tables des matières	v
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations	x
Remerciements	xii
Introduction	1
Recension de littérature	3
1. <u>Cicatrisation normale</u>	3
1.1. <u>Phase inflammatoire</u>	4
1.1.1. Plaquettes	4
1.1.2. Neutrophiles	5
1.1.3. Monocytes/macrophages	5
1.2. <u>Phase proliférative</u>	6
1.2.1. Réépithélialisation	7
1.2.2. Fibroplasie	8
1.2.3. Angiogénèse	9
1.2.4. Contraction	11
1.3. <u>Phase de remodelage</u>	12
2. <u>Apoptose</u>	14
2.1. <u>Rôle de l'apoptose dans la guérison de plaies</u>	14
2.2. <u>Les découvertes de l'apoptose</u>	14
2.3. <u>Déroulement de la phase apoptotique</u>	15
2.4. <u>Machinerie apoptotique</u>	16
2.4.1. Phase exécutive de l'apoptose	16

2.4.2.	Phase initiatrice de l'apoptose	17
2.4.2.1.	Voie intrinsèque mitochondriale	17
2.4.2.2.	Voie extrinsèque des récepteurs membranaires	18
2.4.3.	Régulation endogène de l'apoptose	18
2.4.3.1.	Bcl-2	19
2.4.3.2.	p53	19
	▪ Régulation de p53	20
	▪ Rôle de p53 dans l'apoptose	20
	▪ p53 mutant	21
2.5.	<u>Modifications morphologiques des cellules apoptotiques</u>	24
2.6.	<u>Techniques de révélation de l'apoptose</u>	25
2.6.1.	TUNEL	25
2.6.2.	Immunohistochimie (IHC)	26
3.	<u>Cicatrisation pathologique chez l'homme : le chéloïde</u>	26
3.1.	<u>Caractérisations</u>	27
3.1.1.	Déficiences en apoptose	27
3.1.2.	Occlusion des microvaisseaux	29
4.	<u>Cicatrisation pathologique chez le cheval</u>	30
4.1.	<u>Boutons de chair : état actuel des connaissances</u>	31
5.	<u>Objectifs et hypothèses</u>	34
	<u>Méthodologie</u>	35
1.	Chevaux	35
2.	Procédure chirurgicale	35
3.	Suivi post-opératoire	36
4.	Biopsie des plaies	36
5.	Traitement des échantillons	37
5.1.	Histologie	37
5.2.	Immunohistochimie	38
5.3.	Méthode TUNEL	40
5.4.	Microscopie électronique	41

6. Analyses statistiques	43
<u>Article</u>	45
1. Abstract	46
2. Abreviations	47
3. Introduction	48
4. Materials and methods	50
4.1. Horses	50
4.2. Surgical procedure	50
4.3. Biopsy samples	51
4.4. Histology	51
4.5. TEM for detection of microvascular occlusion	52
4.6. IHC for detection of mutant p53 protein	53
4.7. TUNEL for detection of apoptosis	54
4.8. Statistical analysis	54
5. Results	55
5.1. General	55
5.2. Histology	55
5.3. TEM (microvascular occlusion)	59
5.4. IHC (mutant p53 protein)	61
5.5. TUNEL (apoptosis)	65
6. Discussion	66
7. Acknowledgments	71
8. References	72
9. Figure legends	77
<u>Discussion générale</u>	79
<u>Conclusion</u>	87
<u>Bibliographie</u>	88

Listes des figures

	Page
Figure 1	3
Figure 2	15
Figure 3	20
Figure 4	21
Figure 5	23
Figure 6	24
Figure 7	43
 Article	
Figure 1A:	56
Figure 1B:	57
Figure 1C:	58
Figure 1D:	59
Figure 2:	60
Figure 3A:	60
Figure 3B:	61

three weeks postoperatively. Bar = 2 μ m.

- Figure 4A: Immunohistochemical localization of mutant p53 protein in epithelial cells of the *stratum basale* of new epithelium from an unbandaged limb wound one week postoperatively. Bar = 25 μ m. 62
- Figure 4B: Greater magnification of figure 4A. Bar = 10 μ m. 63
- Figure 4C: Nuclear staining for mutant p53 protein is absent in the new epithelium of a thoracic wound, one week postoperatively. Bar = 25 μ m. 64

Abréviations

α -SMA	alpha Smooth Muscle Actin (Actine-alpha des muscles lisses)
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique Messenger
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor (Facteur de croissance fibroblastique basique)
CASPASE	Cysteine Aspartate Specific ProteASE (Cystéine ASPartate protéASE)
DISC	Death-Inducing Signaling Complex (Complexe de signalisation induisant la mort)
fasL	fas Ligand (Ligand de fas)
IHC	ImmunoHistoChimie
IL-	InterLeukine-
IL-RA	InterLeukine-Receptor Antagonist (Récepteur antagoniste de l'interleukine)
iNOS	Inductible Nitric Oxide Synthase (Oxide nitrique synthase inductible)
JB	Jambe Bandée
JNB	Jambe Non Bandée
Mdm2	Murine Double Mutant 2
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MMP	Matrix MetalloProteinase (Métalloprotéinase de matrice)
NF κ B	Nuclear Factor κB (Facteur nucléaire κ B)
PA	Plasminogen Activator (Activateur de plasminogène)

PDGF	Platelet-Derived Growth Factor (Facteur de croissance dérivé des plaquettes)
T	Thorax
TBS	Tris-Buffer Saline (Tampon salin Tris)
TGF- β	Transforming Growth Factor-β (Facteur de croissance transformant- β)
TIMP	Tissue Inhibitor of MetalloProteinase (Inhibiteur de métalloprotéinase)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Facteur de nécrose des tumeurs)
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor (Récepteur des facteurs de nécrose des tumeurs)
TUNEL	TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase)-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling

Remerciements

« Il faut faire de la vie un rêve et d'un rêve une réalité »

Pierre Curie

Si les voyages consistent à regarder le monde avec des yeux nouveaux et non à s'improviser collectionneurs de souvenirs retraçant le périple de voyages effleurés, ils élargissent alors l'esprit, éveillent la tolérance, grandissent l'homme et enrichissent l'âme. Mes parents se sont attelés dès mon plus jeune âge à m'ouvrir grand les yeux en m'initiant au monde et aux cultures. Ce parcours initiatique, j'ai ensuite pu le poursuivre de mon propre chef grâce aux études supérieures, qui m'ont amené au Québec. La maîtrise en médecine vétérinaire était un choix, le dépôt de ce mémoire un objectif, alliant à la fois ma passion pour les chevaux et l'intérêt que je porte au monde de la recherche. Toutefois, la passion des voyages et la soif d'apprendre n'auraient pu suffire à mener seule ce projet. Pour arriver à mon but, il a fallu un soutien moral, financier, des discussions, des conseils pratiques, des échanges, des remises en question. De quelque nature que soit l'appui apporté par chacun, vous avez tous grandement contribué à l'aboutissement de ce projet, je tiens donc à vous remercier ici :

Mes remerciements les plus sincères au Dr Christine Théoret pour son encadrement d'exception, sa grande disponibilité ainsi que pour tous ses précieux conseils, autant professionnels que sur la vie en général. Merci surtout de m'avoir fait confiance jusqu'au bout pour terminer ce projet, tout en me permettant de reprendre la route. Des coïncidences de la vie nous offrent certaines opportunités que l'on n'a pas toujours la possibilité de pouvoir saisir. J'ai eu la chance d'être appuyée par une directrice de recherche très à l'écoute, très proche de ses étudiants, me permettant ainsi de saisir cette occasion et de retrouver le chemin du voyage tout en continuant à rédiger mon travail; j'alliais plaisir et découvertes.

Merci au Dr Daniel Martineau pour ses conseils quant à la validité de la méthode TUNEL et aussi pour ses échanges et réflexions plus philosophiques sur les voyages.

Merci aussi à Jo (Josiane Lefebvre-Lavoie) pour les bons moments partagés à l'écurie, ses conseils, nos discussions sur le monde des chevaux, les longues heures passées au laboratoire et sa participation pour la remise finale du manuscrit.

Je n'oublierai pas non plus le Dr Christophe Céleste pour sa contribution pratique au projet, Mira Dobias-Goff, Danielle Fontaine et le Dr Monique Doré pour leur patience lors des « quelques » mois passés sur l'immunohistochimie, Céline Lusignan-Lussier pour l'aspect pratique de la microscopie électronique, Marco Langlois pour son aide avec les photos, Guy Beauchamp pour ses précieux conseils au niveau des statistiques. Et un remerciement tout particulier à Micheline St-Germain pour son efficacité sans pareille dans toute la partie administrative et procédurière, sans qui ce dépôt à distance aurait été plus difficile.

Une pensée particulière pour Sylvain, mon compagnon de tous les jours, bohémien sage, d'une richesse infinie en gentillesse, conseils, écoute, partage. Un clin d'œil à Catherine Desrosiers; d'une conversation anodine, je me suis retrouvée avec, entre les mains, un permis de séjour et un billet d'avion pour le Québec; quelque part, c'est donc grâce à toi que j'ai passé six années formidables dans un pays qui me tient maintenant beaucoup à cœur. Merci aux amis de tous horizons qui ont finalement constitué notre petite « famille montréalaise » nous permettant de recréer un petit cocon loin de nos pays respectifs.

Un énorme merci à mes parents et à ma famille proche pour m'avoir apporté tout leur soutien autant affectif que matériel pour me permettre de réussir dans mes études et mes projets, pour m'avoir donné le goût d'apprendre à écouter le bruit du monde sans en altérer l'harmonie qui s'en dégage.

Un grand merci à vous tous !

Introduction

La guérison d'une plaie cutanée représente l'ensemble des processus de réparation et de régénération qui mènent à sa fermeture et à sa récupération fonctionnelle. La distinction entre réparation et régénération des tissus est importante, ces deux processus impliqués dans la guérison de plaies ne conférant pas les mêmes propriétés aux tissus nouvellement formés. En effet, l'épiderme guérit par régénération, c'est-à-dire qu'il récupère sa structure et ses fonctions originales, suite à la multiplication de cellules capables de se diviser mitotiquement. Le derme, incapable de se reconstituer par régénération, guérit par réparation: le tissu d'origine est remplacé par un tissu conjonctif fibreux non spécifique avec, comme résultat, la formation d'une cicatrice moins fonctionnelle, ne contenant pas tous les éléments différenciés du tissu originel.

Complexes, ces processus impliquent des populations cellulaires différentes, des compartiments cellulaires distincts (épiderme et derme), divers médiateurs et des interactions multiples entre tous ces éléments, le tout variant en fonction du temps. Trois phases principales décrivant ces processus complexes de guérison peuvent être décrites: phase inflammatoire, phase proliférative et phase de remodelage. Chacune de ces phases est caractérisée par des activités cellulaires spécifiques qui font progresser le processus de réparation selon des séquences chronologiques précises, mais imbriquées et dépendantes les unes des autres. Les principaux médiateurs sont les cytokines et facteurs de croissance libérés par les populations cellulaires en place lors de chaque phase et progressant tout le long de la guérison suivant une cascade bien précise.

Pour que la guérison soit réalisée de façon harmonieuse, il est important que chaque phase se termine dans un laps de temps défini afin de laisser la place à la phase suivante. La fin de chaque phase est caractérisée par une élimination successive des cellules effectrices de la phase précédente grâce à un programme de mort cellulaire non inflammatoire appelé apoptose. Ce phénomène est primordial à la guérison tissulaire harmonieuse.

Lorsque tous ces événements se réalisent comme décrit ci-dessus, la réparation d'une plaie aboutit à la formation d'une cicatrice normale. Cependant, certaines espèces, dont l'homme et le cheval, développent des formes anormales de cicatrices. Elles sont

caractérisées, notamment, par une fibroplasie excessive. Un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire (en faveur de la synthèse) constitue la caractéristique commune principale entre le « bouton de chair » du cheval et le chéloïde chez l'homme.

Chez le cheval, le bouton de chair résulte d'une production excessive de tissu de granulation entraînant un retard de contraction et de réépithélialisation, particulièrement sur les plaies situées sur la partie distale des membres. Ce problème de guérison revêt une importance de grande envergure en médecine vétérinaire étant donné les frais élevés encourus lors des traitements de plaies. Ainsi, l'impact financier de cette condition sur l'industrie équine représente le principal moteur des recherches effectuées dans ce domaine. Cependant, la plupart des études portent sur l'utilisation de médicaments et de bandages plutôt que sur la compréhension de la pathogenèse du bouton de chair.

Étant donné les similitudes observées entre les deux conditions, les nombreuses études réalisées sur le chéloïde humain servent de modèle pour nos prospections chez l'espèce équine. Les connaissances actuelles sur les chéloïdes font état d'une activité apoptotique diminuée dans les cicatrices pathologiques favorisant un retard dans la succession des phases et de là, un mauvais déroulement du processus de guérison et une accumulation aberrante de cellules (Ehrlich et coll., 1994). D'autre part, une occlusion accrue des microvaisseaux à l'intérieur des tissus chéloïdiens provoquerait une situation d'hypoxie et stimulerait une fibroplasie excessive (Kischer et Shetlar, 1979).

Le premier objectif de cette étude était de comparer l'apoptose survenant dans des tissus provenant de plaies guérissant normalement avec des échantillons provenant de plaies développant un bouton de chair. Le deuxième objectif était de comparer la lumière des microvaisseaux dans ces deux mêmes types de plaies chez le cheval.

Recension de littérature

1. Cicatrisation normale

La cicatrisation peut être définie comme le remplacement d'un tissu traumatisé par un tissu conjonctif fibreux. Il s'agit d'une réparation plutôt que d'une véritable régénération du tissu lésé. Ce phénomène ne peut être décrit comme une suite linéaire d'événements. En effet, la cicatrisation est plutôt représentée comme une intégration de nombreux processus dynamiques inter-reliés, impliquant des médiateurs solubles, des éléments du sang, une matrice extracellulaire (MEC) et des cellules parenchymateuses (Clark, 1996; Monaco et Lawrence, 2003; Werner et Grose, 2003).

La cicatrisation se divise généralement en trois phases majeures qui se chevauchent : phase inflammatoire, phase proliférative et phase de remodelage du tissu nouvellement formé. Chacune de ces phases est caractérisée par des activités cellulaires spécifiques qui font progresser le processus de réparation selon des séquences chronologiques précises, mais imbriquées les unes dans les autres. Chaque phase est contrôlée et régulée par des substances biologiquement actives, et chaque phase prend fin grâce à l'élimination successive des cellules effectrices par un processus de mort cellulaire nommé apoptose (Lindsay, 1990; Clark, 1996; Steed, 1997).

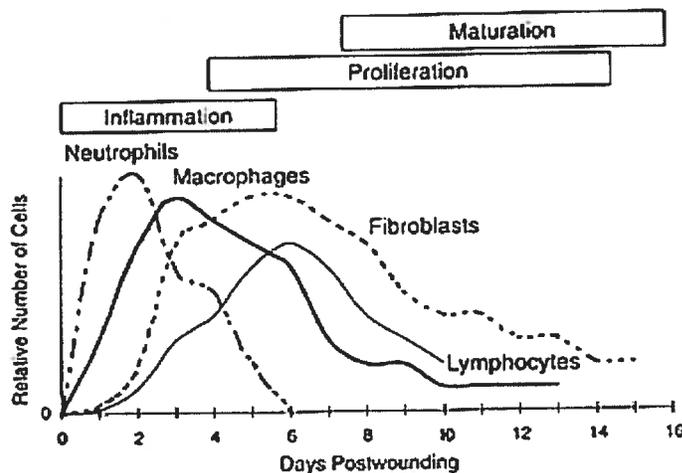


Figure 1: Les trois phases caractéristiques du processus de guérison (Witte et Barbul, 1997).

1.1. Phase Inflammatoire

Quelque soit la nature du trauma occasionné aux tissus (intervention chirurgicale, blessure, brûlure, infection bactérienne), la première phase de guérison est toujours inflammatoire. L'inflammation aiguë est caractérisée par des réponses cellulaires et vasculaires qui ont pour but d'éviter un saignement excessif mais aussi de prévenir l'invasion potentielle d'agents étrangers (Stashak, 1991). Différents acteurs sont mis en place lors de cette phase.

1.1.1. Plaquettes

L'hémostase se fait grâce à la formation d'un caillot composé majoritairement de fibrine; il s'agit de la coagulation. Les plaquettes adhèrent d'abord au tissu conjonctif interstitiel puis s'agglutinent. L'ensemble des produits relâchés durant le processus d'agglutination facilite la coagulation et permet une activation additionnelle d'autres plaquettes (Clark, 1996; Martin, 1997).

En plus de leur activité hémostatique, les plaquettes jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire. En effet, lorsqu'elles sont activées, leur dégranulation entraîne la libération, d'une part de facteurs chémotactiques, dont les cytokines; et d'autre part, de médiateurs vasoactifs. Les cytokines participent au recrutement des leucocytes au site de la plaie et activent aussi la migration des fibroblastes et des cellules endothéliales vers le lieu de la lésion (Borel et Maquart, 1998). Les médiateurs vasoactifs, quant à eux, agissent sur la perméabilité des vaisseaux sanguins pour faciliter la sortie des neutrophiles et des monocytes en direction du site inflammatoire, suite à l'activation du complément (Clark, 1996; Mutsaers et coll., 1997).

Le caillot ainsi formé constitue aussi une MEC « provisoire » favorisant la migration des cellules réparatrices mobilisées vers le lieu de la lésion (cellules inflammatoires, endothéliales, épithéliales, et fibroblastiques) (Clark, 1996).

Par la suite, le caillot de fibrine et l'exsudat inflammatoire se déshydratent pour devenir une masse inerte qui protège le lit de la plaie contre l'environnement externe ; la guérison progresse en dessous de cette croûte.

1.1.2. Neutrophiles

Les neutrophiles constituent la première ligne de défense lors d'une blessure, grâce à leur large distribution dans la circulation sanguine ainsi que par leur grande mobilité. Leur présence dans le site de la plaie se fait tout d'abord en réponse aux différents agents chimiotactiques émis par les plaquettes. Une production supplémentaire de cytokines a lieu suite au relâchement plaquettaire de ces médiateurs d'une part, et d'autre part suite au largage spécifique d'interleukine (IL)-1 par l'épiderme lésé (Moulin, 1995). Ces dernières cytokines favorisent l'entretien et l'amplification de la réponse inflammatoire grâce à leur action autocrine et/ou paracrine.

Au site inflammatoire, les neutrophiles phagocytent et détruisent les débris cellulaires et tissulaires grâce à leur sécrétion de protéases (enzymes hydrolytiques, collagénases, élastases), de lysosomes (pH acide, métabolites de l'oxygène, diverses enzymes) et de radicaux libres oxygénés (Clark, 1996).

En plus de leur action de débridement, les neutrophiles représentent une source de cytokines pro-inflammatoires tels IL-1, -6, -8, et -10, le facteur de nécrose des tumeurs- α (TNF- α) et le facteur transformant - β (TGF- β) (Cassatela, 1995, Théoret, 2001a).

La phase d'infiltration et d'action des neutrophiles a lieu généralement de 0 à 48 heures suivant le début de l'inflammation. Après deux jours, les neutrophiles ne sont plus utiles pour le débridement de la plaie, le relais est pris par les monocytes et macrophages (Clark, 1996). Une présence prolongée de neutrophiles au sein d'une plaie peut être dommageable étant donné leur action de clivage de la MEC, suite au largage de collagénases, telle la métalloprotéinase de matrice (MMP)-8 (Nwomeh et coll., 1998).

Bien que les neutrophiles soient importants lors de la phase initiale de l'inflammation, leur rôle dans le processus de réparation est minime car ils ne peuvent se diviser, leur durée de vie est courte et leur capacité de produire des cytokines est plus restreinte, comparativement aux monocytes et aux macrophages.

1.1.3. Monocytes / Macrophages

Après la disparition des neutrophiles par phagocytose ou apoptose, les macrophages sont les cellules inflammatoires majoritairement présentes dans la plaie. La

rupture des vaisseaux sanguins lors d'un trauma entraîne la libération d'éléments du plasma, la présence de fragments de collagène et de fibronectine, l'activation et l'agrégation plaquettaire, l'activation du complément, ainsi que la libération subséquente de cytokines, comme vu précédemment. Tous ces mécanismes représentent de puissants agents chimiotactiques pour les monocytes et les macrophages. Les cellules nouvellement en place amplifient elles-mêmes la réponse inflammatoire en produisant des chimiokines attirant un plus grand nombre de cellules inflammatoires. Il existe donc des cascades d'auto-amplification encourageant la présence de nombreux macrophages au site de la lésion (Riches, 1996; Heil et coll., 2000).

Les études classiques menées par Leibovitch et Ross (1975) ont permis de démontrer le rôle crucial des macrophages lors de la guérison. Ainsi, en plus d'assurer le débridement grâce à leurs capacités enzymatiques et phagocytaires, les macrophages jouent un rôle primordial dans la période suivant l'inflammation grâce à leur production importante de cytokines. Ces dernières influenceront la migration et la prolifération cellulaires et contrôleront la synthèse de la MEC (Johnston, 1988; Stashak, 1991; Riches, 1996).

L'inflammation représente donc une étape initiatrice lors de la guérison et entraîne une augmentation importante de populations variées de cellules. Cependant, afin de permettre la mise en place de la phase subséquente, les cellules inflammatoires ayant réalisé leurs travaux de débridement et de synthèse de cytokines doivent être éliminées du site de trauma. Ceci est accompli tout d'abord par la dissipation des stimuli inflammatoires, puis par l'enlèvement des cellules inflammatoires à proprement parler. L'apoptose, mort cellulaire programmée, représente le moyen le plus efficace pour éliminer ces cellules sans pour autant endommager les tissus environnants (Greenhalgh, 1998; Haslett et Henson, 1996).

1.2. Phase proliférative

La réparation d'une plaie passe par une phase de prolifération cellulaire qui permet la réépithélialisation, la mise en place du tissu de granulation pour combler la cavité créée par le trauma ainsi que la formation de nouveaux vaisseaux. Cette phase débute

généralement dans les douze heures suivant le trauma, au moment où la phase inflammatoire s'atténue; la plaie se réépithélialise en surface et le tissu de granulation se forme dans le compartiment sous-jacent. Les fibroblastes, de plus en plus nombreux, comblent la plaie en y déposant de la MEC immature, un phénomène appelé fibroplasie. De nouveaux capillaires sanguins bourgeonnent à partir des vaisseaux sanguins adjacents à la plaie (angiogénèse) afin d'irriguer le tissu nouvellement généré. Ces microvaisseaux donnent une apparence piquetée rougeâtre à la plaie, d'où l'expression « tissu de granulation » (Martin, 1997). La dimension de la plaie est ensuite réduite par le rapprochement de ses bords grâce à l'activité contractile des myofibroblastes (contraction).

1.2.1. Réépithélialisation

La réépithélialisation consiste en la régénération par les kératinocytes d'un épiderme qui recouvre la plaie et reforme une barrière protectrice contre l'environnement externe.

En marge de la plaie, les kératinocytes des couches épidermiques profondes commencent à migrer dans les premières vingt-quatre heures qui suivent le trauma. La migration est facilitée par la présence de protéines, comme la fibronectine, sur le lit de la plaie (Kim et coll., 1992; Grinnell, 1992). Grâce à la libération de diverses enzymes protéolytiques, les kératinocytes migrent sous les tissus déshydratés (caillot sanguin et tissus nécrosés) tout en demeurant en contact avec le derme viable (hydraté) recouvert ou non de fibrine (Laplante, 2002). La plage migratoire s'allonge donc entre le tissu sain, en bordure, et la partie nécrosée de la plaie.

Lorsque la plaie est recouverte par une monocouche de kératinocytes, la migration s'arrête par inhibition de contact et la prolifération cellulaire par mitose commence. Cette activité débute quelques heures post-trauma et atteint un maximum à quarante-huit heures dans le but de combler l'espace libéré par la migration cellulaire antérieure ainsi que de reconstituer l'épithélium stratifié (Stenn et Malhotra, 1992; Laplante, 2002).

Les kératinocytes, qui avaient adapté leur morphologie pour migrer, reprennent peu à peu un phénotype et une organisation stationnaires. Les cellules, encore immatures, présentent un arrangement irrégulier puis elles s'organisent progressivement

en couches; l'espace intercellulaire et l'épaisseur épidermique diminuent et la membrane basale se reforme (Krawczyk et Wilgram, 1973). Le caillot sanguin tombe, étant repoussé par des kératinocytes en desquamation, et expose à l'air libre un épiderme encore épais ne présentant pas encore des caractéristiques normales (absence d'annexes cutanées et de mélanine; force diminuée). Ces phénomènes, constituant l'étape de maturation lors de la réépithélialisation, sont relativement lents.

1.2.2. Fibroplasie

La fibroplasie consiste en la formation du tissu de granulation par des fibroblastes synthétiques. Ce tissu de granulation représente une matrice provisoire, dont le but est de combler l'espace laissé par un trauma. Cependant, une formation excessive de ce tissu retarde la cicatrisation car elle interfère avec la réépithélialisation et la contraction de la plaie (Clark, 1996; Bacon Miller et coll., 2000).

La formation du tissu de granulation intervient suite à l'activation des fibroblastes et des cellules endothéliales par les médiateurs libérés par les cellules inflammatoires. Cette étape dure environ une semaine à dix jours, et inclut la prolifération des fibroblastes, l'angiogénèse et la production de MEC (Clark, 1996).

Quarante-huit heures post-trauma, les fibroblastes adoptent un phénotype migratoire. Leur migration, tout comme celle du kératinocyte, est favorisée par la présence de récepteurs membranaires, notamment les intégrines, adaptés aux composants de la MEC (fibronectine, vitronectine, collagène). La migration et la prolifération des fibroblastes sont contrôlées par des cytokines produites par les plaquettes et les macrophages (Senet et coll., 1997).

Une fois dans la plaie, les fibroblastes changent de phénotype; de migratoires ils deviennent synthétiques. Cette métamorphose est induite par un environnement hypoxique ainsi que par la présence de nombreux facteurs de croissance, mais aussi par les fibroblastes eux-mêmes. La stimulation de la synthèse matricielle par le TGF- β est bien documentée. De surcroît, la production de collagène par les fibroblastes est auto-induite par ces derniers grâce à leur propre sécrétion de TGF- β et de facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (Kiritsy et coll., 1993).

La matrice temporaire nouvellement formée remplace progressivement le caillot de fibrine déposé lors de la phase inflammatoire (Clark, 1993). La fibronectine est déjà présente dans la plaie à partir du plasma, des cellules endothéliales endommagées et des macrophages, cependant les fibroblastes en synthétisent davantage et l'utiliseraient comme prototype pour le dépôt subséquent de collagène (Whalen et Zetter, 1992). Parmi les glycosaminoglycans déposés, l'acide hyaluronique prédomine au début de la fibroplasie. Produit par les fibroblastes, il faciliterait leur migration. Des protéoglycans (sulfates de chondroïtine et de dermatane) remplacent progressivement l'acide hyaluronique à partir de cinq à dix jours post-trauma; ces derniers inhiberaient la migration et la prolifération des fibroblastes, stimuleraient le dépôt de collagène et emmagasinerait des facteurs de croissance (Weitzhandler et Bernfield, 1992). Le collagène produit dans les premiers jours est surtout de type III (immature) puis, le ratio des collagènes de type I (mature)/III synthétisés retourne à la normale, c'est-à-dire environ 80/20 comme dans le derme intact (Miller et Gay, 1992).

Les différents composants de la MEC favorisent la migration des cellules nécessaires à la réparation tissulaire et servent également de réservoirs de facteurs de croissance (Senet et coll., 1997). Le TGF- β , en plus d'accroître la synthèse de collagène et de fibronectine par les fibroblastes, inhibe la dégradation de ces derniers en bloquant les MMPs et en stimulant la synthèse d'inhibiteurs tissulaires de ces protéinases (TIMP)s. Le résultat final est une accumulation importante de MEC dans la plaie. Un grand nombre de facteurs agissent donc de concert pour contrôler l'activité des fibroblastes (Moulin, 1995).

