

Université de Montréal

Identification des Gènes Induits Lors de la Guérison Cutanée
Chez le Cheval, à l'aide de l'Hybridation Soustractive Suppressive

par

Josiane Lefebvre-Lavoie

Département de biomédecine vétérinaire
Faculté de Médecine Vétérinaire



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

Décembre, 2004



© Josiane Lefebvre-Lavoie, 2004

SF

607

U54

2005

v.009

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.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Identification des Gènes Induits Lors de la Guérison Cutanée
Chez le Cheval, à l'aide de l'Hybridation Soustractive Suppressive

présenté par

Josiane Lefebvre-Lavoie

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Jean Sirois, président-rapporteur

Christine L. Theoret, directrice de recherche

Jacques G. Lussier, codirecteur de recherche

Jean-Pierre Lavoie, membre du jury

Une perturbation de l'expression génique pourrait bouleverser le processus de guérison cutanée et entraîner différentes complications, telle la cicatrisation excessive caractéristique des plaies appendiculaires du cheval. Il est capital de définir le profil d'expression génique correspondant à la guérison normale afin de mieux comprendre, prévenir et traiter la cicatrisation pathologique. L'objectif de notre étude était de comparer l'expression génique de la peau normale non-lésée à celle de bords de plaies par hybridation soustractive suppressive pour identifier les gènes différentiellement exprimés lors de la guérison cutanée chez le cheval. Les échantillons provenaient de la région thoracique et comprenaient des biopsies de peau normale non-lésée (IS; intact skin) ainsi que de bords de plaie (WM; wound margin) âgée de sept jours. Les ADNc de IS ont été soustraits des ADNc de WM pour établir une librairie d'ADNc soustraite. Nous avons ainsi discerné 226 ADNc différents. L'identification de neuf gènes (COL1A2, ANX2, COL6A3, ACTB, FGF-7, LAMR1, MMP1, SPARC et TIMP2), dont l'expression génique sept jours suivant un trauma a déjà été démontrée par d'autres études, valide notre modèle expérimental ainsi que l'utilisation du HSS comme technique d'analyse. La confirmation de l'augmentation ou de l'induction d'ADNc de gènes spécifiques (COL1A2, MMP1, DSPG2, CD68, CD163, ADAM9) dans le WM comparativement à l'IS a été effectuée à l'aide d'une analyse RT-PCR. En conclusion, nous avons identifié de nouveaux gènes qui sont exprimés différentiellement dans les bords de plaie de chevaux et qui pourrait moduler la phase proliférative de la guérison.

Mots-clés: guérison, peau, cheval, gène, hybridation soustractive suppressive

Perturbations in gene expression following dermal wounding may disrupt the normal process of repair and lead to pathologic situations resulting in excessive scarring in horses. To better understand, prevent and treat impaired healing it is imperative to first define gene expression occurring during normal repair. The objective of this study was to compare gene expression in normal intact skin and wound margin biopsies, using suppression subtractive hybridization (SSH) to identify candidate genes differentially expressed during wound repair in horses. Tissue samples were obtained from the thoracic area, under local anesthesia, and included both normal intact skin and biopsies from the margin of 7 day old full-thickness wounds. Normal intact skin (IS) cDNAs were subtracted from wound margin (WM) cDNAs and used to establish a subtracted (WM-IS) cDNA library. A total of 226 non-redundant cDNAs were identified. Detection of genes that had previously been shown by others to be expressed 7 days following trauma, such as COL1A2, ANXA2, COL6A3, ACTB, FGF-7, LAMR1, MMP1, SPARC and TIMP2, supports the validity of our experimental model and the use of SSH as the analytical method. An RT-PCR assay confirmed an increase or induction of the cDNAs of specific genes (COL1A2, MMP1, DSPG2, CD68, CD163 and ADAM9) within wound margin biopsies compared with that of intact skin. We conclude that we have identified novel genes, characterized and uncharacterized, that are differentially expressed in equine wound margin biopsies and which may modulate the proliferative phase of repair.