Un certain nombre de fibroblastes sont ensuite éliminés par apoptose. D'autres acquièrent un phénotype contractile et deviennent des myofibroblastes. L'interaction des fibroblastes avec la MEC pourrait aussi jouer un rôle dans le contrôle de l'apoptose (Desmoulière et coll., 1997).

1.2.3. Angiogénèse

Cette étape est traditionnellement placée dans la phase proliférative de la guérison car elle aboutit à la génération de nouveaux vaisseaux grâce à la prolifération des cellules endothéliales microvasculaires. Cependant, de nombreux signaux précurseurs

indispensables à l'angiogénèse interviennent durant la phase inflammatoire (Li et coll., 2003a).

Ce processus débute par une rupture de la liaison entre les cellules endothéliales microvasculaires et leur membrane basale. Il comprend une étape de migration et une étape de prolifération des cellules dans le stroma interstitiel local. Ceci aboutit à la formation de nouveaux vaisseaux ainsi qu'à leur stabilisation, et éventuellement une involution de ce lit vasculaire nouvellement formé, sans que les vaisseaux pré-existants ne soient affectés (Conway et coll., 2001; Cox, 2003).

La migration survient alors que disparaît l'inhibition de contact normalement présente entre cellules d'un vaisseau intact. Les enzymes protéolytiques relâchées par les cellules traumatisées dégradent les protéines de la MEC. Les fragments de fibronectine ainsi que d'autres produits issus de la dégradation de la matrice servent d'attractants pour les monocytes sanguins. Ces derniers, transformés en macrophages tissulaires activés, relâchent le facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF) qui stimule les cellules endothéliales à relâcher l'activateur de plasminogène (PA) et des procollagénases (Folkman et Shing, 1992). Le premier élément convertit le plasminogène en plasmine et les procollagénases activent les collagénases; ces molécules résultantes dégradent les constituants de la membrane basale. La fragmentation de celle-ci permet la migration des cellules endothéliales libérées vers le site de la plaie, en réponse aux bFGF, aux fragments de fibronectine et autres agents chimiotactiques (Clark, 1996; Madri et coll., 1996).

La phase de prolifération débute avec les cellules endothéliales du vaisseau original. Ce dernier assure ainsi une source continue de cellules pour l'angiogénèse. Le stimulus prolifératif est très semblable au stimulus migratoire.

La formation tubulaire durant le processus angiogénique implique des interactions intercellulaires et entre les cellules et la MEC. La formation de la lumière du tube dépend de la protéolyse induite par le bFGF; le contrôle du diamètre des vaisseaux nouvellement formés est assuré par l'action anti-protéolytique induite par TGF- β . Par la suite, les capillaires doivent être stabilisés par la synthèse d'une nouvelle membrane basale afin de devenir fonctionnels. Cette synthèse est assurée par les cellules endothéliales et stimulée par le TGF- β (Pepper et Montesano, 1990).

Les vaisseaux nouvellement formés permettent l'approvisionnement en oxygène et nutriments aux tissus en croissance. Ils participent aussi à la formation du tissu de granulation en procurant une voie d'entrée pour les cellules effectrices sur le site à réparer. L'angiogénèse représente donc un processus dynamique qui est hautement régulé par des signaux venant du sérum et de la MEC avoisinante (Li et coll., 2003b).

Une fois que la matrice provisoire est remplacée par un tissu cicatriciel riche en collagène, l'angiogénèse cesse et la plupart des capillaires nouvellement formés subissent une involution par apoptose des cellules endothéliales.

1.2.4. Contraction

Le rapprochement des bords de plaie se fait grâce au processus de contraction qui débute dix à quinze jours après le trauma. Suite aux phénotypes migratoire, prolifératif et synthétique, les fibroblastes adoptent un nouveau phénotype, dit contractile; ils prennent ainsi le nom de « myofibroblaste ». À ce stade de la guérison, les myofibroblastes forment l'élément cellulaire le plus abondant du tissu de granulation, où ils sont alignés le long des lignes de contraction, contrairement aux macrophages et aux capillaires, qui sont plutôt désorganisés.

Le myofibroblaste a été mis en évidence dans les années 1970 par Gabbiani et coll. au moyen de la microscopie électronique (Gabbiani et coll., 1972). Il s'agit d'une cellule ayant les caractéristiques à la fois d'un fibroblaste et d'une cellule musculaire lisse, d'où son nom. Le changement de phénotype et l'acquisition d'actine- α des muscles lisses (α -SMA), conférant les propriétés contractiles caractéristiques du myofibroblaste, sont influencés par divers facteurs de croissance, dont TGF- β , ainsi que par certains composants de la MEC (Desmoulière et coll., 2005).

En plus de ses capacités contractiles, le myofibroblaste préserve sa capacité de synthétiser des composants de la matrice extracellulaire, tels le collagène de type I et III (Gabbiani, 2003).

Dans une plaie ouverte, la peau connaît d'abord un mouvement de rétraction qui éloigne les bords de plaie. La contraction permet alors de réduire significativement la quantité de matrice conjonctive à déposer ainsi que la surface à réépithélialiser, après cette phase de rétraction. Le degré de contraction dépend de la profondeur de la plaie.

Elle peut réduire de 40 % la dimension des plaies de pleine épaisseur dont les annexes cutanées ont disparu, alors que les plaies d'épaisseur partielle contractent moins; elles se réépithélialisent plutôt par foyers multiples à partir des annexes cutanées restantes (Calvin, 1998).

Quand la contraction s'arrête et que la plaie est réépithélialisée, les myofibroblastes disparaissent de la cicatrice, soit en adoptant un phénotype quiescent ou en disparaissant par apoptose, comme élégamment décrit par Desmoulière et coll. (1995). La présence tardive de myofibroblastes suite à leur non élimination par apoptose est synonyme de guérison pathologique telle que survenant dans des lésions fibrotiques (Masur et coll., 1996; Nedelec et coll., 2000 ; Grotendorst et coll., 2004).

1.3. Phase de remodelage

Le remodelage représente la dernière phase du processus de réparation. Il peut s'étendre sur plusieurs années et concerne principalement la portion dermique de la cicatrice qui doit subir de multiples réarrangements afin d'accroître sa résistance mécanique, jusque là non acquise. Le tissu de granulation temporaire est remplacé par un tissu plus résistant et dont l'architecture s'apparente graduellement à celle du derme intact, sans pour autant lui ressembler complètement. À la toute fin de cette phase de remodelage, la cicatrice collagénique obtenue est acellulaire et avasculaire.

La première étape du remodelage consiste en la dégradation progressive de la MEC provisoire et, en parallèle, en la synthèse de nouveaux constituants afin d'en modifier la structure. La matrice déposée durant le processus de fibroplasia, initialement riche en collagène de type III, fibronectine et acide hyaluronique, est dégradée et remplacée par une matrice de collagène de type I et de protéoglycans. Afin d'accroître la résistance du tissu, les fibres de collagène se réorientent dans le sens des tensions cutanées; les fibroblastes alignés dans la même direction facilitent ce dépôt organisé de collagène (Calvin, 1998). L'augmentation du diamètre des fibres de collagène ainsi que leur compaction contribuent à améliorer la force tensile de la plaie (Cohen et coll., 1994; Mast, 1992). Tout au long du processus de remodelage, les fibrilles de collagène se polymérisent pour former de longues fibres, conférant une meilleure résistance à la cicatrice ainsi qu'une force tensile améliorée (Miller et Gay, 1992).

Toutefois, l'organisation de ce tissu en maturation demeure distinguable de celle du collagène dermique normal, ce qui explique que la peau ne retrouve pas sa résistance initiale. En effet, la résistance mécanique augmente rapidement jusqu'à trois mois, puis continue légèrement de croître jusqu'à un an, où elle atteint un plateau de 70 à 80 % de la résistance de la peau intacte (Clark, 1993; Calvin, 1998)

La deuxième étape de la phase de remodelage concerne la régression vasculaire. Certains microvaisseaux subissent une involution, leurs cellules endothéliales disparaissant par apoptose, alors que d'autres augmentent de diamètre pour devenir des artérioles ou des veinules afin de mieux répondre aux besoins métaboliques du tissu nouvellement formé (Calvin, 1998). La diminution progressive de la vascularisation entraîne une réduction de l'érythème de la plaie, qui adopte alors une apparence macroscopique blanchâtre.

La dernière étape du processus de remodelisation consiste en la réduction de la densité cellulaire. Les fibroblastes qui proliféraient et synthétisaient activement du collagène se retrouvent maintenant emprisonnés dans la MEC, certains éléments de cette dernière comme les fibrocytes vont encourager leur quiétude (Clark, 1993). La population de fibroblastes cesse non seulement de croître, mais elle diminue, grâce au mécanisme de l'apoptose (Moulin, 1995).

La caractéristique globale de cette phase de remodelage est marquée par une activité protéolytique importante suite à la production de protéinases variées par les cellules mésenchymateuses du tissu conjonctif. Ces protéinases sont régulées par des cytokines et certains éléments de la MEC afin de maintenir un équilibre étroit entre la synthèse et la dégradation des composants de cette dernière. Un mauvais équilibre de la production des protéinases peut être à la base de la formation de plaies chroniques, ou à l'inverse, d'une fibrose excessive (Mignatti et coll., 1996).

Bien que le travail effectué par les acteurs de la phase de remodelage soit nécessaire, le plus gros reste cependant réalisé par l'apoptose qui débarrasse le site de la plaie des populations cellulaires surnuméraires ou ectopiques.

2. Apoptose

2.1. Rôle de l'apoptose dans la guérison de plaies

Étant donné le rôle primordial joué par l'apoptose tout au long du processus de guérison, il est important de le comprendre dans son ensemble. Il permet en effet de clore chacune des trois phases en éliminant de la plaie de nombreuses cellules périmées et ainsi d'harmoniser l'essor de la phase subséquente. Cette mort cellulaire programmée génétiquement diffère de la nécrose puisqu'elle s'effectue sans causer de réaction inflammatoire dommageable aux tissus environnants (Greenhalgh, 1998).

Greenhalgh, en 1998, a montré que le tissu recouvrant la plaie, soit le nouvel épithélium, soit un tissu greffé, semble être l'élément déclencheur de l'expression des signaux d'apoptose. En effet, il a été constaté cliniquement qu'une plaie demeurant ouverte sera perpétuellement enflammée alors que les cellules inflammatoires disparaissent dès que la plaie est recouverte par une nouvelle surface épithéliale. Les kératinocytes constituant la nouvelle couverture épithéliale jouent un rôle important dans le bon déroulement du processus de guérison. Lors d'expérience *in vitro*, ils influencent l'expression génique des fibroblastes sous-jacents en orientant leur production de cytokines de façon à procéder au mieux à la réparation de la lésion (Nowinski, et coll., 2004). Les grands brûlés ont tendance à développer des cicatrices pathologiques lors du processus de guérison, car ils sont exempts de couverture épithéliale.

2.2. Les découvertes de l'apoptose

Le concept de mort cellulaire programmée a été introduit par Kerr et coll. en 1972 comme une séquence d'altérations morphologiques permettant l'élimination des cellules surnuméraires, dysfonctionnelles ou ectopiques. La définition uniquement morphologique de l'apoptose a été remise en question après les études pionnières de Horvitz (1999) sur le développement du nématode *Caenorhabditis elegans*. Son approche novatrice a permis d'identifier l'existence d'un programme moléculaire, présent de façon constitutive dans la cellule, permettant aux cellules de déclencher leur mort (Kasof et coll., 1999; Ranger et coll., 2001). Les connaissances de base acquises

chez le nématode ont ensuite pu être transférées et adaptées aux processus plus complexes se déroulant chez les mammifères.

2.3. Déroulement de la phase apoptotique

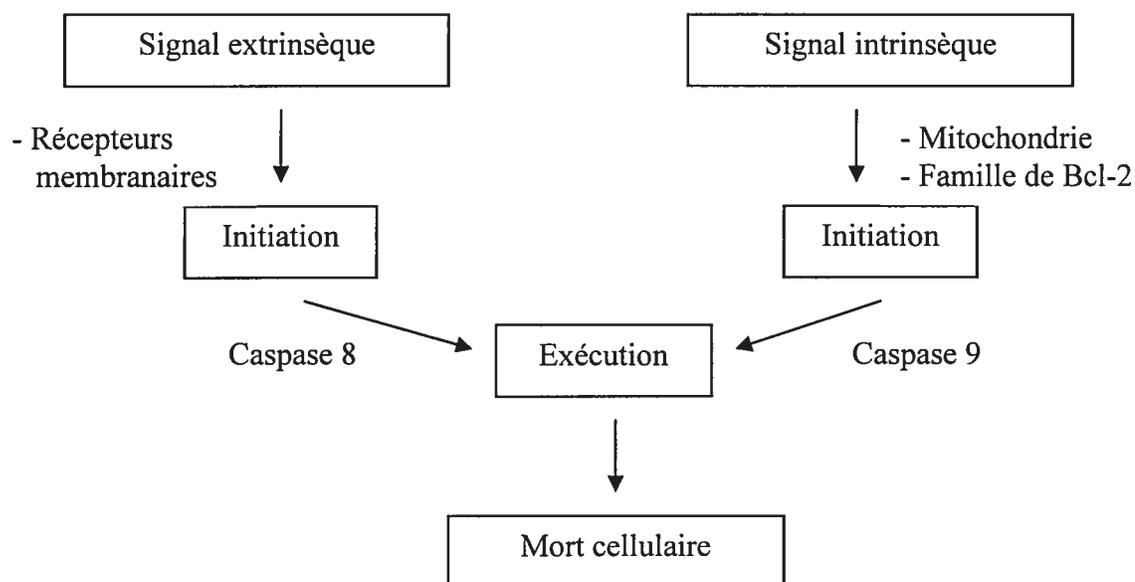


Figure 2 : Deux voies principales d'initiation du processus apoptotique amenant à la voie d'exécution puis à la mort cellulaire.

La mort apoptotique résulte de la transduction d'un signal provenant de la surface cellulaire et entraînant des changements subséquents dans l'expression des gènes contrôlant l'apoptose ou dans l'activation/inactivation de protéines déjà présentes à l'intérieur de la cellule et ayant un rôle dans l'apoptose. Il s'agit d'une multitude d'étapes toutes inter-reliées et hautement régulées (Evans, 1993 ; Kam et Ferch, 2000; Ashe et Berry, 2003).

Le processus apoptotique peut être modélisé en trois étapes :

- Initiation, qui peut se faire par des voies afférentes à la cellule très diverses.
- Régulation ou phase de décision confrontant des mécanismes pro et anti-apoptotiques : l'équilibre entre les deux aboutit ou non à la mort de la cellule.

- Dégradation ou phase d'exécution, commune à toutes les formes d'initiation de l'apoptose.

Afin de mieux comprendre ce phénomène complexe dans son ensemble, l'apoptose sera expliquée en prenant la cascade d'évènements à l'envers. La phase d'exécution, commune à toutes cellules en apoptose, sera d'abord expliquée puis ensuite les mécanismes d'initiation et de régulation seront détaillés.

2.4. Machinerie apoptotique

2.4.1. Phase exécutive de l'apoptose

Pour comprendre le mode d'action de l'apoptose au niveau moléculaire, il faut d'abord regarder les éléments principaux ou acteurs du processus d'apoptose en tant que tels. Il s'agit d'un système protéolytique représenté par les membres de la famille des caspases, ou protéases à cystéine (Cysteine Aspartate Specific ProteASEs) (Thornberry et Lazebnik, 1998; Nicholson, 1999; Shi, 2002).

Les caspases sont synthétisées comme protéases cytosoliques inactives, zymogènes ayant une activité enzymatique intrinsèque très faible (Strasser et coll., 2000). Pour les activer, il est nécessaire qu'elles reçoivent une stimulation apoptotique antérieure (discutée plus tard, dans la phase initiatrice de l'apoptose) (Nicholson, 1999; Shi, 2002).

Elles possèdent un double rôle : rôle initiateur en préparant le désassemblage des cellules et rôle effecteur de désassembleur de cellules en s'attaquant à des cibles bien précises, ceci en réponse aux facteurs pro-apoptotiques. Le clivage de ces différentes protéines entraîne ainsi la mort cellulaire (Cohen, 1997; O'Connor et Strasser, 1998; Earnshaw et coll., 1999; Nicholson, 1999).

Pour remplir ces deux rôles, il existe donc deux catégories de caspases : les caspases initiatrices et les caspases effectrices (Earnshaw et coll., 1999; Nicholson, 1999). Les caspases initiatrices sont capables de s'auto-activer, ou bien de s'activer entre elles (Martin et coll., 1998; Muzio et coll., 1998). Une fois activées, elles vont à leur tour activer les caspases effectrices, qui amplifient ainsi le signal apoptotique. Ces dernières constituent donc le moteur de l'apoptose; elles clivent les substrats (des

protéines cellulaires) et provoquent le démantèlement des cellules, caractéristique de l'apoptose (Nicholson, 1999; Utz et Anderson, 2000; Borner, 2003).

2.4.2. Phase initiatrice de l'apoptose

Deux grandes voies moléculaires d'induction aboutissant à la mise en route de la machinerie apoptotique peuvent être décrites. La voie d'activation intrinsèque fait suite à des perturbations au niveau de la mitochondrie provoquant le relargage de protéines mitochondriales dans le cytosol (Ashe et Berry, 2003). La voie d'activation extrinsèque, quant à elle, est initiée par la liaison, au niveau de la membrane plasmique, d'un signal à un récepteur de mort cellulaire, lui conférant ainsi le nom de « death receptor pathway ». Ces deux voies distinctes d'initiation permettent l'amplification du signal apoptotique et la mise en marche ultérieure de la machinerie apoptotique via les caspases.

2.4.2.1. Voie intrinsèque mitochondriale

Des études récentes ont permis de montrer que le rôle de la mitochondrie n'est plus cantonné à la seule fonction de production d'acide triphosphate (ATP) au sein de la cellule. Elle est aujourd'hui reconnue comme un acteur important dans la régulation moléculaire de la mort cellulaire. Cette voie d'induction fait suite à des stimuli très variés reçus par la cellule (par exemple, dommages à l'ADN, anoxie, agents cytotoxiques ou encore déprivation en cytokines). Il s'ensuit une augmentation de la perméabilité des membranes mitochondriales ainsi qu'une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial. Cette perméabilisation des membranes mitochondriales permet le passage de protéines pro-apoptotiques depuis l'espace inter-membranaire de la mitochondrie vers le cytoplasme (Parone et coll., 2002). L'ouverture des pores mitochondriaux serait possible grâce à la présence de Bax et/ou Bid, éléments pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Jacotot et coll., 1999; Crompton, 2000; Eskes et coll., 2000; Sharpe et coll., 2004).

Les protéines mitochondriales ainsi libérées forment un complexe multiprotéique puis celui-ci se lie à la forme zymogène de la caspase-9 pour former un complexe appelé

apoptosome. L'apoptosome va alors cliver les caspases sous forme zymogène et les rendre actives. Celles-ci activeront à leur tour d'autres caspases afin d'aboutir à la mort cellulaire (Zou et coll., 1999).

2.4.2.2. Voie extrinsèque des récepteurs membranaires

La deuxième voie d'initiation du processus apoptotique prend naissance avec la stimulation de nombreux récepteurs de mort cellulaire, situés à la surface de la membrane plasmique (par exemple Fas et son ligand fasL). Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs aux TNFs (TNFR). Dans cette famille, certains récepteurs sont pro-apoptotiques, d'autres sont anti-apoptotiques. Le rôle pro- ou anti-apoptotique, faisant suite à l'activation de ces récepteurs, va alors dépendre des protéines leur étant associées. Cette balance fine permet d'ajuster au mieux la réponse cellulaire subséquente d'après les signaux apoptotiques perçus (Itoh et coll., 1991).

Le processus débute avec le recrutement du signal apoptotique, au niveau de la membrane plasmique, puis se poursuit par une succession d'associations de protéines aboutissant à la formation d'un complexe multiprotéique appelé le death-inducing signaling complex (DISC). L'assimilation des pro-caspases initiatrices dans le DISC entraîne leur clivage réciproque et la libération des formes activées de ces pro-caspases dans le cytosol. Elles vont à leur tour cliver un certain nombre de caspases effectrices pour permettre l'apoptose (Peter et coll., 1997; Bobé, 2002).

2.4.3. Régulation endogène de l'apoptose

L'apoptose est, comme tous les processus biologiques et moléculaires, soumis à d'importantes régulations qui interviennent pour contrôler de façon positive ou négative la mort cellulaire.

Pour chacune des deux voies moléculaires citées précédemment (voie mitochondriale et voie du récepteur) aboutissant à la mort de la cellule, la régulation de l'apoptose se fait grâce à l'intégration de signaux d'apoptose au niveau des complexes multiprotéiques (respectivement l'apoptosome et le DISC). Ces signaux peuvent être très

nombreux, une attention plus particulière sera portée sur p53, qui est utilisé pour la présente étude.

2.4.3.1. Bcl-2

Les protéines de la famille de Bcl-2 jouent un rôle important dans la régulation de la mort cellulaire programmée, de façon positive ou négative. En effet, certaines sont pro-apoptotiques, comme Bax, Bak, Bad, Bim et Bid, et favorisent l'apoptose, alors que d'autres, notamment Bcl-2 et Bcl-xL, sont anti-apoptotiques. Les niveaux relatifs des protéines pro- et anti-apoptotiques déterminent la sensibilité de la cellule à un stimulus de nature apoptotique. Les deux types de protéines sont requis pour un développement cellulaire équilibré et pour assurer l'homéostasie (Pellegrini et Strasser, 1999; Guo et coll., 2001; Borner, 2003).

Les membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 faciliteraient la libération des protéines pro-apoptotiques de la mitochondrie en favorisant l'ouverture des pores mitochondriaux. Ainsi l'apoptosome se formerait et donnerait suite à l'activation ultérieure des caspases (Sitailo et coll., 2004; Twiddy et coll., 2004). Les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, quant à eux, interagiraient et inhiberaient les protéines pro-apoptotiques empêchant ainsi l'ouverture des pores mitochondriaux. Ainsi, l'apoptosome ne se formerait pas et la suite de la cascade des caspases ne pourrait avoir lieu (Li et coll., 1997; Adams et Cory, 1998; Ashe et Berry, 2003; Danial et Korsmeyer, 2004; Jiang et Wang, 2004).

2.4.3.2. p53

La protéine p53, dans sa forme sauvage, joue un rôle important dans la réponse cellulaire contre le stress, à titre d'agent oncosuppressif. Le déclenchement de la voie apoptotique via p53 est favorisé par des stimuli intracellulaires, comme par exemple, la fixation d'ADN endommagé à la protéine p53. En effet, celle-ci possède un domaine spécialisé dans la reconnaissance de l'ADN.

Son action dans le processus apoptotique n'est pas directe; il agit comme intermédiaire en stimulant l'expression des gènes pro-apoptotiques de la famille de Bcl-

2 (Choisy-Rossi et coll., 1998; Snustad et Simmons, 1999). L'action de p53 oriente l'activité transcriptionnelle vers plusieurs possibilités: un arrêt du cycle cellulaire permettant la réparation de l'ADN ou la mort cellulaire, et ce, en fonction de l'état des cellules en cause. Il est appelé « gardien de l'intégrité cellulaire ».

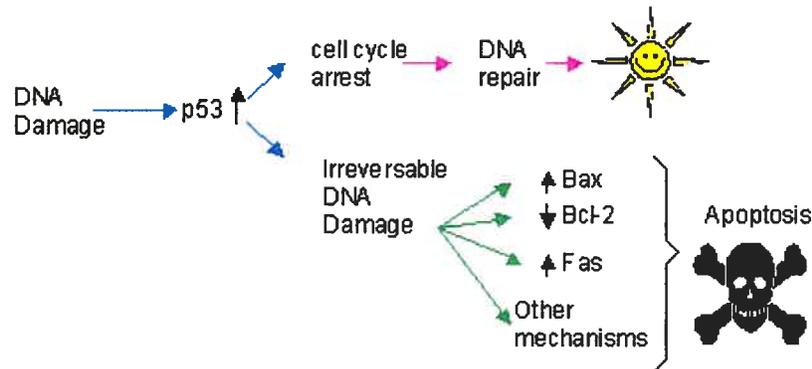


Figure 3 : Rôle de p53 dans le maintien de l'intégrité cellulaire. Source : <http://www.portfolio.mvm.ed.ac.uk/studentwebs/session2/group28/p53.html>

▪ Régulation de p53

Dans des conditions normales (cellules non stressées), la protéine p53 est inactive. Elle est maintenue à un niveau basal très faible par son association avec l'oncoprotéine murine double mutant 2 (Mdm2), qui provoque son transport depuis le noyau vers le cytoplasme et sa dégradation ultérieure par la voie ubiquitine/protéasome. La présence de p53 active l'expression de Mdm2 afin de maintenir ce niveau basal très faible. Cependant, suite à une lésion de l'ADN, la liaison entre Mdm2 et p53 est diminuée suite à sa phosphorylation et une augmentation de la quantité de p53 libre se produit suite à sa dissociation de Mdm2 (Oliner et coll., 1993).

▪ Rôle de p53 dans l'apoptose

Si les lésions sur l'ADN sont trop importantes et les réparations insuffisantes, la protéine p53 provoque l'élimination apoptotique de la cellule en inhibant l'action anti-apoptotique de Bcl-2 par le biais de la transcription augmentée du gène Bax. Ce dernier permet alors l'ouverture des pores mitochondriaux, et l'apoptose emprunte la voie

« intrinsèque » d'initiation. p53 n'intervient pas dans la voie dite « extrinsèque » d'activation (Choisy-Rossi et coll., 1998; Snustad et Simmons, 1999; Sionov et Haupt, 1999).

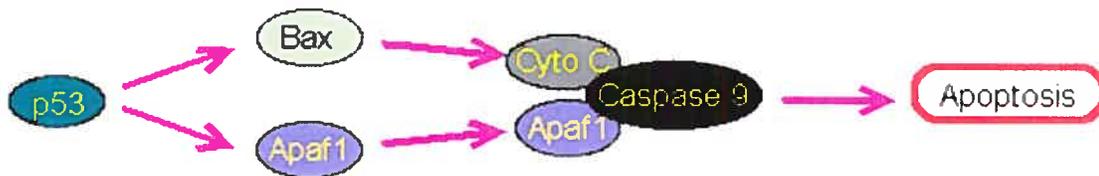


Figure 4 : Rôle de p53 dans l'apoptose.

p53 induit l'expression de Bax, qui inhibe l'action de Bcl-2. Bax et Apaf1 se lient, forment l'apoptosome, activent la caspase-9; l'apoptose a lieu.

Source : <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch4Hp53.htm>

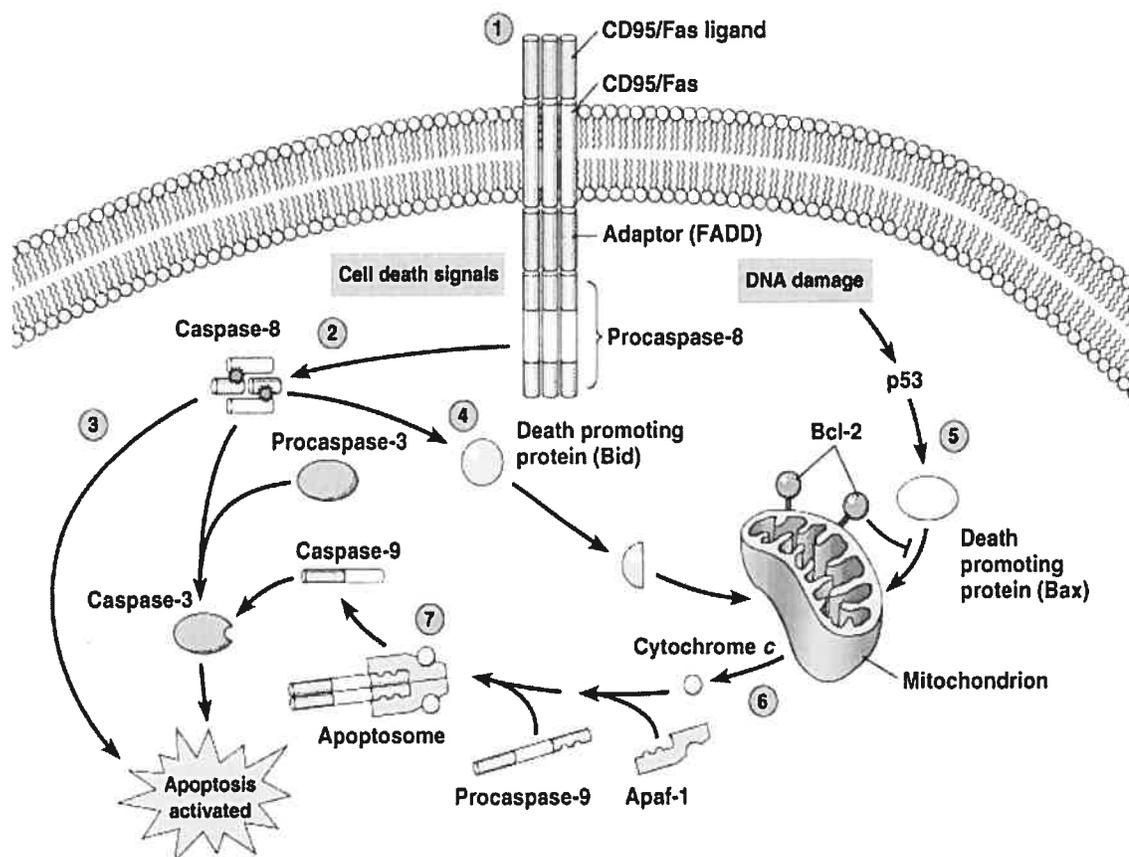
Récemment, Erster et Moll (2004) ont découvert une action plus directe des protéines p53 sur la mitochondrie. C'est une action rapide car il n'est pas question ici d'activité transcriptionnelle, donc pas d'intermédiaire. En réponse à différents stimuli de stress, une fraction de p53 de type sauvage serait envoyée directement vers la mitochondrie. À ce moment, p53 aurait une action physique directe en bloquant l'action anti-apoptotique de Bcl-2 et Bcl-xL et activerait la polymérisation de Bax, permettant un relâchement rapide des protéines pro-apoptotiques vers le cytoplasme. L'apoptose serait donc plus vite déclenchée.

- p53 mutant

Des mutations subies au niveau du gène codant pour la protéine p53 permettront une accumulation de cette protéine, mais elle sera non fonctionnelle, et n'entraînera donc pas la cellule vers l'apoptose. Ceci constitue l'anomalie génique la plus courante retrouvée dans les tumeurs chez l'homme. Ces mutations permettent aux cellules tumorales de franchir le cap G1 de l'interphase lors de la mitose, sans avoir corrigé les lésions de l'ADN (Snustad et Simmons, 1999).

Les protéines p53 mutées sont fréquemment retrouvées dans les cellules tumorales à des niveaux cellulaires élevés du fait d'un rallongement de leur demie-vie (5 à 10

heures au lieu de 6 à 20 minutes dans sa forme sauvage) (Gannon et coll., 1990). Cette augmentation de la demie-vie de la forme mutée de p53 permet sa détection grâce à l'immunohistochimie (IHC); dans la forme sauvage, p53 est en trop faible quantité pour être détectée dans des cellules non mutantes à cause de sa courte demie-vie (Blagosklonny, 1997; Slade et Moll, 2003).



Copyright © 2003 Pearson Education, Inc. publishing as Benjamin Cummings.

Figure 5 : L'apoptose en résumé.

Source : <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CellBiol10/1028.JPG>

2.5. Modifications morphologiques des cellules apoptotiques

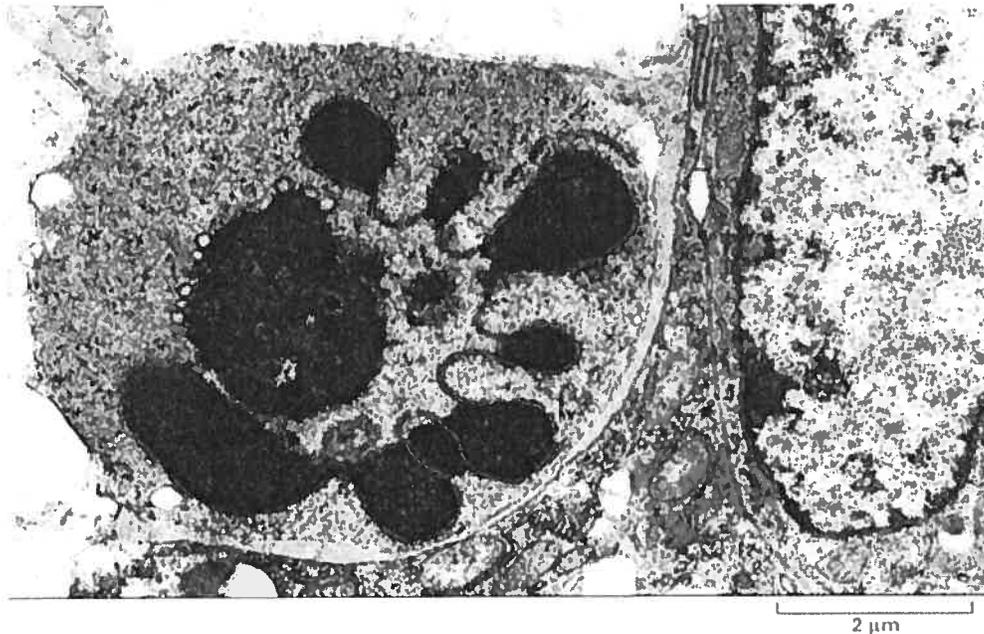


Figure 6 : Photomicrographie d'une cellule apoptotique. La caractéristique principale de l'apoptose est la condensation de la chromatine, comme le montre cette photo.

Source : <http://www.zum.de/Faecher/Materialien/hupfeld/index.htm?Faecher/Materialien/hupfeld/Cytologie/Apoptose/apoptose.html>

En plus des considérations moléculaires, l'apoptose se manifeste par des changements morphologiques observables de façon évidente à la microscopie électronique. Ces changements interviennent aussi bien au niveau de la membrane, que du cytoplasme et du noyau. L'apoptose concerne généralement quelques cellules isolées, à la différence de la nécrose qui porte sur un ensemble de cellules voisines (Studzinski, 2001).

Au début, les cellules s'isolent, perdent leur desmosome; leur surface devient lisse. Puis, elles se rétractent et le volume cellulaire diminue, avec un regroupement des organites. Ces derniers conservent cependant leur intégrité, contrairement à ce qui se produit lors de nécrose. Du fait de la diminution de volume, la membrane cellulaire prend un aspect fripé; la cellule a une surface convolutive. Le noyau devient ensuite très dense reflétant une compaction et une marginalisation de la chromatine nucléaire, il

s'ensuit une convulsion des membranes nucléaire et cytoplasmique. L'ADN se fragmente alors de façon régulière. L'enveloppe nucléaire disparaît et le cytoplasme se divise en vésicules contenant des morceaux du noyau et des organites cellulaires intacts. Ces vésicules forment les corps apoptotiques. Ils sont dispersés, sans se rompre, dans la MEC et phagocytés par les cellules voisines. Les cellules phagocytaires responsables de cette tâche sont surtout les macrophages; les neutrophiles n'interviennent pas (Studzinski, 2001). Comme le contenu vésiculaire n'est pas libéré dans le milieu extracellulaire, l'apoptose se déroule sans inflammation.

2.6. Techniques de révélation de l'apoptose

Toutes les caractéristiques morphologiques décrites précédemment (condensation de la chromatine, formation et phagocytose des corps apoptotiques) sont des processus tellement rapides que la microscopie ne se révèle pas la meilleure technique pour observer ce phénomène. Ainsi, des techniques de marquage, autre que la simple observation de la morphologie des cellules, ont été développées afin d'identifier les cellules subissant l'apoptose.

2.6.1. Méthode TUNEL

La méthode TUNEL est une application de la biologie moléculaire permettant de repérer *in situ* les coupures d'ADN survenant lors d'apoptose. Le terme TUNEL vient de TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase)-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling. L'utilisation de la déoxynucléotidyltransférase (enzyme TdT) permet d'ajouter des désoxyribonucléotides aux extrémités 3'-OH de l'ADN fragmenté. Un système de révélation associé à ces nucléotides (par exemple, déoxyuridine biotinylée mise en évidence par un complexe avidine-peroxydase) est utilisé afin de localiser les fragments d'ADN marqués sur des cultures cellulaires, des échantillons congelés ou des échantillons fixés en paraffine (Heatwole, 1999; Wilson et Potten, 2001; Walker et Quirke, 2001).

Cette méthode permet de détecter les cellules apoptotiques avant qu'elles deviennent des corps apoptotiques. Cependant, Grasl-Kraupp et coll. (1995) ont évalué

l'efficacité de la méthode TUNEL pour détecter des cellules apoptotiques et des cellules nécrotiques. Les résultats se sont révélés positifs dans les deux cas. Il est donc important de noter que la méthode peut donner des faux positifs en marquant les cellules nécrotiques: il faut en tenir compte dans l'interprétation des résultats. Ceci peut être accompli à l'aide de contrôles négatifs ou encore en complétant la méthode TUNEL par une autre se basant sur la morphologie des cellules afin de différencier celles qui sont apoptotiques de celles qui sont nécrotiques (Marshman et coll., 2001; Valavanis et coll., 2001).

2.6.2. Immunohistochimie (IHC)

Une autre méthode utilise l'IHC, afin de détecter des antigènes spécifiques aux cellules subissant l'apoptose. Il s'agit d'une méthode indirecte de détection de cellules apoptotiques. Pour cela, des anticorps monoclonaux ou polyclonaux sont dirigés contre les protéines à tester et mis en évidence grâce à des marqueurs. Avec cette méthode, le choix des protéines à dépister lors de l'apoptose est varié. Il peut s'agir de détecter les récepteurs comme Fas/FasL, les signaux apoptotiques comme p53, Bcl-2, Bax, ou encore les caspases.

3. Cicatrisation pathologique chez l'homme : le chéloïde

La guérison cutanée chez l'homme peut présenter une forme pathologique caractérisée par une accumulation excessive de tissu collagénique au site de la lésion. Il s'agit du chéloïde (Tredget, et coll., 1997; Tuan et Nichter, 1998). Bien que l'origine exacte de cette anomalie ne soit pas connue, certains facteurs favorisent son développement, comme une prédisposition génétique (les personnes ayant la peau jaune ou noire sont plus souvent atteintes que celles à peau blanche), l'âge (pathologie plus fréquente chez les enfants) et la localisation sur le corps (région du sternum, des épaules, du cou, lobules d'oreilles, et parties inférieures du visage développent plus fréquemment des cicatrices pathologiques).

3.1. Caractérisations

Le chéloïde est une cicatrice surélevée caractérisée par les propriétés suivantes : il s'étend au-delà des limites de la plaie et envahit les tissus environnants normaux, ne régresse pas avec le temps, est difficile à diminuer chirurgicalement (récidives fréquentes) et ne provoque pas de contractures (Ehrlich et coll., 1994). De nombreuses études réalisées sur cette pathologie ont permis de déceler plusieurs mécanismes à la base de son développement.

3.1.1. Déficiences en apoptose

Tel que mentionné précédemment, l'influence restrictive de p53 sauvage sur la prolifération cellulaire est déficiente lors de tumorigenèse, soit par inactivation ou suite à une mutation de p53 (Hollstein et coll., 1991). Dans ces processus pathologiques, l'expression continue de facteurs de croissance mitogènes, couplée à une absence de p53 de type sauvage, conduit à une prolifération cellulaire incontrôlée et pathologique. Il est probable que ce phénomène se produise lors de désordres fibroprolifératifs du derme, tels les chéloïdes (Saed et coll., 1998). En effet, l'équilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose est rompu à la fois dans les cultures de fibroblastes provenant de chéloïdes (Luo et coll., 2001) et dans les tissus chéloïdiens *in vivo* (Sayah et coll., 1999). Le travail de Sayah et coll. (1999) a rapporté une activité apoptotique différente dans des tissus chéloïdiens comparativement à des tissus issus de cicatrice normale. Dans cette étude, l'activité apoptotique est étudiée sous deux aspects : expression des gènes contrôlant l'apoptose et activité apoptotique spatiale. L'étude de l'expression des gènes contrôlant l'apoptose ne peut clairement indiquer une direction (stimulation ou inhibition) du processus apoptotique dans les tissus chéloïdiens, en revanche, elle prouve qu'il existe une différence dans l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose entre les tissus issus de chéloïdes et ceux provenant de cicatrices normales. Ce résultat est confirmé grâce à une étude utilisant la technologie des micro-réseaux d'ADNc; sur 8400 gènes impliqués, 402 ont une expression différente (sur-expression ou sous-expression) entre des tissus provenant de chéloïdes et des échantillons de peau normale (Chen et coll., 2003). Enfin cette étude de Messadi et coll. (1999) montre que le pourcentage de

cellules apoptotiques stimulées par les fibroblastes de peau normale est deux fois supérieur au pourcentage de cellules apoptotiques de fibroblastes provenant de chéloïdes. Tout ceci prouve donc un dérèglement dans l'élimination cellulaire apoptotique lors de cicatrices chéloïdiennes. L'autre aspect de l'étude s'intéresse à la répartition spatiale de l'apoptose à l'intérieur des tissus grâce à la méthode TUNEL. Ils ont montré que l'activité apoptotique des fibroblastes dérivés de chéloïdes est diminuée par rapport à celle des fibroblastes présents dans les cicatrices normales. De plus, l'activité apoptotique est plus faible au centre du chéloïde par rapport à celle présente en périphérie. Cette constatation confirme l'énoncé de Greenhalgh (1998) décrivant une intensité accrue de signaux d'apoptose sous le nouvel épithélium, comparativement au centre de la plaie. Cette distribution spatiale de l'activité apoptotique, ajoutée à l'expression différentielle des gènes contrôlant l'apoptose, peut donc suggérer une persistance des fibroblastes synthétiques et ainsi une production accrue des composants de la MEC caractéristiques des cicatrices chéloïdiennes (Sayah et coll., 1999).

Funayama et coll. (2003) ont montré que, à partir de cellules issues de chéloïdes, les fibroblastes mis en coculture avec des kératinocytes présentent une prolifération accrue et une activité apoptotique diminuée; phénomène non observé lorsque les fibroblastes sont mis en culture avec des kératinocytes de peau normale. De plus, l'analyse des facteurs impliqués dans la prolifération et l'apoptose a révélé une quantité augmentée de Bcl-2 et de TGF- β dans le cas de fibroblastes en coculture avec des kératinocytes issus de chéloïdes. Les deux résultats confondus suggèrent fortement que, dans le cas de développement de cicatrices chéloïdiennes, les kératinocytes exercent un rôle important sur les fibroblastes sous-jacents en provoquant une augmentation de leur activité proliférative et en diminuant leur activité apoptotique, ce par un effet paracrine et double paracrine. De manière plus générale, Nowinski et coll. (2004) ont démontré que l'expression de 243 des 343 gènes fibroblastiques testés s'est révélée stimulée par la présence de kératinocytes en coculture avec des fibroblastes. Leurs résultats démontrent bien l'influence exercée par les kératinocytes sur l'expression génique des fibroblastes sous-jacents lors du processus de guérison.

Enfin, une étude menée par Ladin et coll. (1998) rapporte un dérèglement dans le contrôle de la protéine p53 ainsi qu'une sur-expression de Bcl-2 (facteur anti-

apoptotique) et une persistance des protéines Fas en surface des fibroblastes issus de chéloïdes, le tout suggérant un retard dans l'apoptose. Ces résultats sont confirmés par une étude de Teofoli et coll. (1999). Ils ont montré une expression augmentée de Bcl-2 et diminuée de p53 dans des tissus chéloïdiens au moyen de l'IHC, suggérant une activité apoptotique déficiente dans ces cicatrices pathologiques.

Les signaux d'apoptose permettent non seulement un enchaînement harmonieux des différentes phases de guérison, mais limitent aussi le dépôt de collagène en contrôlant la population de fibroblastes synthétiques et donc leur activité collagénique (p53 se lie au promoteur du gène humain pour la collagénase de type IV (MMP-2)) (Bian et Sun, 1997).

3.1.2. Occlusion des microvaisseaux

Les microvaisseaux présents à l'intérieur des chéloïdes sont occlus suite à une prolifération excessive de cellules endothéliales, alors que ceci n'est que très peu observé dans les vaisseaux issus de peau intacte ou de cicatrice normale (Kischer et Shetlar, 1979; Kischer et coll., 1982). La microscopie électronique est nécessaire à la détection de ce phénomène (Kischer, 1993). Cette occlusion entraînerait une hypoxie locale et de ce fait stimulerait la production excessive de collagène par les fibroblastes (Kischer, 1992). Il est postulé qu'une expression accrue de TGF- β par les fibroblastes dermiques en milieu hypoxique (Falanga et coll., 1991) soit à l'origine de l'accumulation excessive de la MEC pathognomonique de la cicatrisation exubérante, étant donné que ce facteur de croissance est un stimulant majeur de la synthèse de collagène et d'autres protéines constitutives de la matrice. En effet, ce phénomène est mis en cause lors du développement de chéloïdes (Falanga et coll., 1993). Au contraire, l'anoxie régule positivement la synthèse protéique de p53 de type sauvage, inhibant ainsi la prolifération cellulaire anormale par l'intermédiaire d'un arrêt de l'inhibition de l'apoptose par le biais de Bcl-2 (Chopp et coll., 1992). Il est postulé que ce mécanisme soit à l'origine de la résolution notée lors de l'application d'un bandage occlusif à base de silicone aux cicatrices hypertrophiques chez les grands brûlés (Kischer et Shetlar, 1979).

4. Cicatrisation pathologique chez le cheval

Les blessures cutanées représentent un problème de grande envergure en médecine vétérinaire. La cicatrisation anormale chez le cheval a un poids non négligeable pour l'industrie équine : les chevaux athlétiques présentant une plaie chronique ou fibroproliférative peuvent être retirés de la compétition ou euthanasiés.

Le cheval est la seule espèce avec l'homme à développer des cicatrices anormales; chez le cheval, il s'agit du bouton de chair. Les études décrites précédemment relatives aux chéloïdes de l'homme servent de base pour la compréhension des cicatrices exubérantes retrouvées en médecine équine.

Chez le cheval, il est fréquent que les plaies ne puissent être suturées, suite à une contamination microbienne excessive en raison de la localisation en portion déclive des membres, ou encore une perte trop importante de tissus en raison de la nature traumatique de la plaie et du comportement de l'animal. Il est donc souvent nécessaire de laisser guérir la plaie par seconde intention. Ce mode de guérison implique la formation d'un nouveau tissu conjonctif, d'angiogénèse, de contraction pour diminuer la taille de la blessure et de réépithélialisation pour couvrir la surface lésée. Cependant, avec ce mode de guérison, il est fréquent d'observer le développement excessif de tissu de granulation, communément appelé « bouton de chair », et ce particulièrement sur des plaies localisées à l'extrémité des membres (Walton et Neal, 1972; Jacobs et coll., 1984).

De nombreux facteurs physiques pourraient expliquer ces complications, comme, par exemple, le mouvement continu du membre de l'animal, la tension excessive de la peau à cet endroit, la contamination importante due à la proximité du sol ainsi qu'un apport sanguin restreint en raison du déficit en tissus sous-jacents au niveau appendiculaire (Bertone, 1989; Stashak, 1991; Bacon Miller et coll., 2000). Cependant, ces hypothèses ne relèvent que de suppositions; les explications de ce phénomène représentant le but de cette étude.

4.1. Bouton de chair : état actuel des connaissances

Tout comme le chéloïde, le bouton de chair se caractérise par un dépôt excessif de protéines matricielles. Contrairement au chéloïde, il n'existe pas de couverture épithéliale sur le bouton de chair.

Souvent, les plaies de membres doivent être protégées de l'environnement par un bandage. Il a été constaté, suite à des expérimentations, qu'une plaie à cet endroit maintenue sous bandage développe plus facilement un bouton de chair. En effet, le bandage crée un environnement hypoxique et maintient les cellules inflammatoires à la surface de la plaie, ce qui stimule l'angiogénèse et la fibroplasie (Barber, 1989; Théoret et coll., 2002).

Une expérience menée par Chvapil et coll. (1979) a montré que, chez le cheval, la phase inflammatoire est très prononcée par rapport à celle observée chez le rat, ce dernier ne développant pas de cicatrices hypertrophiques. Ensuite, en 1999, l'équipe de Wilmink et coll. s'est intéressée à la différence de guérison poney/cheval et, dans chaque espèce, les différences de guérison corps/membres. Le poney ne développe généralement pas de bouton de chair, mais une différence de guérison est tout de même notée entre les plaies de jambes et les plaies corporelles; cette différence est significativement beaucoup moins importante que chez le cheval. Cette équipe rapporte donc une inflammation prompte, très intense et brève chez le poney (s'étalant sur les trois premières semaines puis diminuant rapidement). En revanche, chez le cheval, elle est plus lente à se mettre en place, moins intense et perdure jusqu'à 12 semaines post-trauma. L'étude documente une activité mitotique élevée et persistante dans les plaies à l'aspect distal du membre du cheval par rapport à celles du tronc du cheval et celles du poney (Wilmink et coll., 1999a; Wilmink et coll., 1999b). Une apoptose déficiente au niveau des granulocytes présents lors de la phase inflammatoire pourrait en être la cause, phénomène probablement lié à une couverture épithéliale insuffisante lors du développement d'un bouton de chair (Dietch et coll., 1988).

Bacon-Miller et coll. (2000) proposent une croissance fibroblastique plus importante dans les plaies de membres que dans les plaies de thorax, étant donné que ce type cellulaire est responsable, en partie, de la mise en place de la MEC. Cependant, une étude *in vitro* de Wilmink et coll. (1999b) vient contredire cette hypothèse; les

fibroblastes de membres ont une activité mitotique moindre que ceux provenant du thorax du cheval et du poney, ainsi que des membres du poney. *In vivo*, Wilmink et coll. (1999b) ont montré que l'activité mitotique des fibroblastes venant d'une plaie à la croupe diminue rapidement en une semaine, alors que celle des fibroblastes issus d'une plaie appendiculaire reste significativement élevée. La contradiction de ces résultats peut être expliquée par les environnements différents des deux expériences : l'une *in vivo*, où de nombreux facteurs de croissance peuvent influencer la croissance des cellules par rapport à une situation contrôlée *in vitro*.

Le défaut de couverture épithéliale peut être expliqué par un dépôt matriciel en excès qui nuit au processus de réépithélialisation, soit en inhibant la mitose des kératinocytes, ou en agissant comme obstacle physique à la migration de ces cellules (Wilmink et coll., 1999b). D'ailleurs, comparativement aux plaies du thorax, les plaies situées sur les membres ont une plus faible vitesse de réépithélialisation (Jacobs et coll., 1984). De plus, le tissu protubérant retarde la contraction effectuée par le myofibroblaste, étape nécessaire de la guérison chez le cheval, et mène ainsi au développement d'une cicatrice inesthétique (Théoret et coll., 2002).

Le problème de cicatrisation peut aussi provenir d'un défaut de contraction. Le degré de contraction d'une plaie est déterminé par les capacités contractiles innées des cellules ainsi que par les conditions tissulaires locales (Cochrane et coll., 2003). Wilmink et coll. (1999b) ainsi que Schwartz et coll. (2002) ont démontré, chez le cheval, une organisation chaotique des cellules contractiles contenues dans le tissu de granulation des plaies appendiculaires alors que les myofibroblastes issus de plaies corporelles sont bien ordonnés. En parallèle, Wilmink et coll. (2001) ont montré que la force contractile innée des myofibroblastes issus des plaies appendiculaires chez le cheval est similaire à celle des myofibroblastes du tronc *in vitro*. Le degré d'organisation des myofibroblastes serait donc responsable d'une contraction efficace, par opposition à leur force innée ou à leur nombre. Il est important de noter que l'expérience précédente a été réalisée *in vitro*; conditions expérimentales très différentes quand on considère les interactions cellulaires existant *in vivo*, comme par exemple le profil de cytokines libérées lors de la réponse inflammatoire et pouvant influencer les cellules lors des

phases subséquentes de la guérison. Cette étude amène donc des éléments de réponse mais ne reproduit pas les conditions réelles de guérison.

Van Den Boom et coll. (2002), quant à eux, incriminent le facteur de croissance pro-inflammatoire et fibrogénique TGF- β , dans cette guérison anormale. En effet, ils ont montré que cette cytokine apparaît plus tôt et en quantité plus importante dans les plaies appendiculaires de poney, confirmant que la phase inflammatoire chez le poney est plus rapide et plus intense, entraînant une mise en place efficace des autres phases de guérison. De façon plus précise, la cinétique de l'expression de TGF- β a été étudiée lors de la guérison chez le cheval. Alors que dans les plaies thoraciques il retourne à un niveau basal à la fin de la phase inflammatoire, ce facteur de croissance persiste à travers la phase proliférative de guérison dans les plaies localisées à l'aspect distal des membres (Théoret et coll., 2001b). Également, une production plus accrue d'ARNm pour le TGF- β , associée à une hausse semblable d'ARNm pour le collagène de type I, a été démontrée pendant quatre semaines dans des plaies de membres par rapport à celles situées au niveau pectoral (Schwartz et coll., 2002). Ainsi, la persistance de TGF- β dans les plaies appendiculaires pourrait être reliée à la production excessive de tissu de granulation puisque ce facteur est fibrogénique. D'autre part, la comparaison est faite entre des plaies sur les membres guérissant normalement et des plaies sous bandage, qui s'avère un modèle efficace pour inciter la formation de tissu de granulation excessif. Bien que les résultats ne soient pas statistiquement significatifs, des quantités accrues de TGF- β 1 et déficientes de TGF- β 3 furent observées dans les plaies avec bouton de chair, associant la fibroplasie excessive à un déséquilibre entre la quantité de l'isoforme fibrogénique et de l'isoforme anti-fibrotique (Théoret et coll., 2002).

Enfin, chez le cheval, il a été démontré que la protéine p53 de forme mutante est fortement exprimée lors de processus pathologiques impliquant une prolifération cellulaire accrue, tel l'épithélioma spinocellulaire (Teifke et Löhr, 1996). De plus, il est suggéré que la mutation de la protéine p53 par le virus du papillome bovin soit à l'origine du sarcoïde équin, une forme de tumeur cutanée bénigne qui s'apparente en quelque sorte au bouton de chair (Bucher et coll., 1996). Ceci implique qu'une dérégulation des signaux d'apoptose peut être à l'origine d'une prolifération cellulaire accrue comme celle remarquée dans le bouton de chair.

Au niveau curatif, de nombreux traitements ont été testés, cependant aucun n'a réussi à prévenir de façon convaincante et définitive la formation excessive de tissu de granulation chez le cheval étant donné que la pathogenèse de cette condition n'est pas encore suffisamment élucidée.

5. Objectifs et hypothèses

La première hypothèse spécifique à notre étude sous-tend que l'activité apoptotique est déficiente dans les plaies développant des boutons de chair par rapport aux plaies guérissant normalement. La deuxième hypothèse prévoit une occlusion plus importante des microvaisseaux issus de cicatrices anormales comparativement à ceux de plaies guérissant normalement.