Keywords: healing, skin, horse, gene, suppression subtractive hybridization

Table des matières

	Page
Page titre	i
Page d'identification du jury	ii
Résumé en français	iii
Résumé en anglais	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Listes des sigles et abréviations	x
Remerciements	xiv
Introduction	1
Recension de la littérature	2
1. Guérison cutanée chez l'adulte	2
1.1. Phase inflammatoire et résolution de l'inflammation	2
1.1.1. Les plaquettes	2
1.1.2. Les mastocytes	4
1.1.3. Les neutrophiles	4
1.1.4. Les macrophages	6
1.2. Phase de prolifération cellulaire	8
1.2.1. La réépithélialisation	8
1.2.2. L'angiogénèse	9
1.2.3. La fibroplasie	11
1.2.4. La contraction	15
1.3. Phase de synthèse et remodelage	17
2. Contrôle génique de la guérison cutanée normale	21
3. Guérison cutanée problématique	23
3.1. Les plaies chroniques	23
3.2. Les cicatrices hypertrophiques et les chéloïdes	24
4. Guérison cutanée chez le cheval	26

5. Hybridation soustractive suppressive	31
6. Hypothèse et objectif	32
Méthodologie	33
1. Modèle de guérison	33
2. Prise d'échantillons	33
3. Extraction et traitement de l'ARN	34
4. RT-PCR par la méthode SMART®	35
5. Analyse des ADNc	35
6. Hybridation et soustraction	37
7. Vérification de la soustraction	41
8. Clonage des ADNc soustraits	41
9. Criblage différentiel de la génothèque soustraite d'ADNc	42
9.1. Établissement des macro-réseaux	42
9.2. Synthèse des sondes radioactives d'ADNc	44
9.3. Hybridation et détection des clones positifs	44
10. Sélection, séquençage et analyse d'homologie des ADNc	45
10.1. Sélection des clones d'ADNc	45
10.2. Séquençage et analyse d'homologie	46
11. Validation de l'expression différentielle d'ADNc sélectionnés	46
11.1. Sélection et préparation des ADNc	47
11.2. RT-PCR semiquantitatif	47
12. Analyse statistique	48
Article	49
1. Abstract	50
2. Introduction	50
3. Materials and methods	52
3.1. Experimental animal model, tissue collection, and RNA isolation	52
3.2. Suppression subtractive hybridization (SSH)	53
3.3. Cloning of subtracted complementary DNAs	54
3.4. Differential hybridization screening	54
3.5. DNA sequencing and sequence analysis	55

3.6. Gene expression analysis	56
3.7. Statistical analysis	56
4. Results	57
4.1. Experimental model	57
4.2. Identification of differentially expressed genes using SSH	57
4.3. Gene expression analysis	60
5. Discussion	69
6. References	77
Discussion générale	89
Conclusion	101
Bibliographie	102

Liste des tableaux

		Page
Tableau I	Liste des oligonucléotides utilisés et qui sont fournis dans les trousse « SMART PCR cDNA Synthesis » et « PCR-Select cDNA Subtraction » de Clontech	40
Tableau II	Liste des oligonucléotides formulés pour la vérification de la soustraction	41
Tableau III	Liste des oligonucléotides formulés pour la validation de la méthodologie	48
Tableau IV	Classification des 22 gènes observés lors du processus de guérison cutanée, mais pas nécessairement lors de la phase proliférative	96
 Article		
Table I	Identification of cDNA clones found by SSH to be differentially expressed in equine wound margin biopsies (WM) compared to intact skin (IS)	62
Table II	Classification of the 22 genes previously reported to be present in dermal wound repair but not known to be expressed specifically during the proliferative phase	74

Liste des figures

		Page
Figure 1	Schéma représentant un modèle des rôles de Cyr61 lors de la guérison cutanée (Chen et coll., 2001b)	14
Figure 2	Schéma représentant les différentes étapes de l'analyse effectuée lors de l'exécution de la technique de SSH	36
Figure 3	Schéma représentant les différentes étapes requises pour l'exécution de la technique HSS	38
Article		
Figure 1	Evaluation of subtraction efficiency	58
Figure 2	Representative results of differential screening by macroarrays of the WM-IS cDNA library	59
Figure 3	Classification of the sequenced WM-IS cDNA clones	60
Figure 4	Analysis of mRNA expression by RT-PCR	61