L'objectif général de l'étude est la compréhension de la physiopathologie du bouton de chair en ciblant deux aspects : l'activité apoptotique d'une plaie développant un bouton de chair par rapport aux plaies guérissant normalement ainsi que l'évaluation de l'ultrastucture des microvaisseaux de ces deux types de plaies.

Méthodologie

1. Chevaux

L'expérience s'est déroulée avec six juments de race Standardbred, âgées de 2 à 3 ans. L'examen physique et les tests hématologiques et biochimiques effectués deux semaines avant le début de l'étude n'ont révélé aucune anomalie. Au moment des tests sanguins, les juments ont été vaccinées contre la rage, le tétanos, l'influenza et le virus du Nil occidental. Elles ont été gardées en stalle durant toute la période de l'étude (six semaines) et nourries au foin.

L'utilisation des animaux pour cette étude était conforme aux politiques et aux normes de l'Université de Montréal et en accord avec les principes et recommandations du conseil canadien de protection des animaux (CCPA). Le projet fut approuvé par le Comité de déontologie animale de la Faculté de médecine vétérinaire.

2. Procédure chirurgicale

Les juments ont été placées dans un travail et ont reçu une sédation au chlorhydrate de détomidine (Dormosedan[®] 10 mg/mL) 4 mg I.V. et au tartrate de butorphanol (Torbugesic[®] 10 mg/mL) 10 mg I.V.

Les sites prévus pour les chirurgies ont été tondu puis nettoyés au moyen d'un scrub chirurgical. Une anesthésie locale au chlorhydrate de lidocaïne (Lurocaïne[®] 20 mg/mL) fut pratiquée sur ces sites afin de les désensibiliser. L'anesthésie loco-régionale pratiquée à l'aspect latéral des membres antérieurs fut de type palmaire haute : les nerfs palmaire latéral et métacarpien palmaire latéral ont chacun reçu 10 ml de Lurocaïne S.C. L'aspect latéral du thorax fut désensibilisé à l'aide d'un bloc en L inversé utilisant un total de 20-25 mL de Lurocaïne par animal.

Cinq plaies cutanées de pleine épaisseur, mesurant 2,5cm X 2,5cm furent créées à l'aide d'un bistouri, en rangée verticale et décalée, aux trois endroits suivants, sur chaque animal:

- aspect dorso-latéral de la région métacarpienne droite

- aspect dorso-latéral de la région métacarpienne gauche
- aspect latéral du thorax (un seul côté, choisi aléatoirement mais de façon égale : trois juments avaient les plaies sur le côté droit, les trois autres sur le côté gauche.)

L'espacement (1,5 cm horizontal et 1,5 cm vertical) des excisions fut standardisé à l'aide d'un prototype stérile. Les plaies n'ont pas été suturées, permettant une guérison par seconde intention. Des bandages temporaires ont été placés sur les plaies des membres dans la période post-opératoire afin de minimiser l'hémorragie, puis ont été enlevés environ deux heures après l'intervention chirurgicale.

3. Suivi post-opératoire

Un des deux membres (choisi aléatoirement) fut mis sous bandage pour chacune des juments. Ce dernier a été changé tous les deux ou trois jours. L'autre membre fut laissé à l'air libre toute la durée de l'étude.

Un examen des juments (température-pouls-respiration) ainsi que des plaies fut pratiqué à chaque changement de bandages afin de déceler le moindre inconfort ou le début d'une infection.

Aucun médicament ne fut administré.

4. Biopsies des plaies

Lors de chaque biopsie, les juments ont reçu une sédation et une anesthésie locale régionale telles que cité précédemment. Les plaies ont été nettoyées avec une solution saline. Des biopsies de pleine épaisseur ont été prélevées à la périphérie des plaies, à l'aide d'un punch à biopsie de 8 mm de diamètre, de façon à inclure une bande cutanée périphérique de 3 à 4 mm d'épithélium en migration et une bande de 3 à 4 mm de tissu de granulation. Afin d'éviter des traumatismes répétés, chaque plaie n'a été biopsiée qu'une seule fois. Les biopsies ont été prises de la plaie la plus distale à la plaie la plus proximale afin que l'inflammation occasionnée par la biopsie n'affecte pas les plaies sous-jacentes et ne viennent biaiser les résultats. Les tissus ont été placés dans une solution saline avant

d'être coupés en deux; une partie fut utilisée pour la microscopie électronique, l'autre pour l'histologie, l'IHC et la méthode TUNEL.

Les dates de biopsie ont été réparties de la façon suivante :

Semaine 0 : échantillons de peau normale lors de la création des plaies

Semaine 1

Semaine 2

Semaine 3

Semaine 4

Semaine 6

5. Traitement des échantillons

5.1. Histologie

Immédiatement après le prélèvement, les tissus destinés à l'examen histologique furent placés dans une solution de formaline 10% tamponnée pendant 24h à 4°C. Ils ont ensuite été enrobés dans la paraffine afin de les sectionner en tranches de 4 µm et de les monter sur des lames pour examens histologique et immunohistochimique. Aux fins des examens histologiques, les échantillons ont été révélés au moyen de la coloration HPS.

Deux observateurs indépendants ont évalué de façon semi-quantitative la taille du site inflammatoire, la progression de la migration de la langue épithéliale, l'angiogénèse et le degré d'organisation des fibroblastes.

Les grades semi-quantitatifs étaient organisés comme suit :

- Taille du site inflammatoire :

0 - absence de cellules inflammatoires

1 - site inflammatoire ayant un diamètre inférieur au double de l'épaisseur de l'épiderme intact recouvrant le site adjacent à la plaie

2 - site inflammatoire ayant un diamètre de deux à cinq fois supérieur à l'épaisseur de l'épiderme intact

3 - site inflammatoire ayant un diamètre supérieur à cinq fois l'épaisseur de l'épiderme intact

- Progression de la migration de la langue épithéliale :
 - 0- absence de nouvel épithélium migrant à la marge de la plaie
 - 1- nouvel épithélium ayant recouvert 1/3 du tissu de granulation compris dans la biopsie
 - 2- nouvel épithélium ayant recouvert 2/3 du tissu de granulation compris dans la biopsie
 - 3- nouvel épithélium ayant recouvert complètement le site de la lésion compris dans la biopsie

- Angiogénèse :
 - 0- absence de nouveaux capillaires dans le lit de la plaie
 - 1- entre 1 et 5 nouveaux capillaires dans le lit de la plaie
 - 2- entre 6 et 15 nouveaux capillaires dans le lit de la plaie
 - 3- plus de 15 nouveaux capillaires dans le lit de la plaie

- Organisation des fibroblastes :
 - 0- absence de fibroblastes dans le lit de la plaie
 - 1- fibroblastes présents, organisation chaotique : leurs axes longitudinaux ne sont pas orientés parallèlement les uns aux autres ni à la surface de la plaie
 - 2- fibroblastes présents, organisation modérée
 - 3- fibroblastes présents, bonne organisation : leurs axes longitudinaux sont orientés parallèlement les uns aux autres et aussi à la surface de la plaie

5.2. Immunohistochimie

Les blocs de paraffine contenant les échantillons de tissu ont été sectionnés en tranches de 4 μm , qui ont été déparaffinées dans du toluène 100%, réhydratées dans des concentrations décroissantes d'éthanol (100%, 95% et 80%) et équilibrées dans de l'eau distillée pendant 5 minutes à température de la pièce.

L'étape suivante consistait à démasquer les épitopes des antigènes d'intérêt pour l'étude. Pour cela, les lames ont été placées dans une solution de citrate de sodium 10mM et irradiées aux micro-ondes pour une période de 1 min 30 à puissance 10, suivie d'une

période de 4 min à puissance 1. Ces deux étapes sont renouvelées une autre fois pour terminer avec une période de 30 sec à puissance 10. Les lames ont été laissées à la température de la pièce pour 10 min afin qu'elles refroidissent.

L'activité de la peroxydase endogène a ensuite été bloquée en plaçant les lames dans une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 0,3% diluée dans du méthanol pour une période de 30 min à température de la pièce. Après trois lavages dans du PBS, les lames ont été incubées pendant 20 min dans du sérum normal de cheval provenant du kit Vectastain ABC (Vectastain kit, Vector Laboratories Inc, Burlington, ON, Canada). L'excédant a été rincé puis nous avons ajouté les anticorps IgG monoclonaux de souris contre p53 dilués dans du PBS (concentration finale de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Ab-12, Oncogene Research Products, San Diego, CA, USA) durant 12h à 4°C dans une chambre humide.

Le lendemain, les lames ont été nettoyées (deux lavages de 5 min) avec du PBS. La détection des anticorps monoclonaux est effectuée à l'aide d'un anti-IgG de souris biotinylé (1:200 dans du PBS) (kit Vectastain) qui est déposé sur les coupes et incubé pendant 45 min à la température de la pièce. Les lames ont été nettoyées tel que décrit précédemment. Les tissus ont été incubés avec le complexe ABC (avidin-biotinylated enzyme complex, kit Vectastain ABC) pendant 45 min à température de la pièce. Une nouvelle étape de lavage a été réalisée. Les produits de l'immunoréaction ont été visualisés en incubant les sections avec une solution de 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) combinée à 0,005 % H_2O_2 pendant 15 min à température ambiante. Les tissus ont été rincés à l'eau distillée (5 min) avant d'être plongés dans une solution de 33% d'hématoxyline Gill formulation 2 durant 30 sec (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA), qui sert de contre-colorant. L'excédent de colorant a été enlevé à l'eau distillée jusqu'à ce que cette dernière devienne transparente. Les lames ont été mises sous lamelle à l'aide d'Aquamount® (Lerner Laboratories, Pittsburg, PA, USA) et observées au microscope Nikon Eclipse400.

Les contrôles positifs ont été réalisés à partir d'échantillons d'épithélioma spinocellulaire de cheval. Les contrôles négatifs étaient réalisés grâce à des échantillons de peau normale ainsi que des échantillons standard dans lesquels l'anticorps primaire a été remplacé par du PBS lors de la période d'incubation de 12h.

L'intensité immunocolorante ainsi que le pourcentage de cellules positives dans les tissus ont été estimés par deux évaluateurs indépendants, à l'insu, dans trois sections différentes de l'échantillon : kératinocytes de la jonction ancien/nouvel épithélium et du nouvel épithélium et fibroblastes sous le nouvel épithélium. Des grades semi-quantitatifs pour ces deux critères ont été établis comme suit : 0 (intensité de coloration faible ou nulle) et 1 (forte intensité de coloration), puis de 0 à 3 pour le pourcentage de cellules positives (0 : <5%, 1 : 6-19%, 2 : 20-39%, 3 : >40%). Ces deux valeurs ont ensuite été additionnées afin d'attribuer un seul grade (s'échelonnant de 0 à 4) évaluant la réactivité des tissus à p53, ceci en respectant l'importance de chaque critère, soit, le pourcentage de cellules positives comptant pour 80% et l'intensité de coloration pour 20%.

5.3. Méthode TUNEL

La fragmentation *in situ* de l'ADN a été visualisée grâce à la méthode TUNEL. Les échantillons tissulaires ont été déparaffinés dans du toluène 100%, réhydratés dans une succession de bains d'éthanol de concentrations décroissantes (100%, 90%, 80% et 70%), puis dans une solution de TBS (tris-buffer saline). Les tissus ont ensuite été prédigérés à l'aide de la protéinase K (20 µg/ml) pendant 20 min, puis incubés durant 30 min dans une solution de peroxyde d'hydrogène 3% (dilué avec du méthanol) pour bloquer la peroxydase endogène. Une période de lavage de 5 min dans du TBS a terminé chacune des étapes précédentes. Une période de 20 min d'incubation avec le TdT equilibration buffer (dilué 1:5) a suivi afin de préparer la réaction de marquage avec l'enzyme. Cette dernière étape a consisté à mettre l'enzyme TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) en solution avec le TdT labelling reaction mix du kit FragEL (QIA33; Oncogene Research Products), en proportion respectivement de 5% et 95% puis appliqué sur les tissus et incubé pendant 45 min à 37°C dans une chambre humide. Afin de stopper la réaction, 200 µL de solution stop du kit a été appliquée sur les lames durant 5 min. Après un lavage de 5 min, les échantillons ont été incubés pendant 10 min avec du tampon bloquant afin de détecter les fragments d'ADN précédemment marqués. L'excédent de ce tampon est éliminé puis la solution de conjugué a été ajoutée aux échantillons pour une incubation de 30 min à température de la pièce. Enfin, la visualisation de la réaction a été

possible en incubant les tissus avec une solution de 3,3'-DAB (kit FragEL) pendant 10 min. Un dernier rinçage a été nécessaire afin d'enlever l'excédent de DAB. La contre-coloration a été réalisée à l'aide de la solution de vert de méthyl, pendant 3 min. Les tissus ont été successivement plongés dans une solution de 100% d'éthanol puis dans du xylène avant de les mettre sous lamelles à l'aide de Permount® (Fisher Scientific).

Deux types de contrôles positifs ont été réalisés, le premier consistait en une population de cellules HL60 préalablement incubées avec de l'actinomycine D afin d'induire l'apoptose (JA1609 ; Oncogene Research Products). La deuxième série consistait à incuber un échantillon de peau normale avec une solution de DNase I (1 µg/µL) afin de provoquer des coupures d'ADN qui ont été ultérieurement marquées de la même façon que les autres échantillons avec le kit fragEL. Cette étape est réalisée juste après la digestion avec la protéinase K, puis ces échantillons sont traités avec les autres n'ayant pas subi l'incubation avec la DNase. Les contrôles négatifs consistaient en de la peau normale avec l'enzyme TdT, et en un tissu de plaie ayant été incubé sans l'enzyme TdT.

Deux observateurs indépendants ont évalué la présence de cellules apoptotiques de façon semi-quantitative en établissant des grades comme suit :

- 0- absence de cellules apoptotiques
- 1- présence modérée de cellules apoptotiques
- 2- forte présence de cellules apoptotiques.

Les cellules observées étaient les fibroblastes situées à la jonction ancien/nouvel épithélium.

5.4. Microscopie électronique

Les échantillons destinés à la microscopie électronique furent immergés dans une préparation de glutaraldéhyde 2,5 % en tampon cacodylate 0,05 M, pH 7,4 de façon à fixer les protéines, puis fragmentés en petits cubes (0,5 mm³) à l'aide d'une lame de scalpel en prenant soin de ne pas écraser le tissu. Les fragments de tissus ont été laissés dans la solution de glutaraldéhyde pendant 4 heures à 4° C. Ensuite, les tissus ont subi trois rinçages successifs en tampon cacodylate 0,05 M, pH 7,4 (osmolarité ajustée au

sucrose \pm 340 mOsm) avant d'être placés dans une solution de tétr oxyde d'osmium (OsO_4) 1 % en tampon cacodylate 0,05 M, pH 7,4 (osmolarité ajusté au sucrose \pm 340 mOsm) pendant 2 heures à 4° C. Cette étape servait à fixer les lipides. Deux rinçages en tampon cacodylate 0,05 M; pH 7,4 (osmolarité ajustée au sucrose \pm 340 mOsm) à 4° C ont ensuite été effectués. Les échantillons ont été colorés à l'acétate d'uranyle 0,5 % en tampon maléate 0,05 M, pH 5,2; à 4° C pendant 1 heure. A suivi une étape de rinçage en tampon maléate 0,05 M; pH 5,2, puis les échantillons ont été déshydratés à 4° C dans des solutions croissantes d'alcool. Les échantillons ont été transférés dans une solution de tetroxide d'osmium pour deux périodes de 15 min, puis imprégnés dans de l'oxyde de propylène / Épon (50/50) pour 1 heure et enfin dans de l'oxyde de propylène / Épon (25/25) pour la nuit. Ces dernières étapes étaient réalisées à la température de la pièce. Enfin, les échantillons ont été placés dans un four pour enrobage et polymérisation pendant 4 heures à 45° C puis pendant 48 heures à 60° C.

Des coupes semi-fines de 0,5 micron ont ensuite été réalisées afin de sélectionner les échantillons d'intérêt puis de les colorer au bleu de toluidine. La sélection faite, des coupes fines de 60 nm ont été performées à l'aide d'une pointe de diamant; colorées au citrate de plomb et examinées avec un microscope électronique Philips 300 puis photographiées. Les seuls microvaisseaux conservés pour cette étude furent ceux coupés transversalement et dont les noyaux des cellules endothéliales étaient identifiés de façon non ambiguë.

Les négatifs furent d'abord numérisés. À l'aide des images obtenues, le diamètre de la lumière de chacun des microvaisseaux présents dans les échantillons a été mesuré à l'aide du logiciel de digitalisation d'images NIH image (version Windows du programme de traitement d'images Scion Corporation, Frederick, MD). Ces mesures ont été possibles suite à la calibration de chaque image en pixels/ μm ; ceci à chaque magnitude utilisée (variant de X 1500 à X 7000).

Les microvaisseaux ont ensuite été divisés en deux catégories selon le diamètre de leur lumière : 0 = occlus et 1 = non-occlus. Une lumière possédant à la fois un diamètre de Féret (défini comme étant la plus grande distance entre deux tangentes parallèles à des côtés opposés de la surface à évaluer) inférieur ou égal à 6 μm et un diamètre minimum inférieur ou égal à 1,8 μm méritait l'inclusion dans la catégorie « occlus ». Les vaisseaux

présentant des lumières ayant des valeurs supérieures à ces dernières sont placés dans la catégorie « non-occlus ». D'après Smith et coll. (1979), le diamètre moyen d'un érythrocyte normal (non déformé) de cheval est de 6 μm . Henquell et coll. en 1976 montrent que l'épaisseur minimale qu'un érythrocyte peut adopter afin de passer dans un capillaire est de 1,8 μm . En dessous de cette valeur, des mesures de gradients d'oxygène effectuées dans les tissus environnants ont montré que le globule rouge ne peut assurer sa fonction de maintien d'une aérobie adéquate dans les tissus.

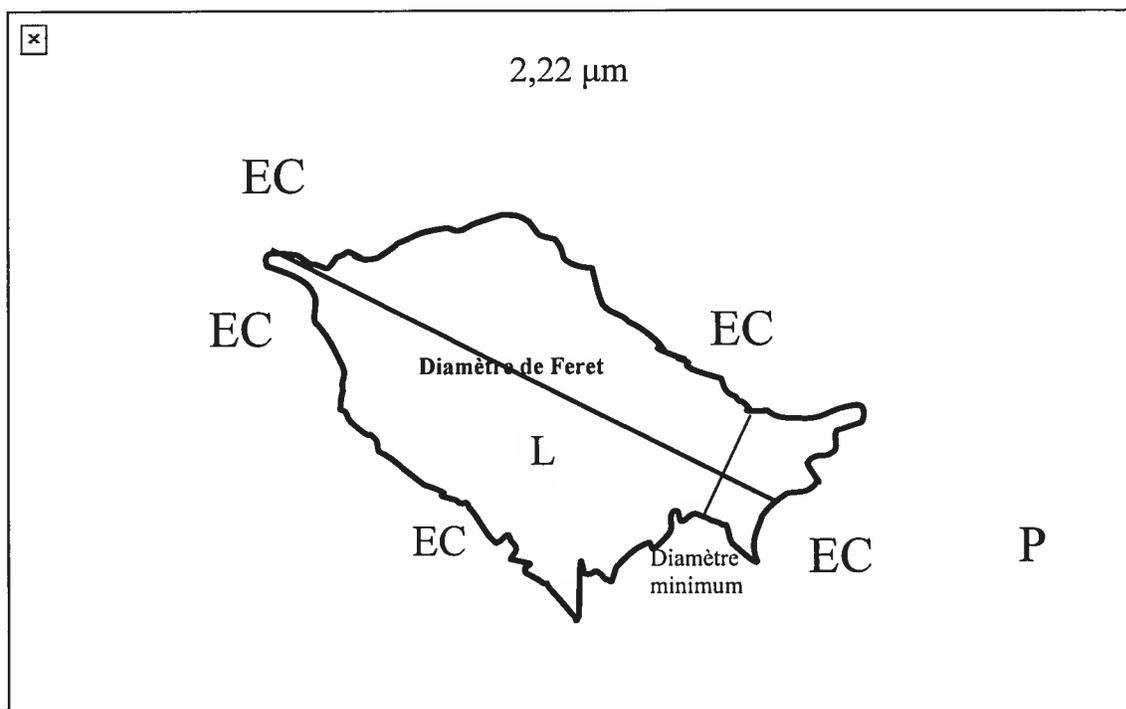


Figure 7: Photomicrographie électronique montrant un microvaisseau normal avec en gras la mesure du diamètre de Féret et en bas de la lumière du microvaisseau la mesure du diamètre minimum. L = lumière, EC = cellules endothéliales, P = péricyte.

6. Analyses statistiques

Le kappa pondéré a été calculé pour chaque test afin d'apprécier la qualité de l'accord entre les deux évaluateurs, une valeur inférieure à 0,4 indiquait une correspondance faible. Tous les tests présentaient une bonne concordance entre les deux évaluateurs étant donné que les valeurs de kappa étaient toujours supérieures à 0,4.

Nous avons utilisé le modèle de régression logistique, avec le temps et le traitement comme facteurs répétés, afin d'analyser les données histologiques, immunohistologiques, de TUNEL et les valeurs obtenues de la microscopie électronique.

Compte tenu des données manquantes pour certains sujets à certains temps, il n'a pas été possible d'intégrer l'interaction entre le temps et le traitement dans tous les modèles. Des contrastes à priori ont été réalisés pour comparer les différents niveaux de la variable temps et de la variable traitement. Les rapports de côte ont été obtenus à partir de l'exponentiation des paramètres des modèles.

Pour traiter les données de la microscopie électronique, nous avons aussi utilisé le modèle de Cochran-Mantel-Haenszel pour réaliser des contrastes entre les différents traitements à chacun des temps afin d'examiner l'interaction entre le temps et le traitement. Ce type de modèle prend en ligne de compte l'identité des sujets et est donc un modèle à mesures répétées.

Toutes les analyses ont été réalisées en utilisant un seuil alpha de 0,05, à l'aide de SAS v. 8,2. (Cary, N. C.).

Article

**Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis
in body and limb wounds in the horse**

Élodie Lepault, BSc, Christophe Céleste,[§] DMV, IPSAV, Monique Doré[‡], DMV, PhD, DACVP, Daniel Martineau[‡], DMV, PhD, DACVP Christine L. Theoret, DMV, PhD, DACVS

From the departments of biomédecine vétérinaire, [‡]pathologie et microbiologie, and [§]sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 7C6.

Corresponding author:

Christine L. Theoret, DMV, PhD, DACVS

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Université de Montréal

C.P. 5000, rue Sicotte

Saint-Hyacinthe, QC

Canada, J2S 7C6

tel: (450)773-8521, ext.8517

fax: (450)778-8109

email: [REDACTED]

1. **Abstract**

Wound repair in equine limbs is often complicated by exuberant granulation tissue, a condition characterized by excessive fibroplasia and scarring, and that resembles hypertrophic scars and keloids in man. This condition is not usual in thoracic wounds. The aim was to compare microvascular occlusion and apoptosis in wounds of the limb with those of the body, which heal normally.

Five, 6,25cm² wounds were created on both forelimbs and on the body of six horses. One limb was bandaged to stimulate excessive fibroplasia. Weekly biopsies were evaluated histologically, immunohistochemically for mutant p53 protein, by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling to localize and quantify apoptosis, and by electron microscopy to measure microvessel luminal diameters.

Histologic examination revealed protracted inflammation as well as sluggish epithelialization and deficient fibroblast orientation in limb wounds, particularly those with excessive fibroplasia. In limb wounds, microvessels were occluded significantly more often, and the balance of apoptotic signals was altered against apoptosis, although this could not be confirmed quantitatively.

Data suggest that microvascular occlusion and a dysregulated apoptotic process may be involved in the excessive accumulation of extracellular matrix within limb wounds. This might provide a basis for the development of targeted therapies to prevent and treat excessive fibroplasia and extensive scarring in horses.

Key words: Fibroplasia; scarring; proud flesh; horse; microvascular occlusion; apoptosis

2. Abbreviations

DNA: desoxyribonucleic acid

IHC: immunohistochemistry

TEM: Transmission electron microscopy

TGF- β : Transforming growth factor- β

TUNEL: TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase)-mediated dUTP-biotin Nick End
Labelling

3. Introduction

Traumatic wounds frequently afflict horses and must often heal by second intention because of massive tissue loss and contamination.(1) This process is commonly complicated by the development of exuberant granulation tissue (also referred to as “proud flesh” in the horse) when wounds are located on the limbs, while body wounds tend to repair uneventfully.(2) Excess fibroplasia then compromises wound contraction and epithelialization, leading to swollen limbs, persisting lameness and extensive scars. Since most horses are destined to an athletic career, problematic repair of limb wounds represents an important economic burden to the equine industry.

People of the black race are likewise predisposed to excessive dermal scarring. Deep wounds repair via a process of fibroplasia which initially takes place in an inflammatory milieu and includes marked microvascular regeneration. The outcome is customarily a hypertrophic scar or keloid in which there is considerable occlusion of the microvasculature as a result of endothelial cell hyperplasia and/or hypertrophy within the granulation tissue.(3) Hypoxia resulting from microvessel occlusion may stimulate excessive production of collagen by fibroblasts and myofibroblasts, characteristic of the aforementioned dermal lesions, via upregulation of angiogenic and fibrogenic factors.(4)

It has been shown that the severity of scarring of horse limb wounds is related to both a protracted inflammatory phase where neutrophils and macrophages persist within the wound bed (5) and an excessive fibroblastic phase where proliferative and synthetic fibroblasts dominate rather than disappearing or differentiating into contractile myofibroblasts.(5-7) Conversely, a mature wound is acellular and avascular because cells are eliminated by apoptosis.(8) Studies in man and laboratory animals have established that abnormal apoptosis during wound repair is conducive to the development of pathological scars.(9) If apoptotic signals, which arise from the migrating epithelium, are delayed beyond a certain time point (i.e. if the wound remains open more than 2-3 weeks) then apoptosis is permanently impaired, with an excess number of fibroblasts persisting and ultimately leading to an imbalance between collagen synthesis and degradation with excessive scar formation.(8) Indeed, apoptosis is aberrant in human keloids.(10-12)

P53 is a key protein involved in regulating apoptosis, and doubles as a negative regulator of cellular proliferation. It causes cell cycle arrest in response to DNA damage, allowing DNA to repair itself. If repair is not successful, p53 promotes apoptosis by increasing the expression of many pro-apoptotic genes such as bax and by diminishing the expression of genes which inhibit apoptosis such as Bcl-2.(13) p53 also plays a direct role in apoptosis by interacting physically with other pro-apoptotic proteins. Mutant p53 loses the ability to bind specific DNA sequences and thus its transcription activity, allowing constitutive expression of Bcl-2 and of other genes that inhibit apoptosis. In turn, the inhibition of apoptosis allows further mutations and increases the odds for the emergence of malignant cells. A positive feedback mechanism thus leads to uncontrolled cellular proliferation.(14) It has been shown that mutant p53 protein accumulates in both tissues and fibroblast cell lines derived from keloid tissues but not in cultured fibroblasts from healthy skin.(10,15)

The overall aim of this study was to elucidate the pathogenesis of “proud flesh” in the horse. We hypothesized that the extensive scars resulting from the development of exuberant granulation tissue in the horse may share a common basis of development with human hypertrophic scars and keloids, where the normal repair sequence becomes dysregulated. We verified this hypothesis by comparing microvascular occlusion, rate of apoptosis, and expression of mutant p53 protein in body wounds and limb wounds healing normally or developing exuberant granulation tissue. Our specific hypotheses were that microvascular luminal diameters would be smaller in wounds of the limb, in particular those developing exuberant granulation tissue, and that apoptosis would be retarded within these same wounds, due in part to the accumulation of mutant p53 protein within the tissues.

4. Materials and Methods

4.1. Horses

Six healthy, 2-to-3 year old Standardbred mares were used for the experiment, which was in compliance with the Université de Montréal's guidelines and was approved by the Canadian Council on Animal Care. Prior to entry into the study, horses were treated with a broad-spectrum anthelmintic and vaccinated against tetanus, Eastern and Western equine encephalomyelitis, influenza and West Nile virus. Horses were kept in standing stalls for the duration of the study and allowed *ad libitum* access to grass hay and water. The animals were examined daily for signs of discomfort, lameness, systemic illness and bandage slippage.

4.2. Surgical procedure

Horses were sedated with detomidine hydrochloride (0,01 mg/kg; I.V.) and butorphanol tartrate (0,04 mg/kg; I.V.), then the hair was clipped from the dorso-lateral aspect of both metacarpi and one randomly chosen hemi-thorax in each horse. Local anesthesia was performed using 2% lidocaine hydrochloride (0,5 mg/kg; S.C.); a lateral high palmar nerve block desensitized each metacarpus while an inverted L-block was used for the assigned hemi-thorax. The surgical sites were aseptically prepared and five square 6,25 cm² areas were traced on the dorso-lateral aspect of each metacarpus beginning just above the fetlock, and on the lateral thoracic wall, 1,5 cm apart in a staggered vertical column, using a sterile template. Full-thickness wounds were then created with a scalpel within the confines of the tracings, and left to heal by second intention. Excised skin from the lowermost wound was kept as a time 0 sample. All horses had one randomly designated forelimb bandaged post-operatively to induce the formation of exuberant granulation tissue and lead to extensive scarring.(16,17) Bandages were changed a minimum of three times per week thereafter, until complete healing.

4.3. Biopsy samples

One wound per site (thorax; unbandaged limb; bandaged limb) was biopsied at the following times in each horse: 1, 2, 3, 4, and 6 weeks. To avoid repeated trauma, each wound, beginning with the most distal one, was designated for only one biopsy. Full-thickness specimens were taken with an 8-mm diameter biopsy punch to include a 3 to 4 mm strip of peripheral skin, the migrating epithelium, and a 3 to 4 mm strip of granulation tissue when present,(6,16) after performing sedation and local anesthesia as described above. Each sample was cut in half; the first was quickly immersed in a cold 2,5% glutaraldehyde solution buffered with 0,05 M cacodylate, and cut into 0,5 mm³ cubes with a sharp razor blade, then fixed for transmission electron microscopy (TEM). The second half of the sample was fixed in neutral-buffered 10% formalin, processed in paraffin blocks, then sectioned at 4µm for histological, immunohistochemical (IHC) or terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL) evaluations.

4.4. Histology

Two observers, blinded to the origin of the biopsy specimens, evaluated the size of the inflammatory site, progression of the epithelial margin, angiogenesis, as well as degree of fibroblast organization, using a semi-quantitative grading scale.

Inflammation (platelets, fibrin, polymorphonuclear and mononuclear cell infiltration) was graded as 0 when absent; 1 when the diameter of the inflammatory focus measured less than twice the thickness of the adjacent intact epidermis; 2 when this diameter measured between two and five times the thickness of the intact epidermis; and 3 when this diameter measured more than five times the thickness of the intact epidermis.

Epithelialization was graded as 0 when no new epithelium was observed at the wound margin; 1 when new epithelium had advanced to cover one third of the granulation tissue present in the biopsy; 2 when the new epithelium had advanced to

cover two thirds of the granulation tissue present in the biopsy; and 3 when epithelialization was complete.

Angiogenesis was graded as 0 when no new capillaries were apparent within the wound bed; 1 when between one and five new capillaries were present; 2 when between six and 15 new capillaries were present; and 3 when more than 15 new capillaries were present.

Fibroplasia was graded as 0 when no fibroblasts were apparent within the wound bed; 1 when the fibroblasts adopted a chaotic arrangement; 2 when fibroblast organization was moderate; and 3 when fibroblasts were well aligned, their long axes parallel to one another and to the wound surface.

4.5. TEM for detection of microvascular occlusion

The tissue cubes were postfixed in 1% osmium tetroxide and colored with 0,5% uranyl acetate. Samples were subsequently dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in propylene oxide/Epon.(18) They were thin-sectioned (60nm), mounted on copper grids, stained with lead citrate, and examined with a Philips 300 transmission electron microscope.

Tissues were examined primarily for evaluation of the microvasculature. Only microvessels cut unambiguously in cross-section at the level of the nuclei of capillary endothelial cells were used in the data collection. Microvessels were photographed at magnifications ranging from 1,500 to 7,000X, then photographs were scanned and calibrated into pixels/ μm and analyzed using commercial image processing software (Image J; Windows version of the NIH image program: Scion Corporation, Frederick, MD). The luminal patency/occlusion was evaluated for each microvessel, in a blinded fashion by two observers. Both Feret's diameter (the longest diameter of a non-circular lumen) and the minimum diameter of the microvessel lumen were measured since luminal area was not always circular. Microvessels were considered patent if Feret's diameter was greater than 6 μm and the minimum diameter exceeded 1,8 μm . Lumens were considered occluded when both Feret's and the minimum diameters were inferior to 3 μm or when the minimum diameter was smaller than 1,8 μm regardless of Feret's

diameter. These values were based on the diameter of the equine red blood cell,(19) the minimum thickness of a deformed erythrocyte,(20) as well as the minimum luminal circular diameter beyond which a red blood cell can no longer pass, despite its intrinsic deformability, required to ensure adequate oxygenation.(20)

4.6. IHC for detection of mutant p53 protein

Immunoperoxidase staining was performed on deparaffinized sections after microwave antigen retrieval and quenching of endogenous peroxidase activity.(21) Mouse monoclonal IgG antibody raised against p53 protein (Ab-12; Oncogene Research Products, San Diego, CA) was diluted to 2 µg/mL and incubated with the sections at 4°C for 12 hrs. Sections were then incubated for 45 min at RT with biotinylated anti-mouse secondary antibody (Vectastain Kit; Vector Laboratories Inc, Burlington, ON, Canada) diluted 1:200. Each slide was further incubated for 45 min at RT with ABC reagent, (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories Inc, Burlington, ON, Canada) then for 15 min at RT in 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride. Sections were counterstained in 33% hematoxylin for 30 sec, quickly rinsed in distilled water, then mounted (Aquamount®; Lerner Laboratories, Pittsburg, PA). Non-specific staining was verified by omitting the primary antibody. Normal skin samples served as negative controls, while equine ocular squamous cell carcinoma samples were used as positive controls.(22)

Specific nuclear immunostaining was viewed with a Nikon Eclipse-400 microscope, in a blinded fashion by two observers. Scores were attributed for the number of positive cells and for the intensity of staining. At least four contiguous 10X fields in each of three regions (wound edge; wound center; adjacent intact skin) were graded in the following manner for percentage: grade 0 = <5%; grade 1 = 6-19%; grade 2 = 20-39%; grade 3 = >40%, and for intensity: grade 0 = weak; grade 1 = strong. A total score (maximum value of 4) was then calculated based on the weight of each criteria where percentage of positive cells = 80%; intensity of stain = 20%.

4.7. TUNEL for detection of apoptosis

The presence of apoptotic cells was revealed by the TUNEL method, using a commercial kit (TdT-FragEL; Oncogene Research Products, San Diego, CA), and following the manufacturer's instructions. Optimal dilution for the labelling mixture was found to be 1:32, by testing with appropriate positive and negative control specimens. Negative controls received the label solution without TdT, while positive controls were pre-treated with DNase I in order to artificially fragment DNA and imitate apoptosis. A mixture of HL60 cells (JA1609; Oncogene Research Products, San Diego, CA) incubated with actinomycin D to induce apoptosis served as a second positive control.

Apoptotic cells detected by TUNEL showed positive nuclear staining under light microscopy. The entire section was examined in a blind fashion by two observers and the number of stained nuclei was determined at the junction between old and new epithelium. The average percentage of apoptotic cells per specimen was calculated by counting the number of apoptotic cells over the number of total cells for all samples. A semi-quantitative apoptosis index was derived based on the presence of apoptotic cells where grade 0 = none; grade 1 = weak presence; grade 2 = strong presence.

4.8. Statistical analyses

The weighted kappa coefficient was used to assess inter-observer agreement with values of 0,4 and lower indicative of poor agreement. We used repeated-measures logistic regression models, with time and treatment as repeated factors, to analyze histological, TEM, IHC and TUNEL data. A priori contrasts involving different time and treatment levels were conducted. Exponentiating regression parameters obtained from these models yielded odds ratios. We also conducted contrasts between treatment levels at each time period using the Cochran-Mantel-Haenszel test controlling for horse identity. All analyses were carried out with a p value < 0,05, using SAS v. 8,2. (Cary, N. C.).

5. Results

5.1. General

Signs of lameness were not observed after surgery. Exuberant granulation tissue developed in all bandaged limb wounds approximately one week postoperatively. Other wounds healed uneventfully and did not develop proud flesh at any time during the study.

5.2. Histology

Inter-observer agreement was good for all histological criteria. There was a significant effect of treatment and time for the size of the inflammatory site (Figure 1A). Over time, the site was larger in bandaged limb compared to both unbandaged limb ($p = 0,004$) and thoracic wounds ($p < 0,0001$), and larger in unbandaged limb compared to thoracic wounds ($p < 0,0001$). The inflammatory response to wounding resolved more rapidly in thoracic wounds, to completely disappear by 3 weeks. Regression occurred more slowly in limb wounds, in which inflammation was still present at the end of study.

By the end of the study, most wounds were completely epithelialized regardless of their location, however the epithelial margin advanced more rapidly in thoracic than in bandaged ($p = 0,02$) and unbandaged limb wounds ($p < 0,0001$) (Figure 1B).

Over time, angiogenesis within bandaged and unbandaged limb wounds was similar. It was less pronounced, however, in thoracic compared to limb wounds, both bandaged ($p < 0,0001$) and unbandaged ($p < 0,0001$). Angiogenesis was increased at weeks 2, 3 and 4 compared to week 1, for all treatments ($p < 0,006$) (Figure 1C).

There was a significant effect of time and treatment on fibroblast organization. After the first week, fibroblast alignment within the granulation tissue improved with time in all wounds ($p < 0,004$). Organization was best in thoracic wounds and worst in bandaged limb wounds, such that over time a significant difference existed between scores obtained for thoracic wounds and limb wounds both bandaged ($p < 0,0001$) and

unbandaged ($p = 0,0006$), as well as between bandaged and unbandaged limb wounds ($p = 0,0004$) (Figure 1D).

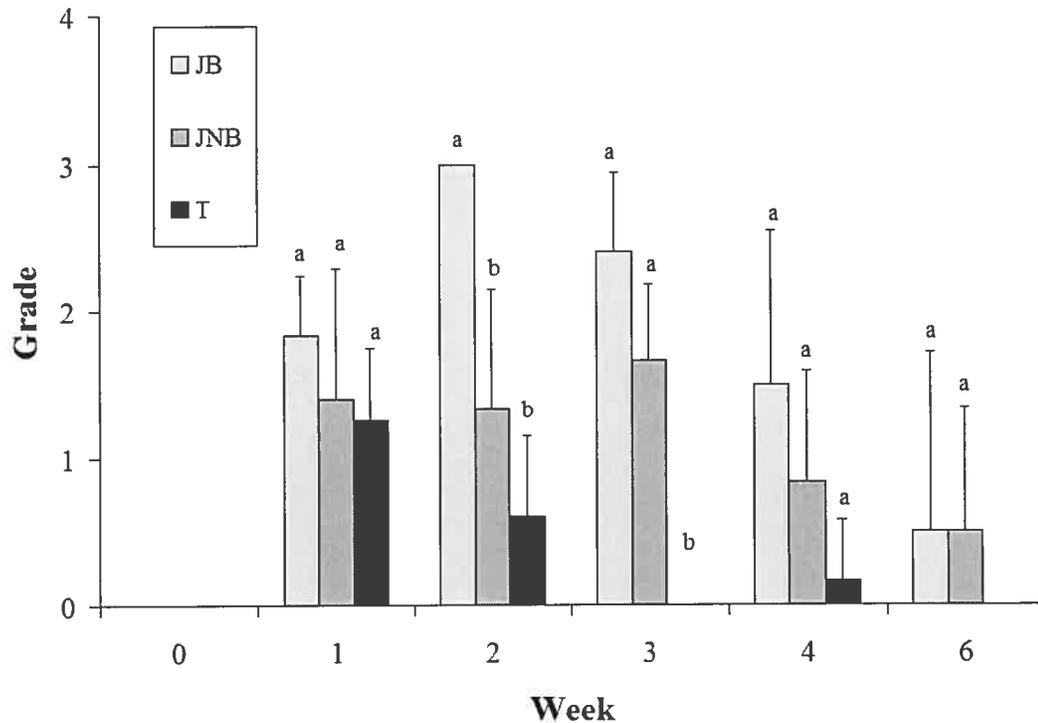


Figure 1A: Histological evaluation of the size of inflammatory site of limb and thoracic wounds as a function of time, using a semi-quantitative grading scale. T = thoracic wound; JB = bandaged limb wound; JNB = unbandaged limb wound. Means that share one letter are not statistically significantly different. Inflammation was graded as 0 when absent; 1 when the diameter of the inflammatory focus measured less than twice the thickness of the intact epidermis overlying the area adjacent to the wound; 2 when this diameter measured between two and five times the thickness of the intact epidermis; and 3 when this diameter measured more than five times the thickness of the intact epidermis.

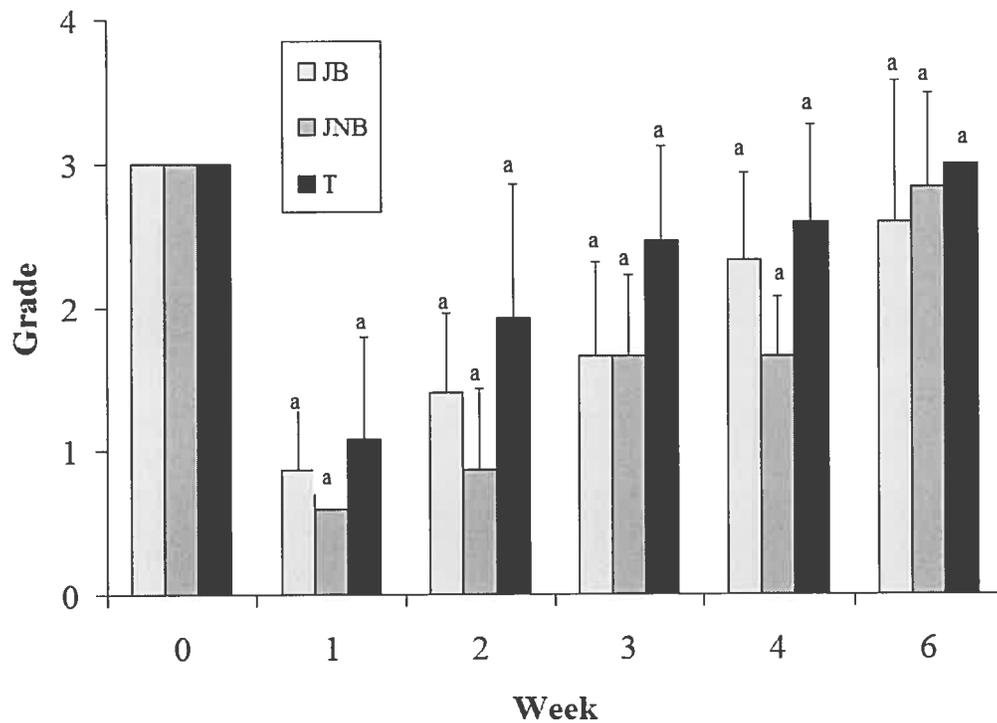


Figure 1B: Histological evaluation of the rate of epithelialisation of limb and thoracic wounds as a function of time, using a semi-quantitative grading scale. T = thoracic wound; JB = bandaged limb wound; JNB = unbandaged limb wound. Means that share one letter are not statistically significantly different. Progression of the epithelial margin was graded as 0 when no new epithelium was observed at the wound margin; 1 when new epithelium had advanced to cover one third of the granulation tissue present in the biopsy; 2 when the new epithelium had advanced to cover two thirds of the granulation tissue present in the biopsy; and 3 when epithelialization was complete.

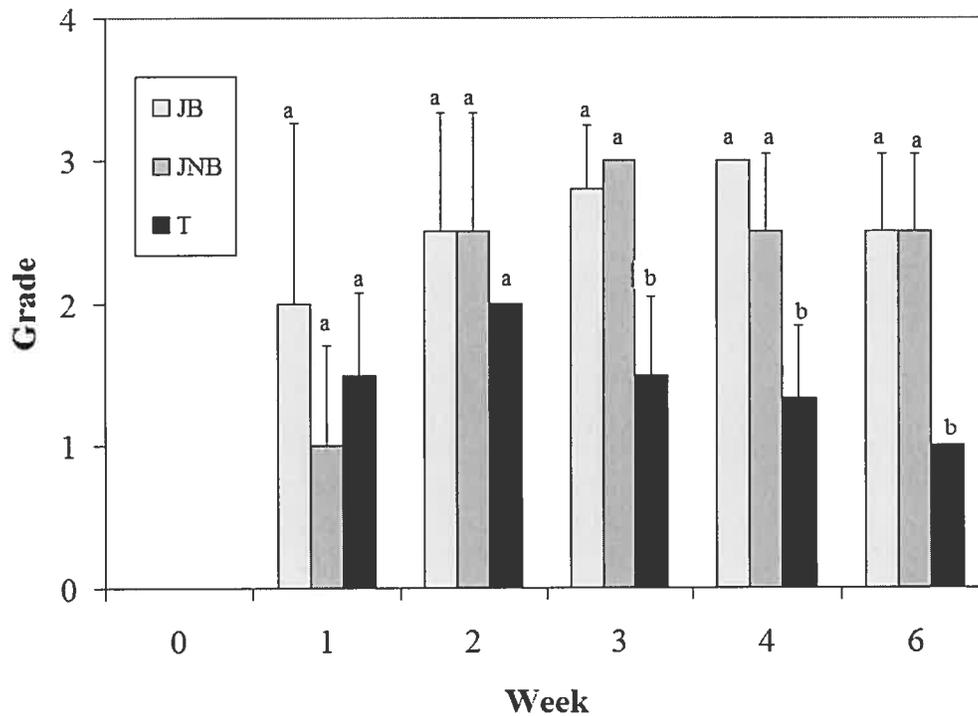


Figure 1C: Histological evaluation of the angiogenesis of limb and thoracic wounds as a function of time, using a semi-quantitative grading scale. T = thoracic wound; JB = bandaged limb wound; JNB = unbandaged limb wound. Means that share one letter are not statistically significantly different. Angiogenesis was graded as 0 when no new capillaries were apparent within the wound bed; 1 when between one and five new capillaries were present; 2 when between six and 15 new capillaries were present; and 3 when more than 15 new capillaries were present.

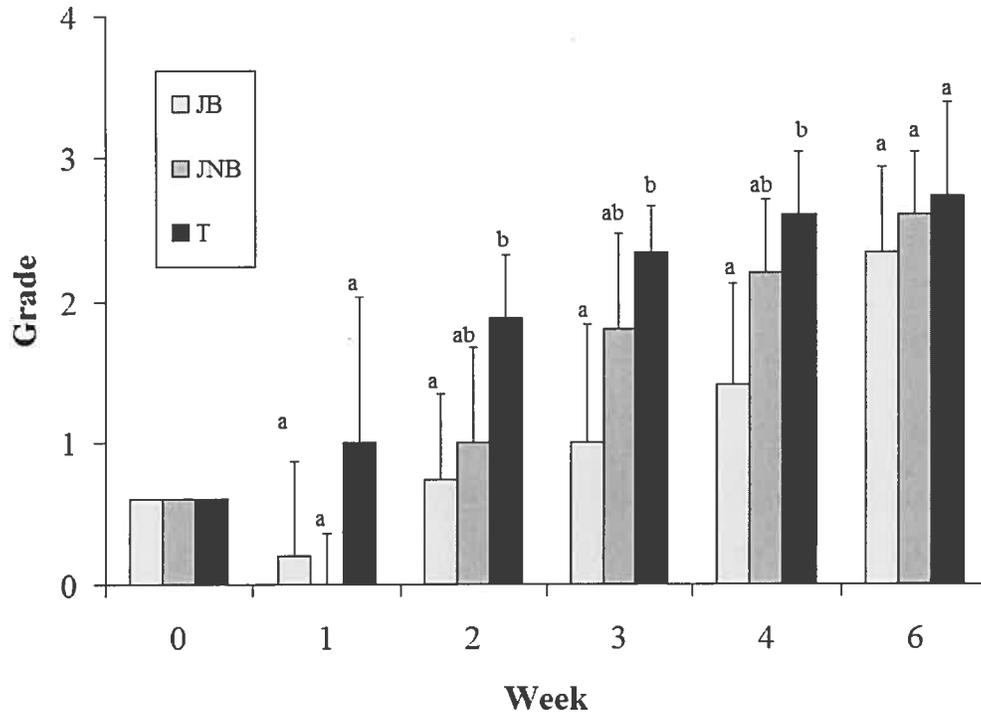


Figure 1D: Histological evaluation of the fibroblast organisation of limb and thoracic wounds as a function of time, using a semi-quantitative grading scale. T = thoracic wound; JB = bandaged limb wound; JNB = unbandaged limb wound. Means that share one letter are not statistically significantly different. Fibroplasia was graded as 0 when no fibroblasts were apparent within the wound bed; 1 when the fibroblasts adopted a chaotic arrangement; 2 when fibroblast organization was moderate; and 3 when fibroblasts were well aligned, their long axes parallel to one another and to the wound surface.

5.3. TEM (microvascular occlusion)

Diameters of four hundred and forty one microvessels distributed equally in each category (time and treatment) were calculated. Microvessel occlusion was 3,37 times more likely in bandaged limb compared to thoracic wounds ($p = 0,003$) and 2,22 times more probable in unbandaged limb compared with thoracic wounds ($p = 0,01$), regardless of postoperative time. There were no differences amongst limb wounds, whether bandaged or not ($p = 0,34$) (Figures 2, 3A, 3B).

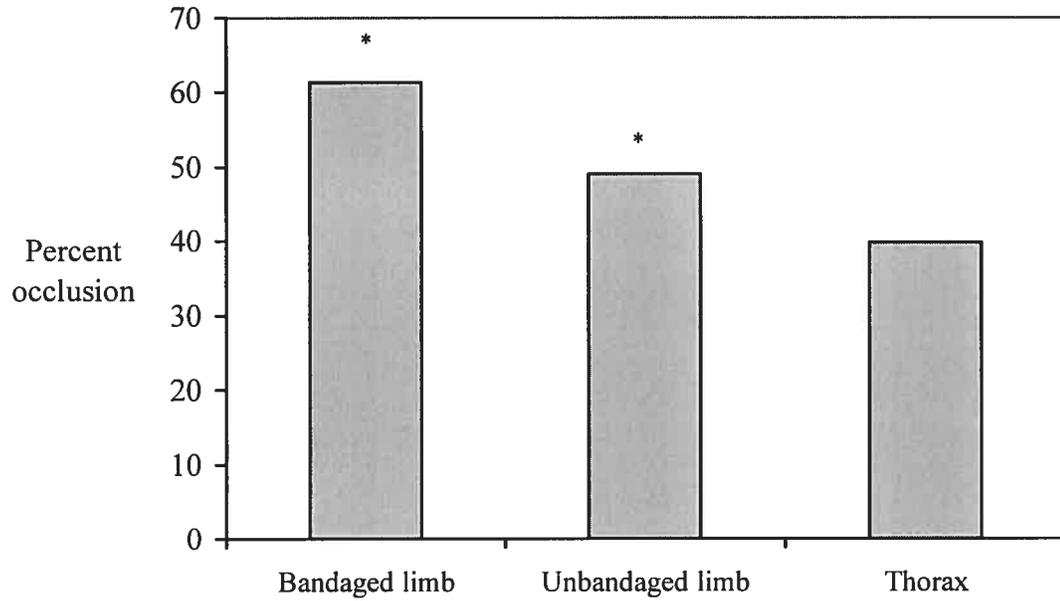


Figure 2: Percentage of microvessel occlusion based on location and treatment. * indicates that results are statistically significantly different from those which don't have *.

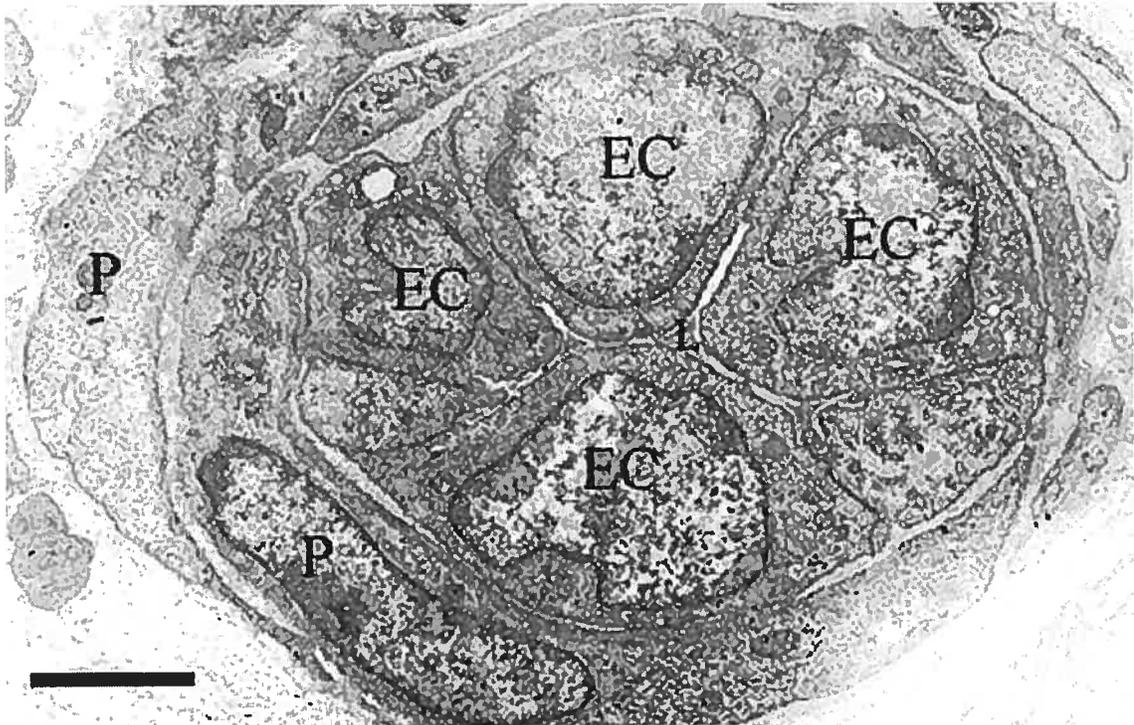


Figure 3A: Occluded microvessel from a bandaged limb wound one week postoperatively, as seen with transmission electron microscopy. L = lumen, EC = endothelial cells, P = pericyte. The lumen of this microvessel presents a minimal diameter inferior to $0,3 \mu\text{m}$; it is thus considered occluded. Bar = $2 \mu\text{m}$.