Listes des sigles et abréviations

μg	microgramme
μl	microlitre
μM	micromolaire
α-SMA (ACTA1)	alpha smooth muscle actin
α ₂ -AP	inhibiteur α ₂ -antiplasmine
Ack2	kinase-activated Cdc42-associated kinase-2
ACTB	beta-actin
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase domain
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ANXA2	annexine II
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATIII	antithrombine III
CALU	calumenin
CAPS	calcium dependent activator protein
CCPA	Conseil Canadien de Protection des Animaux
CD	cluster differentiation
CDH	cadherin
COL1A	collagen type I alpha
COL3A	collagen type III alpha
COL6A	collagen type VI alpha
COL14	collagen type XIV
CTSK	cathepsin K
CRRA	Centre de Recherche en Reproduction Animale
DAD	defender against cell death
dCTP	désoxycytosine triphosphate
DDRT-PCR	differential display reverse transcription polymerase chain reaction
DEPC	diéthylpyrocarbonate

dNTP	désoxynucléotide triphosphate
DSPG	dermatan sulfate protéoglycan
E coli	<i>Escherichia coli</i>
EGF	epidermal growth factor
EGF-R	récepteur de EGF
FGF	fibroblast growth factor
FTL	ferritin light chain
GAPD	glyceraldehyde 3-phosphate déshydrogénase
GM-CSF	granulocyte-macrophage growth stimulating factor
GP	glutathione peroxidase
GST	glutathione S-transferase
GSTM	glutathione S-transferase microsomal
HDLC	cytoplasmique dynein light chain
h	heure
HOX	homoeobox
HS	heparan sulphate
HSS (SSH)	hybridation soustractive suppressive
IGF	insulin-like growth factor
IL	interleukine
IFN	interféron
ITPG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
IS	intact skin
Kan	kanamycine
kb	kilobase
KGF	keratinocyte growth factor
LAMP	lysosome associated membrane proteins
LAMR	laminin receptor
LDL	lipoprotéine de faible densité
LPC	lipocortin
LUM	lumican
MCP	macrophage chemotactic protein

mda	human melanoma differentiation associated gene
MEC (ECM)	matrice extracellulaire
mg	milligramme
ml	millilitre
mm	millimètre
mM	millimolaire
MMP	matrix metalloproteinase
MPS1	macrophage-specific gene
MRP	migration inhibitory factor-related protein
ng	nanogramme
NIH	National Institute of Health
NIP	interacting protein
nm	nanomètre
P ³²	phosphore radioactif
PA	plasminogen activator
PAF	platelet-activating factor
PAI	plasminogen activator inhibitor
pb	paire de base
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PGI ₂	prostacycline
PRX	paired-related homeobox gene
PSAP	prosaposin
rpm	rotation par minute
RSB	Research Services Branch
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SERPINB10	serine proteinase inhibitor, clade B, member 10
SERPINF1	serine proteinase inhibitor, clade F, member 1
S-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactoside
SH3	Src homology 3 domain

SLP	stomatin-like protein
SNX	sorting nexin
SPARC	secreted protein acidic cystein rich
SSAT	spermidine/spermine acétyltransférase
SRP	signal recognition particle
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TNF	tumor necrosis factor
tPA	tissue plasminogen activator
TRADD	TNF receptor 1-associated protein
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling
uPA	urokinase plasminogen activator
UV	ultra-violet
VEGF	vascular endothelial growth factor
WM	wound margin

Remerciements

Mes remerciements les plus sincères au Dre Christine Theoret pour sa présence tout au long du projet et pour ses précieux conseils. Merci de m'avoir permis d'approfondir mes connaissances sur un sujet passionnant, la guérison, et d'assouvir ma curiosité envers cette merveilleuse bête qu'est le cheval. Un remerciement particulier pour sa grande générosité de temps ainsi que de connaissances.

Ma reconnaissance au Dr Jacques Lussier pour m'avoir guidé dans le volet pratique de ce beau projet par son aide et ses conseils.

Merci à tous mes collègues de travail de la Faculté de médecine vétérinaire de St-Hyacinthe pour leur soutien et leurs conseils, spécialement à Élodie Lepault et Tania Fayad.

Merci à mon conjoint, mes parents et amis, pour avoir cru en moi et pour m'avoir soutenue tout au long de cette belle aventure.

Introduction

La guérison cutanée est un processus complexe impliquant plusieurs types cellulaires qui participent à l'une ou plusieurs des trois étapes se chevauchant dans le temps: la phase inflammatoire; la phase de prolifération; et la phase de synthèse et de remodelage. Le déroulement de la guérison est sous le contrôle de nombreux gènes qui sont exprimés transitoirement. Les protéines encodées par ces gènes initient ou altèrent les cascades de signalisation intracellulaire et engendrent différents mécanismes requis pour le processus de guérison. Parmi les protéines encodées par ces gènes on pense notamment aux médiateurs inflammatoires tels les cytokines et facteurs de croissance, aux composants de la matrice extracellulaire (MEC), et aux enzymes dégradant cette matrice, les métalloprotéinases de matrice (MMP).

Une caractéristique importante de la guérison chez le mammifère adulte est la formation d'une cicatrice, c'est-à-dire que le tissu initial n'est pas régénéré mais plutôt réparé. La réparation se définit par la formation de tissu ne contenant pas tous les éléments différenciés du tissu initial, en vue de renouer la continuité interrompue par une blessure. La guérison chez le fœtus, par contraste, se démarque par l'absence de cicatrice puisque le tissu originaire est régénéré, c'est-à-dire remplacé par des cellules identiques à celles ayant été perdues. Dans le meilleur des cas, l'adulte subissant une blessure développera une cicatrice inesthétique et pouvant limiter son mouvement, selon sa localisation. Or, la cicatrisation peut devenir excessive, menant à un désordre fibroprolifératif. Le foie, les reins, les poumons, la peau et plusieurs autres organes sont la cible d'un tel problème.

Un objectif principal de la recherche dans le domaine de la cicatrisation est de mieux en saisir son contrôle génique. La compréhension du contrôle génique de la guérison normale chez l'adulte, de la guérison particulière du fœtus, ainsi que de la guérison pathologique fournirait de l'information cruciale pour résoudre les problèmes de cicatrisation.

La guérison cutanée chez le cheval est très souvent réalisée par seconde intention, la guérison de première intention étant généralement réservée aux plaies

chirurgicales aseptiques et ne présentant aucune déficience tissulaire. Les processus d'inflammation et de fibroplasie sont souvent prolongés, et des complications telle la formation de chéloïdes surviennent fréquemment. En effet, le cheval est la seule espèce, excepté l'homme, atteinte de chéloïdes, aussi nommés « boutons de chair ». Or, malgré un impact financier majeur sur l'industrie équine, on en connaît très peu sur la fibroplasie excessive et la chronicité concomitante des blessures cutanées du cheval. La littérature abonde d'études décrivant des traitements possibles pour prévenir et contrôler ce problème chez le cheval, mais aucun n'accomplit systématiquement l'effet désiré. Ces résultats décourageants sont en partie attribuables au fait que le contrôle génique de la guérison, en particulier la phase de prolifération, demeure à ce jour incomplètement décrit.

L'objectif de cette étude est d'identifier les gènes impliqués lors de la phase proliférative en comparant l'expression de gènes dans la peau normale intacte à ceux présents dans une plaie dermique sept jours après sa création expérimentale sur le thorax du cheval.

Recension de la littérature

1. Guérison cutanée chez l'adulte

1.1. Phase inflammatoire et résolution de l'inflammation

L'inflammation est une étape primordiale de la guérison cutanée. Il est postulé qu'une phase inflammatoire retardée mais prolongée dans le temps serait un facteur pouvant mener à des problèmes de cicatrisation chez le cheval (Wilmink et coll., 1999 a et b). L'inflammation est une étape précoce du processus de guérison et elle est marquée par l'action de plusieurs cellules dont les plaquettes, les mastocytes, les neutrophiles et les macrophages. De nombreux médiateurs entrent aussi en jeu pour contrôler les actions de chacun des types cellulaires.