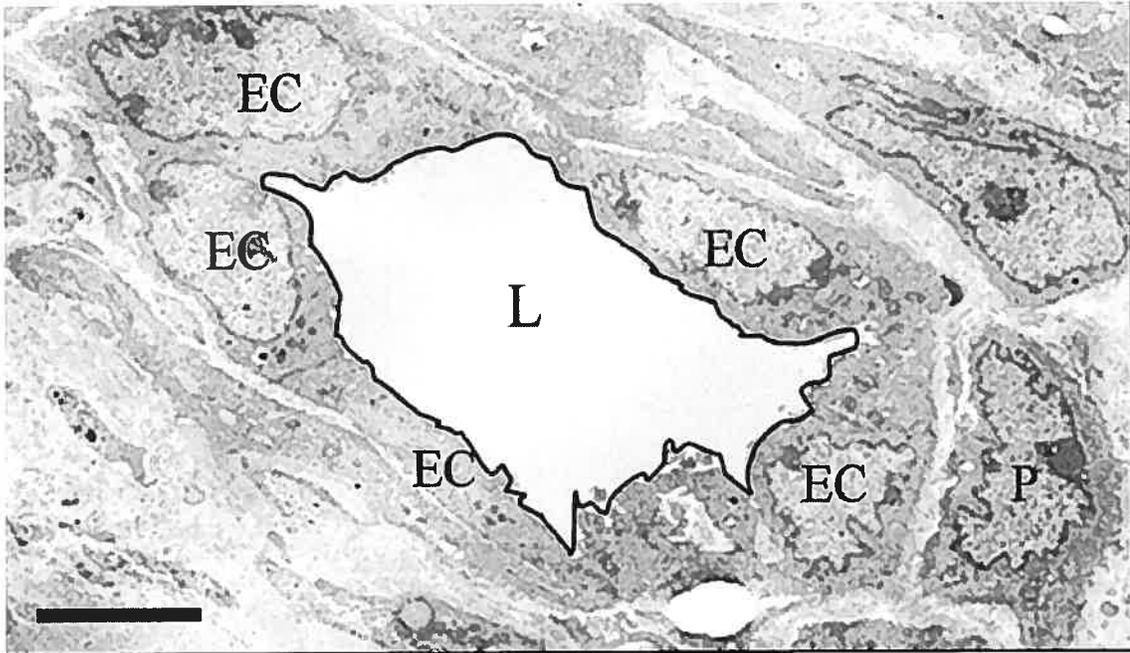


Figure 3B: Patent microvessel from an unbandaged limb wound, three weeks postoperatively, as seen with transmission electron microscopy. L = lumen, EC = endothelial cell, P = pericyte. Luminal dimensions are as follows: Feret's diameter = 8,5 μm and minimum diameter 3,9 μm . Bar = 2 μm .

5.4. IHC (mutant p53 protein)

Distribution of the antigen within each biopsy sample followed a consistent, regional pattern, where positive nuclear staining was primarily present in epithelial cells of the *stratum basale* and in superficial fibroblasts at the wound edge as well as in newly migrating epithelial cells (Figures 4A, 4B, 4C). It was very rare to see positive cells in deeper layers of the dermis or in the adjacent, intact epithelium. Inter-observer agreement was very good with a kappa value varying between 0,90 and 0,95.

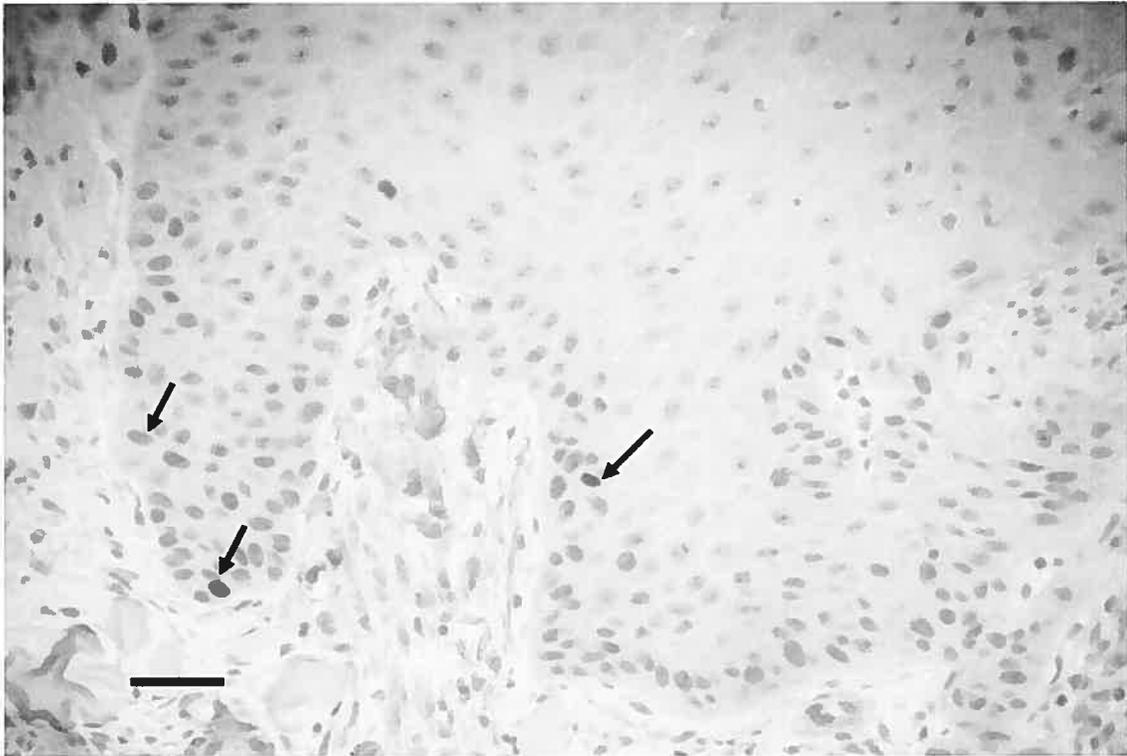


Figure 4A: Immunohistochemical localization of mutant p53 protein in epithelial cells of the *stratum basale* of new epithelium from an unbandaged limb wound one week postoperatively. Note positively-stained (maroon) nuclei indicated by arrows. Cytoplasmic staining in dermis is non-specific. Bar = 25 μ m.

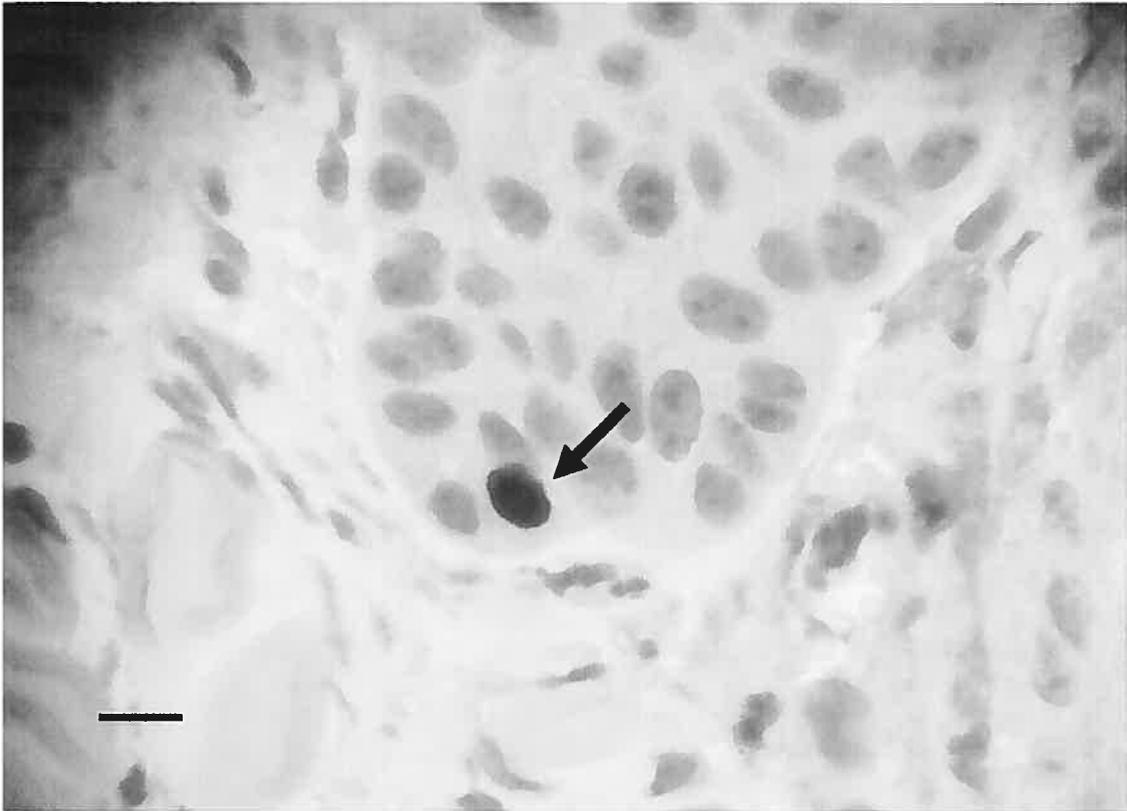


Figure 4B: Greater magnification of Figure 4A. Bar = 10 μm .

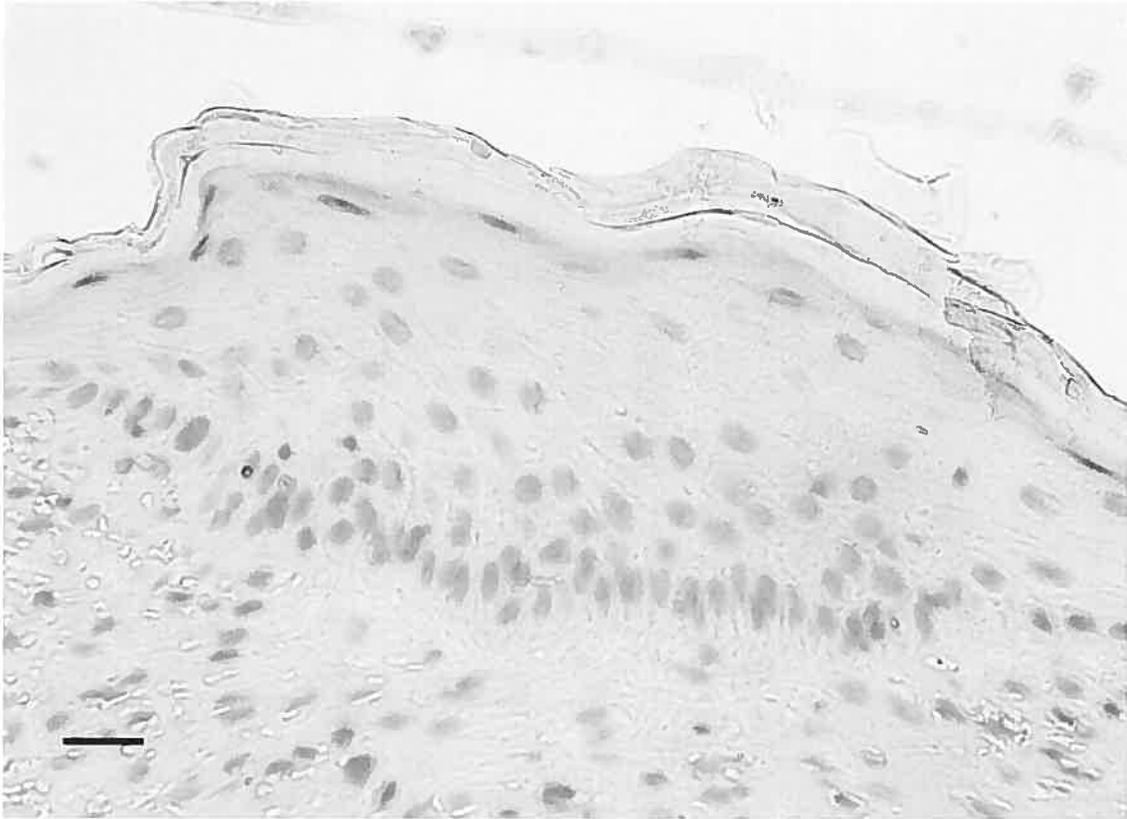


Figure 4C: Nuclear staining for mutant p53 protein is absent in the new epithelium of a thoracic wound, one week postoperatively. Bar = 25 μ m.

Epithelial cells at the wound edge

At the junction between old and new epithelium there was more staining for mutant p53 in bandaged limb compared with thoracic wounds ($p = 0,044$), but no differences between unbandaged limb and thoracic wounds ($p = 0,15$) or between unbandaged and bandaged limb wounds ($p = 0,58$). No difference in staining was observed over time ($p = 0,07$) in this particular region of the biopsy.

Migrating cells

Within cells of the migrating epithelium there was more staining in both bandaged ($p = 0,0005$) and unbandaged ($p = 0,019$) limb compared with thoracic wounds, but no differences between bandaged and unbandaged limb wounds ($p = 0,14$). Over time there was less staining for mutant p53 in week 3 ($p = 0,018$), week 4 ($p = 0,09$) and week 6 ($p = 0,001$) compared with weeks 1 and 2.

Within fibroblasts located directly beneath migrating epithelium, there was likewise more staining in bandaged ($p = 0,0003$) and unbandaged ($p < 0,0001$) limb

compared with thoracic wounds ($p = 0,0003$), but no differences between limb wounds, whether bandaged or not ($p = 0,86$), and staining did not vary with time ($p > 0,37$).

5.5. TUNEL (apoptosis)

Inter-observer agreement for the quantification of apoptotic cells was maximal. In normal intact skin, a few TUNEL-positive cells were detected in hair follicles and sebaceous glands. In wound samples, apoptosis of epithelial cells occurred principally in the new, migrating epithelium and at the junction between old and new epithelium. Moreover, apoptotic activity was concentrated in the basal cell layer while other layers only rarely displayed apoptotic cells. Apoptotic activity, although to a lesser extent, was also observed in superficial fibroblasts. Apoptotic activity was maximal at weeks 3 ($p = 0,01$), and 4 ($p = 0,03$), however, TUNEL data did not support that more apoptosis was occurring in thoracic wounds than in limb wounds.

6. Discussion

An important challenge facing the equine practitioner treating a traumatic wound that must heal by second intention is the development of exuberant granulation tissue. Although several veterinary publications address the management of problematic wounds, the pathogenesis of excess scarring in the horse remains unresolved.

In the current study we addressed both repair in different anatomic sites, and, via the use of a reproducible model,(16,17) dysregulated repair associated with the development of exuberant granulation tissue, over an extended period of time. Our histological observations of wounds located on the body and the limb are consistent with those previously reported,(5) while we have provided new data for wounds afflicted with proud flesh. Specifically, the inflammatory response was greater as well as protracted in limb wounds, particularly those developing exuberant granulation tissue. Wound repair is a finely orchestrated process involving overlapping phases that include acute inflammation, cellular proliferation, and finally, extracellular matrix synthesis and remodeling. A prolonged inflammatory phase will retard healing and encourage the development of chronic proliferation of fibroblastic granulation via the up-regulation of various inflammatory and fibrogenic mediators.

Although in the current study most wounds were healed six weeks following their creation, epithelial migration occurred more rapidly in thoracic wounds. The delay in epithelialization of limb wounds, particularly those developing proud flesh, could result from the stronger and prolonged inflammatory response, which would favor the expression of fibrogenic cytokines such as transforming growth factor-beta (TGF- β), known to inhibit proliferation of epithelial cells.(23) Alternatively, exuberant granulation tissue may represent a physical obstacle to the migration of epithelial cells. The two processes contributing to wound closure during second intention repair are wound contraction and epithelialization. It has been shown that the former mechanism is defective in limb wounds;(24) since epithelial migration is also sluggish in this anatomical location, the clinical outcome in large and deep limb wounds is delayed closure.

We confirmed the previous finding that fibroblast organization within the granulation tissue of body wounds is superior to that of limb wounds (5) and extended this observation to wounds developing exuberant granulation tissue. As a wound matures, fibroblasts should either disappear by apoptosis or convert to a myofibroblast phenotype in order to achieve wound contraction. Wilmsink previously showed that mitotic activity within the granulation tissue of limb wounds of horses is double that found in body wounds.(5) Furthermore, the chaotic arrangement of fibroblasts within the granulation tissue of limb wounds, in particular those displaying excessive fibroplasia, might preclude the generation of efficient centripetal forces and be responsible for the deficient contraction observed clinically.

Histological scores for angiogenesis parallel the more abundant granulation tissue in limb wounds, particularly those developing proud flesh. In some fibrotic conditions, such as diabetic nephropathy, altered levels of growth factors have been linked to the genesis of microvascular disease and interstitial fibrosis via the paracrine stimulation of interstitial fibroblasts by adjoining renal epithelial cells (25,26). We and others have provided preliminary data supporting regional differences in cytokine expression during cutaneous wound repair in horses (6,27), which might in some way explain the microvascular occlusion documented herein.

While tissue oxygenation was not measured, the cut-off values used to determine microvascular occlusion by TEM were based on previous investigations showing that vessels with such narrow lumens cannot sustain aerobic metabolism.(19,20,28,29) We thus hypothesize that the microvascular occlusion observed in limb wounds would generate an hypoxic wound environment, which consequently should enhance the angiogenic response, as confirmed histologically. Thus, although the granulation tissue that commonly develops in distal limb wounds of the horse contains numerous microvessels, these may be partially or totally obstructed, which maintains a deficient oxygen gradient within the wound and, paradoxically, exacerbates angiogenesis. Furthermore, hypoxia is known to stimulate TGF- β synthesis (30) and up-regulate the expression of its receptors,(31) which will enhance collagen production by fibroblasts and may promote myofibroblast survival with concomitant intensification of extracellular matrix deposition, by preventing the cell from undergoing apoptosis.(32) This is

consistent with our previous studies which documented that high concentrations of this fibrogenic cytokine persist in limb wounds,(6) particularly those in which fibroplasia is excessive.(16) It is interesting to note that microvascular occlusion has also been detected in various dermal fibrotic conditions in humans, including dermal keloids and hypertrophic scars. Specifically, one hypothesis advanced to explain the pathogenesis of keloids involves hypoxia as a triggering event.(33)

It is possible that microvascular luminal occlusion reflects differences in perivascular pressure, which itself may be linked to the inflammatory reaction in the surrounding tissues. While we did not control for this in our sampling for TEM, the potential relationship between inflammation, pericytes and endothelial cells may explain some of the differences we noted.(34)

Wound repair must reach equilibrium between proliferation and elimination to exhibit a steady-state mature scar rather than excessive fibrosis. Customarily, as the wound becomes epithelialized there is marked decrease in cellularity. Apoptosis is thought to be one mechanism by which cells are removed during scar establishment, possibly through signals from the new, migrating epithelial cells.(8,9) Several studies have confirmed that in the course of pathologic scarring in man, apoptosis is aberrant and the cells contributing to granulation tissue formation are not eliminated.(10,11,15,35) Similarly, results from another study evoked deficient apoptosis of inflammatory cells during the repair of limb wounds in horses, although this remains unproven.(5)

Normal cellular proliferation is regulated by growth-promoting proto-oncogenes counterbalanced by growth-constraining tumor-suppressor genes such as p53, and regulators of apoptosis such as the Bcl-2 gene family. Bcl-2, a known inhibitor of apoptosis, is down-regulated by p53 protein.(13) Conversely, it is up-regulated when p53 undergoes mutation that renders it non-functional; the consequence is inhibition of apoptosis coupled with uncontrolled cellular proliferation.

In the current study we assessed the contribution of apoptosis to normal repair of body and limb wounds as well as to excessive fibroplasia. We observed that epithelial cells from both the wound edge and the migratory front, as well as underlying fibroblasts, displayed increased mutant p53 protein expression in limb wounds, particularly those developing exuberant granulation tissue. Immunohistochemistry reliably documents the

presence of only the mutant form of p53 since wild-type p53 has too short a half-life to accumulate in sufficient quantities to allow its detection.(36,37)

Interestingly, mutant p53 also accumulates in keloid tissues of human patients.(10) Furthermore, a causal relationship has recently been established between the mutant form of the protein and the development of keloids via confirmation that focal mutations in p53 are present in keloid samples but not in healthy skin samples from human patients.(15) Taken together, this evidence suggests that p53 gene mutation is a key regulator in the formation of keloids and possibly other dermal hyperproliferative conditions.

A benefit of using immunohistochemistry to elucidate the role of apoptosis in wound repair is the ability of this method to identify key cellular players. Thus, we found that epithelial cells in particular express the mutant form of p53. It is noteworthy that Funayama *et al*(38) showed that epithelial cells overlying keloid lesions play an important role in keloidogenesis by promoting more proliferation and less apoptosis in the underlying fibroblasts through paracrine and double paracrine effects. Although “proud flesh” lacks an epithelial cover, it is believed to share a similar basis of development with human keloids.

Finally, p53 is up-regulated during hypoxia (39) as is Bcl-2, which protects against hypoxic apoptosis.(40) It is significant to note that we found more occluded microvessels in limb wounds, as well as more mutant p53 protein within cells populating limb wounds. We have documented herein that microvascular occlusion is more prominent in limbs wounds of horses, and we hypothesize that a relationship may exist between this observation and the expression of mutant p53 protein.

In the current study we were unable to confirm quantitatively that more apoptosis was occurring in thoracic wounds than in limb wounds. Although the TUNEL method is widely employed, we, and others,(41) found the technique somewhat challenging in that it was at times difficult to differentiate proliferating, apoptotic and necrotic cells. Indeed, oligonucleosomal fragmentation is not an obligate feature of apoptosis; second, the availability of the nucleosomal material depends on the pretreatment procedure; and third, the enzyme activity can differ depending on the tissue, the kit used, and the

physical conditions of the experiment such that it is impossible to use one standardized protocol.(42)

In conclusion, this study offers evidence of morphologic and physiologic differences in the repair processes of body and limb wounds in horses. It confirms that protracted inflammation as well as sluggish epithelialization and disorganized wound contraction afflict limb wounds, particularly those with excessive fibroplasia. Furthermore, data generated by this investigation impart novel information with regards to the mechanisms whereby excessive quantities of extracellular matrix components accumulate within limb wounds. Specifically, microvascular occlusion and a dysregulated apoptotic process may be involved.

Further studies should verify the presence of hypoxia within tissues of limb wounds and track p53 DNA mutations in tissues and cultured fibroblasts from skin lesions of horses with exuberant granulation tissue. Likewise, an attempt should be made to elucidate the association between hypoxia and apoptosis in this pathology. This might then provide a basis for the development of targeted cellular and molecular therapies to prevent and treat excessive fibroplasia in equine wounds.

7. Acknowledgments

Bandage materials were generously donated by Smith-Nephew Canada. Research was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, as well as the Fonds Québécois pour la Recherche en Nature et Technologie (FQRNT) of Québec and the Fonds du Centenaire de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. The authors thank Josiane Lefebvre-Lavoie, Mira Dobias-Goff, Danielle Fontaine and Céline Lusignan-Lussier for technical assistance, as well as Guy Beauchamp for statistical analysis and Marco Langlois for help with the figures.

8. References

- 1-Wilmink JM, van Herten J, van Weeren PR, Barneveld A. Retrospective study of primary intention healing and sequestrum formation in horses compared to ponies under clinical circumstances. *Equine Vet J* 2002;34: 270-273.
- 2-Jacobs KA, Leach DH, Fretz PB, Townsend HGG. Comparative aspects of the healing of excisional wounds on the leg and body of horses. *Vet Surg* 1984;13: 83-90.
- 3-Kischer CW. The microvessels in hypertrophic scars, keloids and related lesions: a review. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1992;24(2): 281-296.
- 4-Kischer CW, Shetlar MR. Microvasculature in hypertrophic scars and the effects of pressure. *J Trauma* 1979;19(10): 757-764.
- 5-Wilmink JM, Van Weeren PR, Stolk PW, Van Mil FN, Barneveld A. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. *Equine Vet J* 1999;31(1): 61-67.
- 6-Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, Gordon JR. Expression of transforming growth factor β_1 , β_3 and basic fibroblast growth factor in full-thickness skin wounds of equine limbs and thorax. *Vet Surg* 2001;30(3): 269-277.
- 7-Schwartz AJ, Wilson DA, Keegan KG, Ganjam VK, Sun Y, Weber KT, Zhang J. Factors regulating collagen synthesis and degradation during second-intention healing of wounds in the thoracic region and the distal aspect of the forelimb of horses. *Am J Vet Res* 2002;63(11): 1564-1570.
- 8-Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30(9): 1019-30.
- 9-Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995;146(1): 56-66.
- 10-Ladin DA, Hou Z, Patel D, McPhail M, Olson JC Saed GM, Fivenson DP. p53 and apoptosis alterations in keloids and keloids fibroblasts. *Wound Rep Reg* 1998;6(1): 28-37.

- 11-Sayah DN, Soo C, Shaw WW, Watson JW, Messadi D, Longaker MT, Zhang X, Ting, K. Downregulation of apoptosis-related genes in keloid tissues. *J Surg Res* 1999;87(2): 209-216.
- 12-Messadi DV, Le A, Berg S, Jewett A, Wen Z, Kelly P, Bertolami CN. Expression of apoptosis-associated genes by human dermal scar fibroblasts. *Wound Repair Regen.* 1999;7(6): 511-517.
- 13-Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* 2003;116: 4077-4085.
- 14-King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998;60: 601-617.
- 15-Saed GM, Ladin D, Olson J, Han X, Hou Z, Fivenson D. Analysis of p53 gene mutations in keloids using PCR-based single-strand conformational polymorphism and DNA sequencing. *Arch Dermatol* 1998;134(8): 963-967.
- 16-Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, Gordon JR. Preliminary observations on expression of transforming growth factor β_1 , β_3 and basic fibroblast growth factor in equine limb wounds healing normally or with proud flesh. *Vet Surg* 2002;31(3): 266-277.
- 17-Barber SM. Second intention wound healing in the horse: the effect of bandages and topical corticosteroids, in *Proceedings of the Am Assoc Equine Pract* 1989; 35:107.
- 18-Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, Townsend HGG, Archer J. Repair and function of synovium after arthroscopic synovectomy of the dorsal compartment of the equine antebrachiocarpal joint. *Vet Surg* 1996;25: 142-153.
- 19-Smith JE, Mohandas N, Shohet SB. Variability in erythrocyte deformability among various mammals. *Am Physio Soc* 1979;236(5): H725-730.
- 20-Henquell L, Lacelle PL, Honig, CR. Capillary diameter in rat heart *In Situ*: relation to erythrocyte deformability, O₂ transport and transmural O₂ gradients. *Microvasc Res* 1976;12(3): 259-274.

- 21-De Martin I, Theoret CL. Spatial and temporal expression of types I and II receptors for transforming growth factor β in normal equine skin and dermal wounds. *Vet Surg* 2004;33(1): 70-76.
- 22-Martens A, De Moor A, Demeulemeester J, Ducatelle R. Histopathological characteristics of five clinical types of equine sarcoid. *Res Vet Sci* 2000;69: 295-300.
- 23-Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta. Multiple actions and potential clinical applications. *J Am Med Assoc* 1989;262(7): 938-941.
- 24-Wilmink JM, Stolk PW, van Weeren PR, Barneveld A. Differences in second intention wound healing between horses and ponies: macroscopic aspects. *Equine Vet J* 1999;31(1): 53-60.
- 25-Woolf AS, Bosch RJ, Fine LG. Growth factors in the pathogenesis of renovascular complications of diabetes mellitus. *J Hypertens Suppl.* 1992;10(1): S11-6.
- 26-Berlanga J, Cibrian D, Guillen I, Freyre F, Alba JS, Lopez-Saura P, Merino N, Aldama A, Quintela A, Triana M, Montequin JF, Ajamieh H, Urquiza D, Ahmed N, Thornalley PJ. Methylglyoxal administration induces diabetes-like microvascular changes and perturbs the healing process of cutaneous wounds. *Clin Sci (Lond)*. 2005: 9.
- 27-Van Den Boom R, Wilmink JM, O'Kane S, Wood J, Ferguson MWJ. Transforming growth factor- β levels during second-intention healing are related to the different course of wound contraction in horses and ponies. *Wound Rep Reg.* 2002;10(3): 188-194.
- 28-Canham PB, Potter RF, Woo D. Geometric accommodation between the dimensions of erythrocytes and the calibre of heart and muscle capillaries in the rat. *J Physiol* 1984;347: 697-712.
- 29-Secomb TW, Hsu R. Motion of red blood cells in capillaries with variable cross-sections. *J Biomech Eng* 1996;118: 538-544.
- 30-Hakkinen L, Westermarck J, Kahari VM, Larjava H. Human granulation tissue fibroblasts show enhanced proteoglycan gene expression and altered response to TGF- β 1. *J Dent Res* 1996;75(10): 1767-1778.

- 31-Falanga V, Qian SW, Danielpour D, Katz MH, Roberts AB, Sporn MB. Hypoxia upregulates the synthesis of TGF- β 1 by human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1991;97(4): 634-637.
- 32-Zhang HY, Phan SH. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor β 1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21(6): 658-665.
- 33-Ladin DA, Garner WL, Smith DJ. Excessive scarring as a consequence of healing. *Wound Rep Reg* 1995;3: 6-14.
- 34-Sims DE. Diversity within pericytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27: 842-846.
- 35-Luo S, Benathan M, Raffoul W, Panizzon RG, Egloff DV. Abnormal balance between proliferation and apoptotic cell death in fibroblasts derived from keloid lesions. *Plast Reconstr Surg* 2001;107(1): 87-96.
- 36-Blagosklonny MV. Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene* 1997;15(16): 1889-1893.
- 37-Wang X, Rao SM, Yeldandi AV. Immunohistochemical analysis of p53 mutations in bronchioloalveolar carcinoma and conventional pulmonary adenocarcinoma. *Modern Pathol* 1995;8(9): 919-923.
- 38-Funayama E, Chodon T, Oyama A, Sugihara T. Keratinocytes promote proliferation and inhibit apoptosis of the underlying fibroblasts: an important role in the pathogenesis of keloids. *J Invest Dermatol* 2003;121(6): 1326-1331.
- 39-Chopp M, Zhang Z, Freytag S. p53 expression in brain after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182(3): 1201-2107.
- 40-Shimizu S, Eguchi Y, Kosaka H, Kamiike W, Matsuda H, Tsujimoto YL. Prevention of hypoxia-induced cell death by bcl-2 and bcl-xL. *Nature* 1995;374(6525): 811-813.
- 41-Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. *In situ* detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995; 21(5): 1465-1468.

42-Bozena, B et Sticherling, M. How specific is the TUNEL reaction?: an account of a histochemical study on human skin. *Am J Dermatopatho* 2002;24(2): 130-134.

9. Figure legends

Figure 1: Histological evaluation of limb and thoracic wounds as a function of time, using a semi-quantitative grading scale. T = thoracic wound; JB = bandaged limb wound; JNB = unbandaged limb wound. Means that share one letter are not statistically significantly different.

A: Size of inflammatory site; inflammation was graded as 0 when absent; 1 when the diameter of the inflammatory focus measured less than twice the thickness of the intact epidermis overlying the area adjacent to the wound; 2 when this diameter measured between two and five times the thickness of the intact epidermis; and 3 when this diameter measured more than five times the thickness of the intact epidermis.

B: Epithelialization; progression of the epithelial margin was graded as 0 when no new epithelium was observed at the wound margin; 1 when new epithelium had advanced to cover one third of the granulation tissue present in the biopsy; 2 when the new epithelium had advanced to cover two thirds of the granulation tissue present in the biopsy; and 3 when epithelialization was complete.

C: Angiogenesis; angiogenesis was graded as 0 when no new capillaries were apparent within the wound bed; 1 when between one and five new capillaries were present; 2 when between six and 15 new capillaries were present; and 3 when more than 15 new capillaries were present.

D: Fibroblast organization; fibroplasia was graded as 0 when no fibroblasts were apparent within the wound bed; 1 when the fibroblasts adopted a chaotic arrangement; 2 when fibroblast organization was moderate; and 3 when fibroblasts were well aligned, their long axes parallel to one another and to the wound surface.

Figure 2: Percentage of microvessel occlusion based on location and treatment.

Figure 3A: Occluded microvessel from a bandaged limb wound one week postoperatively, as seen with transmission electron microscopy. L = lumen, EC = endothelial cells, P = pericyte. The lumen of this microvessel presents a minimal diameter inferior to 0,3 μm ; it is thus considered occluded. Bar = 2 μm .

Figure 3B: Patent microvessel from an unbandaged limb wound, three weeks postoperatively, as seen with transmission electron microscopy. L = lumen, EC = endothelial cell, P = pericyte. Luminal dimensions are as follows: Feret's diameter = 8,5 μm and minimum diameter 3,9 μm . Bar = 2 μm .

Figure 4A: Immunohistochemical localization of mutant p53 protein in epithelial cells of the *stratum basale* of new epithelium from an unbandaged limb wound one week postoperatively. Note positively-stained (brown) nuclei. Cytoplasmic staining in dermis is non-specific. Bar = 25 μm .

Figure 4B: Greater magnification of Figure 4A. Bar = 10 μm .

Figure 4C: Nuclear staining for mutant p53 protein is absent in the new epithelium of a thoracic wound, one week postoperatively. Bar = 25 μm .

Discussion générale

Un important défi lors de guérison de plaie chez le cheval est d'éviter la formation de tissu de granulation exubérant se développant principalement sur la partie distale des membres. La guérison est un processus hautement organisé et le moindre dérèglement dans ses phases peut mener à la formation de cicatrices anormales, tels les chéloïdes chez l'homme. Chez le cheval, de nombreuses études se concentrent sur l'élaboration d'un plan de traitement visant à prévenir la formation du bouton de chair. Cependant, il serait primordial d'en connaître d'abord la base physiologique, les traitements ensuite élaborés n'en seraient que plus efficaces de par leur action plus ciblée.

Le modèle expérimental utilisé ici englobe la guérison normale sur le thorax ainsi que la guérison normale et anormale sur la partie distale des membres, ce sur une période s'étalant sur 6 semaines. L'utilisation de bandages sur les plaies de membres se révèle un moyen efficace de créer une surproduction de tissu de granulation et donc de reproduire les conditions de guérison anormale. Ce modèle se révèle très reproductible en milieu expérimental (Barber, 1989; Théoret et coll., 2002; Berry et Sullins, 2003).

Les données histologiques obtenues quant à la réaction inflammatoire corroborent les résultats précédemment rapportés par Wilmink et coll. (1999b): notamment, une réponse inflammatoire lente à se mettre en place et qui perdure ensuite dans le temps au niveau des plaies appendiculaires. De plus, nous avons montré que ce phénomène est d'autant plus marqué dans les plaies développant du tissu de granulation en excès. Étant donné que les phases subséquentes de guérison ne surviennent que lorsque l'inflammation est dissipée, cette persistance des signaux inflammatoires entraîne une production accrue de cytokines et un dérèglement dans la suite de la cicatrisation. Cela pourrait expliquer, en partie, la formation du bouton de chair chez le cheval, alors que l'on n'en retrouve pas chez le poney, qui à l'opposé, bénéficie d'une phase inflammatoire prompte et brève.

La migration de la langue épithéliale s'est révélée être plus rapide pour les plaies thoraciques que pour les plaies appendiculaires. La contraction et la réépithélialisation sont les deux phénomènes complémentaires responsable de la diminution de la taille de

la plaie. Étant donné que la contraction tend à être moins efficace dans les plaies de jambes par rapport aux plaies de thorax chez le cheval (Cochrane et coll., 2003), il serait logique de penser que la réépithélialisation puisse venir renforcer le mécanisme de contraction déficient dans les jambes. Cependant, les résultats de notre étude réfutent cette supposition puisque la migration épithéliale s'est révélée plus rapide sur les plaies thoraciques. O'Toole et coll. (1997) ont montré que la mobilité des kératinocytes est augmentée dans un environnement hypoxique, condition occasionnée par un bandage. Cependant, dans le cas de plaies ayant développé un bouton de chair, la couverture épithéliale était inexistante au moment où la réépithélialisation des plaies normales était largement entamée. La divergence de propos rencontrée avec la littérature peut être expliquée par la présence d'un obstacle (bouton de chair) freinant la migration de la langue épithéliale, phénomène qui normalement devrait être stimulé par l'environnement hypoxique retrouvé sous bandage. Le retard de réépithélialisation dans les plaies avec bouton de chair pourrait aussi provenir de la présence soutenue de cytokines inflammatoires suite à une phase inflammatoire prolongée, dont TGF- β , connu pour inhiber la prolifération des kératinocytes (Sporn et Roberts, 1989). De même, Dovi et coll. (2003) ont montré une avancée de la couverture épithéliale beaucoup plus rapide chez des souris neutropéniques que chez des souris témoins possédant une phase inflammatoire et une quantité de neutrophiles normales. Les neutrophiles présents pourraient entraîner le détachement des couches derme/épiderme suite à leur production de protéases et donc retarder une couverture épithéliale correcte (Katayama et coll., 1994). Brown et coll. (1997) ont, quant à eux, supposé que les signaux initiant l'apoptose, phénomène qui abrégierait la phase inflammatoire, proviendraient du nouvel épithélium recouvrant le site de la lésion. Ainsi, quand une couverture épithéliale est incomplète, comme dans le cas de plaies développant un bouton de chair, il est attendu que le processus apoptotique ne soit initié et donc que l'on observe une persistance de l'inflammation, d'où l'évolution vers une fibroplasie excessive.

Les résultats des analyses histologiques traitant de l'organisation des fibroblastes corroborent les constatations antérieures de Wilmink et coll. (1999b) : l'organisation des fibroblastes dans le tissu de granulation de plaies corporelles surpasse celle présente dans les plaies appendiculaires. De plus, nos résultats étendent cette observation aux

plaies développant un bouton de chair. À l'inverse des capillaires ou des macrophages, le cytosquelette d'actine des myofibroblastes s'aligne dans le tissu de granulation mature le long des lignes de contraction, c'est-à-dire parallèlement les uns aux autres et parallèlement à la surface de la plaie. Cette orientation confère une meilleure force tensile afin de rapprocher efficacement les deux bords de plaie (Grinnell, 1994). Le degré d'organisation du myofibroblaste dans le tissu de granulation se révèle donc un facteur important de l'efficacité ultérieure de la contraction.

En plus du degré d'organisation acquis, un autre critère est décisif pour déterminer l'efficacité de l'action du myofibroblaste : l'environnement dans lequel il évolue. En effet, Cochrane et coll. (2003) ainsi que Wilmink et coll. (2001) ont montré que, *in vitro*, les fibroblastes issus de plaies de jambes contractent plus vite que ceux issus du corps, résultats opposés aux constatations *in vivo*. Ainsi, les propriétés contractiles intrinsèques du myofibroblaste peuvent être modifiées par l'environnement dans lequel il se développe. L'environnement modifié des plaies développant un bouton de chair pourrait fortement affecter les propriétés contractiles des myofibroblastes.

Selon Shephard et coll. (2004), un équilibre entre l'IL-1 et TGF- β semble orienter la progression du fibroblaste vers son phénotype contractile. Dans le cas de plaies guérissant normalement, *in vivo*, les myofibroblastes n'apparaissent que tard dans le processus de guérison; 3 jours post-trauma, de faibles quantités de α -SMA sont retrouvées; ce n'est que 6 jours post-trauma que des quantités plus importantes sont révélées. De nombreux auteurs ont prouvé l'action de TGF- β sur la transformation du fibroblaste en myofibroblaste, par l'acquisition de α -SMA (Desmoulière et coll., 1993; Desmoulière, 1995; Serini et coll., 1998; Desmoulière et coll., 2005). L'apparition tardive des myofibroblastes contraste donc avec la libération précoce de TGF- β par les plaquettes dès la création d'une plaie. Ceci laisse donc penser qu'il existe un inhibiteur endogène de TGF- β l'empêchant d'influencer l'acquisition de α -SMA par les fibroblastes dès la création de la plaie. En effet, Shephard et coll. (2004) ont constaté, *in vitro*, que l'IL-1 inhibe indirectement l'activation du TGF- β latent en augmentant l'expression de nuclear factor κ B (NF κ B). Ce dernier, facteur de transcription de IL-1, est reconnu pour inhiber les effets de TGF- β (Bitzer et coll., 2000). Après une phase inflammatoire dominée par la présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1,

l'interaction kératinocytes-fibroblastes devient prédominante et permet à TGF- β de s'exprimer grâce à une production importante par les kératinocytes de récepteurs antagonistes à IL-1 (IL-1RAs), qui neutralisent l'IL-1 et diminuent les effets antagonistes de cette dernière sur TGF- β via NF κ B (Shephard et coll., 2004). En plus de l'importance de TGF- β pour la transformation du fibroblaste en myofibroblaste, il est donc primordial qu'il existe un contact étroit kératinocytes-fibroblastes pour que l'IL-1 soit neutralisé et pour que le TGF- β puisse s'exprimer. Ainsi, lorsque la couverture épithéliale est absente, comme dans le cas de plaies avec bouton de chair, ce contact ne serait pas établi, l'IL-1 incomplètement neutralisée, ce qui entraînerait une activation sommaire de TGF- β . L'action de ce dernier sur l'acquisition de l' α -SMA par le myofibroblaste serait moins importante, la production finale de myofibroblastes pourrait être diminuée dans le cas de plaies développant un bouton de chair.

De plus, l'incorporation de α -SMA dans les fibres de stress confère au myofibroblaste une activité contractile importante permettant la formation de contacts spécialisés avec la MEC, appelés fibronexi. Ainsi, les myofibroblastes ayant acquis suffisamment de α -SMA vont présenter une meilleure résistance mécanique à des forces extracellulaires appliquées (Hinz et coll., 2004). Dans les plaies présentant une phase inflammatoire prolongée, et donc une persistance d'IL-1, il est possible que l'acquisition de α -SMA soit retardée et que le myofibroblaste soit moins apte à résister adéquatement à des forces mécaniques importantes. Pour obtenir une contraction efficace, les cytokines pro-inflammatoires devraient être rapidement éliminées afin de permettre une domination ultérieure de TGF- β et ainsi une action plus rapide et efficace du myofibroblaste.

La contraction déficiente dans le cas de plaies appendiculaires, et de surcroît celles développant un bouton de chair, pourrait donc être expliquée par une organisation inadéquate des myofibroblastes à l'intérieur du tissu, mais aussi, par des conditions tissulaires différentes de celles retrouvées dans des plaies guérissant normalement, ce qui entraverait le déploiement de forces centripètes efficaces.

L'analyse immunohistochimique permet d'évaluer la présence de p53 mutant dans les tissus biopsiés. En effet, une quantité de p53 détectée au moyen de l'IHC est la preuve d'une prédominance de la forme mutée sur le type sauvage (Wang et coll., 1995).

Ainsi, selon Greenhalgh (1998), si les signaux p53 issus du nouvel épithélium migrant sont sous forme mutée, l'apoptose ne peut avoir lieu et les populations cellulaires à éliminer restent de façon prolongée, gênant la suite des phases de guérison. Nous avons noté une présence accrue de p53 mutant dans les plaies avec bouton de chair par rapport aux plaies guérissant normalement. Il est intéressant de noter que la présence de p53 mutant est aussi une caractéristique du chéloïde chez l'homme; la forme mutée n'étant pas retrouvée dans des échantillons de peau normale. Cette mutation représenterait une des explications quant à la pathogénie de ces cicatrices (Ladin et coll., 1998; Saed et coll., 1998; Liu et coll., 2004). Milner et Medclaf (1991) ont aussi montré que p53 mutant aurait la capacité de former un complexe avec les formes sauvages restantes de cette protéine, résultant en l'inhibition de leurs fonctions dans l'arrêt du cycle cellulaire (Milner et coll., 1991; Willis et coll., 2004). Ceci suggère donc une activation supplémentaire de forme mutante une fois qu'apparaît la première mutation de cette protéine.

De plus, Funayama et coll. (2003) ont montré que les kératinocytes issus de chéloïdes stimulaient la prolifération et inhibaient l'apoptose des fibroblastes sous-jacents, ceci contribuant de façon importante à la mise en place de cicatrices anormales. Ces observations suggèrent donc une déficience au niveau du processus apoptotique dans le développement excessif de tissu de granulation chez le cheval. L'élimination successive des cellules lors du processus de réparation ne doit pas se faire adéquatement. Les résultats obtenus par Wilmink et coll. (1999b) montrant une diminution rapide de la population fibroblastique des plaies de croupe alors qu'elle persiste dans les plaies de jambes concordent également avec une activité apoptotique déficiente. Chez l'homme, de nombreuses études ont aussi soulevé une activité apoptotique déficiente comme facteur principal de développement de cicatrices chéloïdiennes (Ladin et coll., 1998; Messadi et coll., 1999; Sayah et coll., 1999; Luo et coll., 2001; Chen et coll., 2003).

La méthode TUNEL permet de localiser les cellules apoptotiques *in situ*. Les résultats obtenus ne permettent pas de retenir une apoptose moins marquée dans les plaies développant un bouton de chair, ceci probablement à cause du manque de sensibilité de cette méthode. En effet, certaines précautions sont à respecter en utilisant cette technique. Grasl-Kraupp et coll. (1995) ont détecté à la fois des cellules

apoptotiques et des cellules nécrotiques et recommandent donc de toujours confirmer les résultats obtenus au moyen d'une méthode parallèle confirmant l'état apoptotique des cellules identifiées par TUNEL. De plus, puisque TUNEL vient marquer les brisures d'ADN caractéristiques de l'apoptose, elle marque de la même façon un ADN en répllication possédant des extrémités fragmentées, ciblant ainsi les cellules en répllication. L'IHC se révèle une bonne méthode complémentaire car, en choisissant un antigène caractéristique de l'apoptose (p53, Bcl-2, Fas, caspase), l'état de la cellule est confirmé.

Des résultats contradictoires concernant l'apoptose dans les cicatrices chéloïdiennes ont été trouvés par l'équipe de Akasaka (2001). Cette dernière a noté une activité apoptotique supérieure dans la population fibroblastique issue de chéloïdes comparativement à celle issue de cicatrices normales. Il faut cependant noter que les chercheurs n'ont utilisé que la méthode TUNEL. Les cellules révélées au moyen de cette technique n'étaient pas forcément de nature apoptotique; comme il a déjà été discuté, la méthode TUNEL a aussi pu révéler des cellules nécrotiques ou prolifératives de par la nature de leur ADN durant ces phases. Ces résultats ne peuvent donc pas venir contredire de façon catégorique les hypothèses avancées par de nombreuses équipes suggérant un processus apoptotique défectueux dans les cicatrices chéloïdiennes.

Une phase inflammatoire prolongée ainsi qu'une activité apoptotique déficiente jouent de concert pour encourager le développement exagéré de composants de la MEC. Une inflammation soutenue se traduit par une libération continue de signaux inflammatoires, entres autres, TGF- β . Or, Desmoulière et coll. (1993) ont montré que TGF- β est un des principaux inducteurs de l'acquisition du phénotype myofibroblastique par le fibroblaste, lorsqu'il existe un contact étroit derme-épiderme ainsi qu'une action paracrine entre les kératinocytes et les fibroblastes (Shephard et coll., 2004; Desmoulière et coll., 2005). Ainsi, une phase inflammatoire perdurant signifie que le facteur de croissance TGF- β continue à stimuler cette métamorphose. Ces myofibroblastes produits continuellement ne sont pas éliminés par apoptose étant donné que ce mécanisme est défectueux, de par l'absence d'une couverture épithéliale. Les myofibroblastes persistants sont reconnus responsables de la formation de cicatrices pathologiques chez l'homme (Desmoulière, 1995; Gabbiani, 2003; Moulin et coll., 2004). De plus, Zhang et Phan (1999) ont montré une autre action de TGF- β favorisant la survie des

myofibroblastes. IL-1 est reconnu pour induire l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) qui provoque l'apoptose des myofibroblastes (Zhang et coll., 1997). TGF- β est alors un acteur important dans la phase fibroblastique puisqu'il inhibe l'expression de l'iNOS induite par l'IL-1, encourageant ainsi la survie des myofibroblastes en prévenant leur apoptose. Dans le cas d'une phase inflammatoire prolongée et d'une expression soutenue de TGF- β , on assiste donc à la persistance des myofibroblastes. À cela, nous pouvons ajouter l'acquisition tardive du phénotype myofibroblastique de par une persistance de l'IL-1, qui tend à affaiblir l'efficacité de la contraction, comme discuté ci-dessus. Ces deux phénomènes associés pourraient expliquer le développement de cicatrices à caractère fibrotique (Gabbiani, 2003).

La microscopie électronique a permis de confirmer les hypothèses quant à l'occlusion des microvaisseaux issus de plaies avec bouton de chair. Cette occlusion est probablement due à une présence accrue de cellules endothéliales, ceci reste cependant à vérifier.

Les valeurs déterminant l'occlusion des microvaisseaux ont été déterminées en estimant le diamètre minimal d'un vaisseau nécessaire au passage d'un globule rouge, ce en tenant compte de la capacité des cellules à se déformer (Henquell et coll., 1976; Smith et coll., 1979). Bien que l'oxygénation des tissus n'ait pas été mesurée, nous pouvons tout de même présumer qu'une condition hypoxique est créée lorsque le diamètre du vaisseau est inférieur au diamètre minimum que peut acquérir un globule rouge, après déformation. Cette condition hypoxique stimule la production de TGF- β par les fibroblastes (Hakkinen et coll., 1996) et augmente aussi le nombre de ses récepteurs à la surface cellulaire (Falanga et coll., 1991). TGF- β stimulant en retour la production de collagène par les fibroblastes, une quantité augmentée de ce facteur implique une production de collagène supérieure à la normale. Cette situation hypoxique provoquée par une occlusion des microvaisseaux pourrait donc expliquer la surproduction de MEC caractéristique du bouton de chair. Les résultats concordent avec une précédente étude documentant la persistance de ces facteurs fibrogéniques (TGF- β) (Théoret et coll., 2001b) ainsi que de leurs récepteurs (De Martin et Théoret, 2004) dans les plaies de jambes, et plus particulièrement celles développant du tissu de granulation en excès (Théoret et coll., 2002). De plus, selon Shimizu et coll. (1995), l'hypoxie protégerait les

cellules de l'apoptose grâce à une augmentation de l'expression des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl- χ L. Ainsi, dans le cas de microvaisseaux occlus et donc une situation hypothétiquement hypoxique, la présence de cellules surnuméraires pourrait s'expliquer par une action anti-apoptotique augmentée de Bcl-2 et Bcl- χ L. Il est intéressant de noter que de nombreuses études ont mis en évidence ces conditions pour le chéloïde chez l'homme (Kischer, 1992; Kischer, 1993).

Finalement, les résultats histologiques peuvent aussi supporter l'hypothèse de l'hypoxie. En effet, il est reconnu que l'activité angiogénique est stimulée par un environnement hypoxique (Adair et coll., 1990; Pugh et Ratcliffe, 2003). L'histologie a révélé une activité angiogénique plus importante dans les plaies développant un bouton de chair, concordant avec une occlusion accrue des microvaisseaux dans ces mêmes plaies. Bien qu'une relation directe ne puisse être envisagée entre ces deux aspects, nous pouvons supposer que l'occlusion présumée entraîne une situation hypoxique à l'intérieur des tissus, qui confirmerait la stimulation importante de la formation de nouveaux microvaisseaux.

Conclusion

Cette étude a révélé l'existence de différences morphologiques et physiologiques majeures entre des plaies corporelles et des plaies appendiculaires chez le cheval. Elle confirme qu'une inflammation prolongée tout comme une réépithélialisation lente et une désorganisation des myofibroblastes entraînant possiblement un défaut de contraction caractérisent la guérison de plaies de membres, particulièrement celles développant du tissu de granulation exubérant. Cette étude apporte aussi des données nouvelles quant au mécanisme de mise en place d'une MEC surabondante, avec un système apoptotique déficient et une occlusion importante des microvaisseaux. Plusieurs aspects du dysfonctionnement de la guérison chez le cheval semblent donc similaires à ceux responsables de la formation de chéloïdes chez l'homme.

Des études subséquentes pourraient vérifier de façon quantitative la présence d'hypoxie à l'intérieur des tissus issus de plaies de jambes. La présence de mutations pour p53 serait aussi à vérifier en cultivant des fibroblastes issus de plaies développant du tissu de granulation excessif. De même, une investigation ultérieure pourrait étudier l'association entre l'apoptose et l'hypoxie dans le cas de bouton de chair. Ceci fournirait alors une base pour le développement ciblé de thérapies cellulaires et moléculaires servant à prévenir et à traiter le développement de fibroplasie excessive lors de guérison par seconde intention chez le cheval.

Bibliographie

ADAMS, JM et CORY, S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281(5381): 1322–1326.

ADAIR, TH, GAY, WJ et MONTANI, JP. 1990. Growth regulation of the vascular system: evidence for a metabolic hypothesis. *Am J Physiol.* 259(3 Pt 2): R393-404.

AKASAKA, Y, FUJITA, K, ISHIKAWA, Y, ASUWA, N, INUZUKA, K, ISHIHARA, M, ITO, M, MASUDA, T, AKISHIMA, Y, ZHANG, L, ITO, K et ISHII, T. 2001. Detection of apoptosis in keloids and a comparative study on apoptosis between keloids, hypertrophic scars, normal healed flat scars, and dermatofibroma. *Wound Repair Regen.* 9(6): 501.

ASHE, PC et BERRY, MD. 2003. Apoptotic signaling cascades. *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry.* 27(2): 199-214.

BACON MILLER, C, WILSON, DA, KEEGAN, KG, KREEGER, JM, ADELSTEIN, EH, et VENKATASESHU, KG. 2000. Growth characteristics of fibroblasts isolated from the trunk and distal aspect of the limb of horses and ponies. *Vet Surg.* 29(1): 1-7.

BARBER, SM. 1989. Second intention wound healing in the horse: the effect of bandages and topical corticosteroids, in *Proceedings.* 35th Annu. Meet. Am Assoc Equine Pract. 35: 107-116.

BERRY, DB 2nd et SULLINS, KE. 2003. Effects of topical application of antimicrobials and bandaging on healing and granulation tissue formation in wounds of the distal aspect of the limbs in horses. *Am J Vet Res.* 64(1): 88-92.

BERTONE, AL. 1989. Management of exuberant granulation tissue. *Vet Clin N Am: Equine Pract.* 5(3): 551-562.

BIAN, J et SUN, Y. 1997. Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter. *Mol Cell Biol.* 17(11): 6330-6338.

BITZER, M, VON GERSDORFF, G, LIANG, D, DOMINGUEZ-ROSALES, A, BEG, AA, ROJKIND, M, BOTTINGER, EP. 2000. A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev.* 14(2): 187-197.

BLAGOSKLONNY, MV. 1997. Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene.* 15(16): 1889-1893.

BOBE, P. 2002. The Fas-Fas Ligand apoptotic pathway. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.*

BOREL, JP et MAQUART, FX. 1998. Mécanismes moléculaires de la cicatrisation des blessures. *Ann Biol Clin.* 56(1): 11-19.

BORNER, C. 2003. The bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol.* 39(11): 615-647.

BROWN, DL, WINSTON, WK, et GREENHALGH, D. 1997. Apoptosis down-regulates the inflammation under the advancing epithelial wound edge: delayed patterns in diabetes and improvement with topical growth factors. *Surg.* 121(4): 372-380.

BUCHER, K, SZALAI, G, MARTI, E, GRIOT-WENK, ME, LAZARI, S et PAULI, U. 1996. Tumor suppressor gene p53 in the horse: identification, cloning, sequencing and a possible role in the pathogenesis of equine sarcoid. *Res Vet Sci.* 61(2): 114-119.

CALVIN, M. 1998. Cutaneous wound repair. *Wounds.* 10: 12-32.

CASSATELA, AM. 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today*. 16(1): 21-26.

CHEN, W, FU, X, SUN, X, SUN, T, ZHAO, Z et SHENG, Z. 2003. Analysis of differentially expressed genes in keloids and normal skin with cDNA microarray. *J Surg Res*. 113(2): 208-16.

CHOISY-ROSSI, C, REISDORF, P et YONISH-ROVACH, E. 1998. The p53 tumor suppressor gene: structure, function and mechanism of action *in Apoptosis: biology and mechanisms*. Edited by Kumar, S Springer, New-York. pp. 145-172.

CHOPP, M, ZHANG, Z et FREYTAG, S. 1992. P53 expression in brain after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 182(3): 1201-1207.

CHVAPIL, M, PFISTER, T, ESCALADA, S, LUDWIG, J et PEACOCK, E.E.Jr. 1979. Dynamics of the healing of skin wounds in the horse as compared with the rat. *Exp Mol Pathol*. 30(3): 349-359.

CLARK, RAF. 1993. Biology of dermal wound repair. *Dermatol Clin*. 11(4): 647-666.

CLARK, RAF. 1996. Wound repair: overview and general considerations *in The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd edition. Edited by Clark RAF Plenum-Press, New-York. pp 3.

COCHRANE, CA, PAIN, R et KNOTTENBELT, DC. 2003. *In vitro* wound contraction in the horse: differences between body and limb wounds. *Wounds*. 15(6): 175-181.

COHEN, IK, DIEGELMANN, RF et CROSSLAND, MC. 1994. Wound care and wound healing *in Principles of Surgery*. Edited by Schwartz, SI, Shires, GT, Spencer, FC et Cowles Husser, W McGraw-Hill, New-York. pp. 279-303.

COHEN, GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 326(1): 1-16.

CONWAY, EM, COLLEN, D et CARMELIET, P. 2001. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 49(3): 507-521.

COX, L. 2003. Present angiogenesis research and its possible future implementation in wound care. *J Wound Care.* 12(6): 225-228.

CROMPTON, M. 2000. Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell. Biol.* 12(4): 414-419.

DANIAL, NN et KORSMEYER, SJ. 2004. Cell death critical control points, review. *Cell.* 116(2): 205-219.

DE MARTIN, I et THEORET, CL. 2004. Spatial and Temporal Expression of Types I and II Receptors for Transforming Growth Factor β in Normal Equine Skin and Dermal Wounds. *Vet Surg.* 33(1): 70-76.

DESMOULIÈRE, A, GEINOZ, A, GABBIANI, F et GABBIANI, G. 1993. Transforming growth factor beta induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 122(1): 103-111.

DESMOULIÈRE, A. 1995. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int.* 19(5): 471-476.

DESMOULIÈRE, A, REDARD, M, DARBY, I et GABBIANI, G. 1995. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.* 146(1): 56-66.

DESMOULIÈRE, A, BADID, C, BOCHATON-PIALLAT, ML et GABBIANI, G. 1997. Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury. *Int J Biochem Cell. Biol.* 29(1): 19-30.

DESMOULIÈRE, A, CHAPONNIER, C et GABIANNI, G. 2005. Tissue repair, contraction and the myofibroblast. *Wound Repair Regen.* 13(1): 7-12.

DIETCH, EA, SHEELAHAN, TM, ROSE, MP, CLOTHIER, J et COTTER, J. 1988. Hypertrophic burn scars: Analysis of variables. *J Trauma.* 23: 895.

DOVI, JV, HE, LK et DIPIETRO, LA. 2003. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukocyte Biol.* 73(4): 448-455.

EARNSHAW, WC, MARTINS, LM et KAUFMANN, SH. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 68: 383-424.

EHRlich, HP, DESMOULIERE, A, DIEGELMANN, RF, COHEN, IK, COMPTON, CC, GARNER, WL, KAPANCI, Y et GABBIANI, G. 1994. Morphological and immunohistological differences between keloid and hypertrophic scar. *Am J Pathol.* 145(1): 105-113.

ERSTER, S et MOLL, UM. 2004. Stress-induced p53 runs a direct mitochondrial death program. Its role in physiologic and pathophysiologic stress responses *in vivo*. *Cell Cycle.* 3(12): 86-89.

ESKES, R, DESAGHER, S, ANTONSSON, B et MARTINOU, JC. 2000. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol.* 20(3): 929-935.

EVANS, VG. 1993. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol Int.* 17(5): 461-476.

FALANGA, V, QIAN, SW, DANIELPOUR, D, KATZ, MH, ROBERTS, AB et SPORN, MB. 1991. Hypoxia upregulates the synthesis of TGF- β 1 by human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 97(4): 634-637.

FALANGA, V, MARTIN, TA, TAKAGI, H, KIRSNER, RS, HELFMAN, T, PARDES, J et OCHOA, MS. 1993. Low oxygen tension increases mRNA levels of alpha 1 (I) procollagen in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol.* 157(2): 408-412.

FERGUSON, MW et O'KANE, S. 2004. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359(1445): 839-50.

FOLKMAN, J et SHING, T. 1992. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 267(16): 10931-10934.

FUNAYAMA, E, CHODON, T, OYAMA, T et SUGIHARA, T. 2003. Keratinocytes promote proliferation and inhibit apoptosis of the underlying fibroblasts: an important role in the pathogenesis of keloid. *J Invest Dermatol.* 121(6): 1326-1331.

GABBIANI, G, HIRSCHL, BJ, RYAN, GB, STATKOV, PR et MAJNO, G. 1972. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J Exp Med.* 135(4): 719-734.

GABBIANI, G. 2003. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive disease. *J Pathol.* 200(4): 500-503.

GANNON, JV, GRAVES, R, IGGO R et LANE DP. 1990. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *Embo J.* 9(5): 1595-1602.

GROTENDORST, GR, RAHMANIE, H et DUNCAN, MR. 2004. Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J.* 18: 469-479.

GRASL-KRAUPP, B, RUTTKAY-NEDECKY, B, KOUDELKA, H, BUKOWSKA, K, BURSCH, W et SCHULTE-HERMANN, R. 1995. *In situ* detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology.* 21(5): 1465-1468.

GREENHALGH, DG. 1998. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 30(9): 1019-1030.

GRINNELL, F. 1992. Wound repair, keratinocytes activation and integrin modulation. *J Cell Science.* 101(Pt 1): 1-5.

GRINNELL, F. 1994. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol.* 124(4): 401-404.

GUO, G, CHAN, SL et KRUMAN, I. 2001. The bcl-2 family of proteins and their actions within the molecular machinery of cell death *in* Programmed cell death, cellular and molecular mechanisms, volume I. Edited by Mattson MP et Rangnekar, VM Elsevier, New-York. pp. 141-195.

HAKKINEN, L, WESTERMARCK, J, KAHARI, VM et LARJAVA, H. 1996. Human granulation tissue fibroblasts show enhanced proteoglycan gene and altered response to TGF- β 1. *J Dent Res.* 75(10): 1767-1778.

HASLETT, C et HENSON, P. 1996. Resolution of inflammation *in* The molecular and cellular biology of wound repair. 2nd edition. Edited by Clark RAF Plenum Press, New-York. p 143.

HEATWOLE, VM. 1999. TUNEL assay for apoptotic cells *in* Methods in molecular biology vol 115: immunocytochemical methods and protocols. Edited by Javois, LC Humana press inc. NJ. pp. 141-148.

HEIL, M, CLAUSS, M, SUZUKI, K, BUSCHMANN, IR, WILLUWEIT, A, FISCHER, S et SCHAPER, W. 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates monocyte migration through endothelial monolayer via increased integrin expression. Eur J Cell Biol. 79(11): 850-857.

HENQUELL, L, LACELLE, PL et HONIG, CR. 1976. Capillary diameter in rat heart *in situ*: relation to erythrocyte deformability, O₂ transport and transmural O₂ gradients. Microvasc Res. 12(3): 259-274.

HINZ, B, PITTET, P, SMITH-CLERC, J, CHAPONNIER, C et MEISTER, JJ. 2004. Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions. Mol Biol Cell. 15(9): 4310-4320.

HOLLSTEIN, M, SIDRANSKY, D et VOGELSTEIN, HC. 1991. P53 mutations in human cancer. Science. 253(5015): 49-53.

HORVITZ, HR. 1999. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Cancer Res. 59(7 suppl): 1701-1706.

ITOH, N, YONEHARA, S, ISHII, A, YONEHARA, M, MIZUSHIMA, S, SAMESHIMA, S, HASE, A, SETO, Y et NAGATA, S. 1991. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell. 66(2): 233-243.

JACOBS, KA, LEACH, DH, FRETZ, PB et TOWNSEND, HGG. 1984. Comparative aspects of the healing of excisional wounds on the leg and body of horses. Vet Surg. 13: 83-90.

JACOTOT, E, COSTANTINI, P, LABOUREAU, E, ZAMZAMI, N, SUSIN, SA et KROEMER, G. 1999. Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *Ann N Y Acad Sci.* 887: 18-30.

JIANG, X et WANG, X. 2004. Cytochrome *c*-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 73: 87-106

JOHNSTON, RB. 1988. Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. *N Engl J Med.* 318(12): 747-752.

KAM, PCA et FERCH, NI. 2000. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia.* 55(11): 1081-1093.

KASOF, G, DEGENHARDT, K, PEREZ, D, THOMAS, A et WHITE, E. 1999. Overview: a matter of life and death *in* Signalling pathways in apoptosis. Edited by Watters, D. et Lavin, M. Harwood academic publishers, Canada. pp. 1-28.

KATAYAMA, H, HASE, T et YAOITA, H. 1994. Detachment of cultured normal human keratinocytes by contact with TNF-alpha-stimulated neutrophils in the presence of platelet-activating factor. *J Invest Dermatol.* 103(2): 187-190.

KERR, JF, WYLLIE, AH et CURRIE, AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 49(2): 529-542.

KIM, JP, ZHANG, K, CHEN, JD, WYNN, KC, KRAMER, RH et WOODLEY, DT. 1992. Mechanisms of human keratinocytes migration on fibronectine: unique role of RGD site and integrins. *J Cell Physio.* 151(3): 443-450.

KISCHER, CW et SHETLAR, MR. 1979. Microvasculature in hypertrophic scars and the effects of pressure. *J Trauma.* 19(10): 757-764.

KISCHER, CW, THIES, AC et CHVAPIL, M. 1982. Perivascular myofibroblasts and microvascular occlusion in hypertrophic scars and keloids. *Hum Pathol.* 13(9): 819-824.

KISCHER, CW. 1992. The microvessels in hypertrophic scars, keloids and related lesions: a review. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 24(2) : 281-296.

KISCHER, CW. 1993. Contributions of electron microscopy to the study of hypertrophic scar and related lesions. *Scanning Microscopy.* 7(3): 921-931.

KIRITSY, CP, LYNCH, AB et LYNCH, SE. 1993. Role of growth factors in cutaneous wound healing: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 4(5): 729-760.

KRAWCZYK, WS et WILGRAM, GF. 1973. Hemidesmosome and desmosome morphogenesis during epidermal wound healing. *J Ultrastruct Res.* 45(1): 93-101.

LADIN, DA, HOU, Z, PATEL, D, MCPHAIL, M, OLSON, JC, SAED, GM et FIVENSON, DP. 1998. p53 and apoptosis alterations in keloids and keloids fibroblasts. *Wound Rep Reg.* 6(1): 28-37.

LAPLANTE, A. 2002. Mécanismes de réépithélialisation des plaies cutanées : expression des protéines de stress chez la souris et analyse à l'aide d'un nouveau modèle tridimensionnel humain développé par génie tissulaire. Thèse de l'université Laval. pp. 44-80.

LEIBOVITCH, SJ et ROSS, R. 1975. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol.* 78(1): 71-100.

LI, P, NIJHAWAN, D, BUDIHardJO, I, SRINIVASULA, SM, AHMAD, M, ALNEMRI, ES et WANG, X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91(4): 479-489.

LI, J, ZHANG, LJ et KIRSNER, RS. 2003a. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech.* 60(1): 107-114.

LI, A, DUBEY, S, VARNEY, ML, DAVE, BJ et SINGH, RK. 2003b. Interleukine-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immun.* 170(6): 3369-3376.

LINDSAY, WA. 1990. Principles of wound healing *in* Current practice of equine surgery. Edited by Nathaniel, A., White, II. et Moore, J.N. Lippincott company, Philadelphia. pp. 123-137.

LIU, W, JIANG, YH, LI, YL, LIN, ZH, JIANG, H, TAN, Q, ZHANG, JL et WANG, ZM. 2004. Experimental study on p53 gene mutation in keloid fibroblasts. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 20(2): 85-87.

LUO, S, BENATHAN, M, RAFFOUL, W, PANIZZON, RG et EGLOFF, DV. 2001. Abnormal balance between proliferation and apoptotic cell death in fibroblasts derived from keloid lesions. *Plast Reconstr Surg.* 107(1): 87-96.

MADRI, JA, SANKAR, S et ROMANIC, AM. 1996. Angiogenesis *in* The molecular and cellular biology of wound repair. 2nd edition. Edited by Clark R.A.F. Plenum Press, New-York. pp. 35-371.

MARSHMAN, E, OTTEWELL, PD, POTTEN, CS et WATSON, AJM. 2001. Caspase activation during spontaneous and radiation-induced apoptosis in the murine intestine. *J Pathol.* 195(3): 285-292.

MARTIN, P. 1997. Wound healing: aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 276(5309): 75-81.

MARTIN, DA, SIEGEL, RM, ZHENG, L et LENARDO, MJ. 1998. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACalpa1) death signal. *J Biol Chem.* 273(8): 4345-4349.

MASUR, SK, DEWAL, HS, DINH, TT, ERENBURG, I et PETRIDOU, S. 1996. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Pro Natl Acad Sci.* 93(9): 4219-4223.

MAST, BA. 1992. The skin *in* Wound healing, biochemical and clinical aspects. Edited by Cohen, K.I., Diegelmann, R.F. and Lindblad, W.J. Saunders, Montreal. pp. 344-355.

MESSADI, DV, A, L, BERG, S, JEWETT, A, WEN, Z, KELLY, P et BERTOLAMI, CN. 1999. Expression of apoptosis-associated genes by human dermal scar fibroblasts. *Wound Rep Regen.* 7(6): 511-517.

MIGNATTI, P, RIFKIN, DB, WELGUS, HG et PARKS, WC. 1996. Proteinases and tissue remodeling *in* The molecular and cellular biology of wound repair. 2nd edition. Edited by Clark R.A.F. Plenum Press, New-York. pp 427-474.

MILLER, EJ et GAY, S. 1992. Collagen structure and function *in* Wound healing, biochemical and clinical aspects. Edited by Cohen, K.I., Diegelmann, R.F., and Lindblad, W.J. Saunders, Montreal. pp. 130-151.

MILNER, J et MEDCALF, EA. 1991. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell.* 65(5): 765-774.

MILNER, J, MEDCALF, EA et COOK, AC. 1991. Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol Cell Biol.* 11(1): 12-19.

MONACO, JL et LAWRENCE, WT. 2003. Acute wound healing, an overview. Clin Plast Surg. 30(1): 1-12.

MOULIN, V. 1995. Growth factors en skin wound healing. Eur J Cell Biol. 68(1): 1-7.

MOULIN, V, LAROCHELLE, S, LANGLOIS, C, THIBAUT, I, LOPEZ-VALLE, CA et ROY, M. 2004. Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblasts have differential response to apoptotic inductors. J Cell Physiol. 198(3): 350-358.

MUTSAERS, SE, BISHOP, JE, MCGROUTHER, G et LAURENT, GJ. 1997. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. Int J Biochem Cell. Biol. 29(1): 5-17.

MUZIO, M, STOCKWELL, BR, STENNICKE, HR, SALVESEN, GS et DIXIT, VM. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. J Biol Chem. 273(5): 2926-2930.

NEDELEC, B, GHAHARY, A, SCOTT, PG et TREDGET, EE. 2000. Control of wound contraction. Basic and clinical features. Hand Clin. 16(2): 289-302.

NOWINSKI, D, LYSHEDEN, AS, GARDNER, H, RUBIN, K, GERDIN, B et IVARSSON, M. 2004. Analysis of gene expression in fibroblasts in response to keratinocyte-derived factors *in vitro*: potential implications for the wound healing process. J Invest Dermatol. 122(1): 216-221.

NICHOLSON, WD. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell Death Differ. 6(11): 1028-42.

NWOMEH, BC, LIANG, HX, DIEGELMANN, RF, COHEN, IK et YAGER, DR. 1998. Dynamics of the matrix métalloprotéinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wound. Wound Rep Regen. 6(2): 127-134.

- O'CONNOR, L et STRASSER, A. 1998. The Bcl-2 proteins family *in* Apoptosis: biology and mechanisms. Edited by Kumar, S. Springer, New-York. pp. 173-207.
- O'TOOLE, EA, MARINKOVICH, MP, PEAVEY, CL, AMIEVA, MR, FURTHMAYR, H, MUSTOE, TA et WOODLEY, DT. 1997. Hypoxia increases human keratinocyte motility on connective tissue. *J Clin Invest.* 100(11): 2881-2891.
- OLINER, JD, PIETENPOL, JA, THIAGALLINGAM, S, GYURIS, J, KINZLER, KW et VOGELSTEIN, B. 1993. Oncoprotein Mdm2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature.* 362(6423): 857-860.
- PARONE, PA, JAMES, D et MARTINOU, JC. 2002. Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochem.* 84(2-3): 105-111.
- PELLEGRINI, M et STRASSER, A. 1999. A portrait of the bcl-2 protein family: life, death and the whole picture. *J Clin Immunol.* 19(6): 365-377.
- PEPPER, MS et MONTESANO, R. 1990. Proteolytic balance and capillary morphogenesis. *Cell Diff Dev.* 32(3): 319-328.
- PETER, ME, HEUFELDER, AE et HENGARTNER, MO. 1997. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci.* 94(24): 12736-12737.
- PUGH, CW et RATCLIFFE, PJ. 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 9(6): 677-684.
- RANGER, AM, MALYNN, BA et KORSMEYER, SJ. 2001. Mouse models of cell death. *Nat Genetics.* 28(2): 113-118.

RICHES, DWH. 1996. Macrophages involvement in wound repair, remodeling and fibrosis *in* The molecular and cellular biology of wound repair. 2nd edition. Edited by Clark RAF. Plenum Press, New-York. pp. 95-141.

SAED, GM, LADIN, D, OLSON, J, HAN, X, HOU, Z et FIVENSON, D. 1998. Analysis of p53 gene mutations in keloids using polymerase chain reaction-based single-strand conformational polymorphism and DNA sequencing. Arch Dermatol. 134(8): 963-967.

SAYAH, DN, SOO, C, SHAW, WW, WATSON, JW, MESSADI, D, LONGAKER, MT, ZHANG, X et TING, K. 1999. Downregulation of apoptosis-related genes in keloid tissues. J Surg Res. 87(2): 209-216.

SCHWARTZ AJ, WILSON DA, KEEGAN KG, GANJAM VK, SUN Y, WEBER KT et ZHANG J. 2002. Factors regulating collagen synthesis and degradation during second-intention healing of wounds in the thoracic region and the distal aspect of the forelimb of the horses. Am J Vet Res. 63(11): 1564-1570.

SENET, P, VEROLA, O et DUBERTRET, L. 1997. Cicatrisation normale et pathologique. La revue du praticien. 47: 671-674.

SERINI, G, BOCHATON-PIALLAT, ML, ROPRAZ, P, GEINOZ, A, BORSI, L, ZARDI, L et GABBIANI, G. 1998. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. J Cell Biol. 142(3): 873-881.

SHARPE, JC, ARNOULT, D et YOULE, RJ. 2004. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. Biochim Biophys Acta. 1644(2-3): 107-113.

SHEPHARD, P, MARTIN, G, SMOLA-HESS, S, BRUNNER, G, KRIEG, T et SMOLA, H. 2004. Myofibroblast differentiation is induced in keratinocyte-fibroblast

co-cultures and is antagonistically regulated by endogenous transforming growth factor- β and interleukin-1. *Am J Pathol.* 164(6): 2055-2066.

SHI, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell.* 9(3): 459-470.

SHIMIZU, S, EGUCHI, Y, KOSAKA, H, KAMIKE, W, MATSUDA, H et TSUJIMOTO, YL. 1995. Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature.* 374(6525): 811-813.

SIONOV, RV et HAUPT, Y. 1999. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene.* 18(45): 6145-6157.

SITAILO, AL, TIBUDAN, SS et DENNING, MF. 2004. Bax Activation and Induction of Apoptosis in Human Keratinocytes by the Protein Kinase C δ Catalytic Domain. *J Invest Dermatol.* 123(3): 434-443.

SLADE, N et MOLL, UM. 2003. Mutational analysis of p53 in human tumors: immunocytochemistry. *Meth Mol Biol.* 234: 231-243.

SMITH, JE, MOHANDAS, N et SHOHET, SB. 1979. Variability in erythrocyte deformability among various mammals. *Am J Physiol.* 236(5): H725-30.

SNUSTAD, DP et SIMMONS, MJ. 1999. Principles of genetics. 2^{eme} edition. Wiley, New-York. pp. 761-764.

SPORN, MB et ROBERTS, AB. 1989. Transforming growth factor-beta. Multiple actions and potential clinical applications. *J Am Med Assoc.* 262(7): 938-941.

STASHAK, TS. 1991. Principles of wound healing *in* Equine wound management. Lea and Febiger. Philadelphia. pp. 1.

STEED, DL. 1997. The role of growth factors in wound healing. *Surg Clin N Am.* 77(3): 575-586.

STENN, KS et MALHOTRA, R. 1992. Epithelialization *in* Wound healing, biochemical and clinical aspects. Edited by Cohen, KI, Diegelmann, RF, and Lindblad, WJ Saunders, Montreal. pp. 115-127.

STRASSER, A, O'CONNOR, L et DIXIT, VM. 2000. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* 69: 217-245.

STUDZINSKI, GP. 2001. Overview of apoptosis *in* Apoptosis, a practical approach. Edited by Studzinski. Oxford University Press. Newark. pp. 1-17.

TEIFKE, JP et LÖHR, CV. 1996. Immunohistochemical detection of p53 overexpression in paraffin wax-embedded squamous cell carcinomas of cattle, horses, cats and dogs. *J Comp Pathol.* 114(2): 205-210.

TEOFOLI, P, BARDUAGNI, S, RIBUFFO, M, CAMPANELLA, A, DE PITA', O et PUDDU, P. 1999. Expression of Bcl-2, p53, c-jun and c-fos protooncogenes in keloids and hypertrophic scars. *J Dermatol Sci.* 22(1): 31-37.

THEORET, CL. 2001a. Growth factors in pathologic wound repair in horses. *Compendium.* 23(5): 479-484.

THEORET, CL, BARBER, SM, MOYANA, TN, et GORDON, JR. 2001b. Expression of transforming growth factor β 1, β 3 et basic fibroblast growth factor in full-thickness skin wounds of equine limbs and thorax. *Vet Surg.* 30(3): 269-277.

THEORET, CL, BARBER, SM, MOYANA, TN et GORDON, JR. 2002. Preliminary observations on expression of transforming growth factor β 1 et β 3 in equine full-

thickness skin wounds healing normally or with exuberant granulation tissue. *Vet Surg.* 31(3): 266-273.

THORNBERRY, NA et LAZEBNIK, Y. 1998. Caspases : enemies within. *Science.* 281(5381): 1312–1316.

TWIDDY, D, BROWN, DG, ADRAIN, C, JUKES, R, MARTIN, SJ, COHEN, GM, MACFARLANE, M et CAIN, K. 2004. Pro-apoptotic proteins released from the mitochondria regulate the protein composition and caspase-processing activity of the native Apaf-1/caspase-9 apoptosome complex. *J Biol Chem.* 279(19): 19665-19682.

TREDGET, EE, NEDELEC, B, SCOTT, PG et GHAHARY, A. 1997. Hypertrophic scars, keloids and contractures. The cellular and molecular basis for therapy. *Surg Clin N Am.* 77(3): 701-730.

TUAN, TL et NICHTER, LS. 1998. The molecular basis of keloids and hypertrophic scar formation. *Mol Med Today.* 4(1): 19-24.

UTZ, PJ et ANDERSON, P. 2000. Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis by signaling molecules. *Cell Death Diff.* 7(7): 589-602.

VALAVANIS, C, NABER, S et SCHWARTZ, LM. 2001. *In situ* detection of dying cells in normal and pathological tissues *in* *Methods in cell biology*, vol 66: apoptosis. Edited by Schwartz, LM et Ashwell, JD Academic press, New-York. pp. 394-415.

VAN DEN BOOM, R, WILMINK, JM, O'KANE, S, WOOD, J et FERGUSON, MWJ. 2002. Transforming growth factor- β levels during second-intention healing are related to the different course of wound contraction in horses and ponies. *Wound Rep Reg.* 10(3): 188-194.

WALKER, JA et QUIRKE, P. 2001. Viewing apoptosis through a TUNEL. *J Pathol.* 195(3): 275-276.

WALTON, GS et NEAL, PA. 1972. Observations on wound healing in the horse: the role of wound contraction. *Equine Vet J.* 4(2): 93-97.

WANG, X, RAO, SM et YELDANDI, AV. 1995. Immunohistochemical analysis of p53 mutations in bronchioloalveolar carcinoma and conventional pulmonary adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 8(9): 919-923.

WEITZHANDLER, M et BERNFIELD, MR. 1992. Proteoglycan glycoconjugates *in* Wound healing, biochemical and clinical aspects. Edited by Cohen, KI, Diegelmann, RF, and Lindblad, WJ Saunders, Montreal. pp. 195-208.

WERNER, S et GROSE, R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokine. *Physiol Rev.* 83(3): 835-870.

WHALEN, GF et ZETTER, BR. 1992. Angiogenesis *in* Wound healing, biochemical and clinical aspects. Edited by Cohen, KI, Diegelmann, RF, and Lindblad, WJ Saunders, Montreal. pp. 77-95.

WILLIS, A, JUNG, EJ, WAKEFIELD, T et CHEN, X. 2004. Mutant p53 exerts a dominant effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene.* 23(13): 2330-2338.

WILMINK, JM, STOLK, PW, VAN WEEREN, PR et BARNEVELD, A. 1999a. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopic aspects. *Equine Vet J.* 31(1): 53-60.

WILMINK, JM, VAN WEEREN, PR, STOLK, PW, VAN MIL, FN et BARNEVELD, A. 1999b. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. *Equine Vet J.* 31(1): 61-67.

WILMINK, JM, NEDERBRAGT, H, VAN WEEREN, PR, STOLK, PW et BARNEVELD, A. 2001. Differences in wound contraction between horses and ponies: the *in vitro* contraction capacity of fibroblasts. *Equine Vet J.* 33(5): 499-505.

WILSON, JW et POTTEN, CS. 2001. Morphological recognition of apoptotic cells *in Apoptosis, a practical approach*. Edited by Studzinski. Oxford University Press. Newark. pp. 19-39.

WITTE, MB et BARBUL, A. 1997. General principles of wound healing. *Surg Clin N Am.* 77(3): 509-528.

ZHANG, HY, GHARAEI-KERMANI, M et PHAN, SH. 1997. Regulation of lung fibroblast α -smooth muscle actin expression, contractile phenotype, and apoptosis by IL-1 β . *J Immunol.* 158(3): 1392-1399.

ZHANG, HY et PHAN, SH. 1999. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1). *Am J Respir Cell Mol Biol.* 21(6): 658-665.

ZOU, H, LI, Y, LIU, X et WANG, X. 1999. An APAF-1-cytochrome *c* multimeric complex is a functional apoptosome that activates pro-caspase-9. *J Biol Chem.* 274(17): 11549-11556.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Lepault Elodie		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Biomédecine

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Lepault Elodie, Céleste Christophe, Doré Monique, Martineau Daniel et Théoret Christine	
Titre Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse.	
Revue Wound Repair and Regeneration	Date de publication Soumis pour publication

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Lepault Elodie inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse.</i>		
Coauteur Lepault Elodie	Signature [REDACTED]	Date 31-03-05
Coauteur Céleste Christophe	Signature [REDACTED]	Date 18-04-2005
Coauteur Doré Monique	Signature [REDACTED]	Date 14-04-05
Coauteur Martineau Daniel	Signature [REDACTED]	Date 15 avril 2005
Coauteur Théoret Christine	Signature [REDACTED]	Date 13-04-05
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001