1.1.1. Les plaquettes

La coagulation du sang et l'agrégation des plaquettes ont comme première fonction l'hémostase puisqu'elles mènent à la formation d'un caillot, induit par trois

facteurs principaux suite à un trauma. Le premier est le facteur Hageman (ou facteur XII) qui expédie l'activation de plusieurs autres facteurs jusqu'à la formation ultime du caillot. Le deuxième est le facteur pro-coagulant, relâché par les cellules endommagées par un trauma. Le troisième regroupe les facteurs de coagulation à la surface membranaire ainsi que les phospholipides exprimés sur les plaquettes et les cellules endothéliales activées. Le caillot est formé à partir du fibrinogène, une protéine du sang, qui sous l'action de la thrombine est convertit en fibrine. La fibrine se polymérise pour former des protofibrilles qui s'associent latéralement en fibres de fibrine, qui elles, s'enlacent pour former le caillot. La taille de ce dernier est contrôlée par plusieurs facteurs dont la prostacycline (PGI_2), qui inhibe l'agrégation plaquettaire, l'antithrombine III (ATIII), qui empêche l'action de la thrombine, et la protéine C, qui dégrade les facteurs de coagulation. La plasmine produite lorsque l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) ou tissulaire (tPA) clive le plasminogène, lyse le caillot. Plusieurs récepteurs de surface, comme l'annexine II (ANX)A2, permettent de situer ce système d'activation du plasminogène directement à la surface des cellules pour obtenir une meilleure activité catalytique et le protéger des inhibiteurs (Kim et coll., 2002). Parmi ces derniers, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI) et l'inhibiteur α_2 -antiplasmine (α_2 -AP), préviennent la dégradation excessive du caillot en régulant la formation de l'activateur du plasminogène (PA).

Le caillot a d'autres fonctions que l'hémostase, qui sont particulièrement importantes lors de la guérison. Il sert d'échafaud pour la migration des cellules nécessaires aux phases subséquentes, et il agit comme réservoir de cytokines, nécessaires à la migration et à la prolifération cellulaires ainsi qu'à la synthèse de composants de la MEC. L'interaction entre les cellules et la MEC, à la base de la migration, se fait principalement via des intégrines / protéines d'adhérence, un type de récepteur retrouvé à la surface cellulaire.

L'agrégation et l'adhésion des plaquettes assurent l'efficacité de l'hémostase par l'entremise du caillot. Les plaquettes activées libèrent de leurs granules alpha plusieurs médiateurs, comme le fibrinogène, la fibronectine, la vitronectine, la thrombospondine et le facteur VIII von Willebrand. Les plaquettes relâchent aussi

des facteurs chimiotactiques (Greenhalgh, 1998), tels le platelet-derived growth factor (PDGF), les transforming growth factors (TGF) $-\alpha$ et $-\beta$, et l'epidermal growth factor (EGF) qui provoquent la migration des neutrophiles, des macrophages, ainsi que des cellules endothéliales (Borel et coll., 1998).

1.1.2. Les mastocytes

Il existe deux types de mastocytes; ceux associés aux muqueuses et ceux présents dans le tissu conjonctif (Male et coll., 1997a). Le dernier type, surtout présent autour des vaisseaux sanguins (Lydyard et coll., 1997), est attiré vers le site de trauma par la présence de plaquettes et exerce de multiples rôles via la sécrétion de diverses molécules survenant lors de la dégranulation du mastocyte. Parmi les molécules relâchées on retrouve notamment des histamines et de la sérotonine qui entraînent une dilatation des vaisseaux sanguins et augmentent la vasoperméabilité, facilitant ainsi l'apport en cellules et en nutriments au site traumatisé (Male et coll., 1997b). D'autres produits de mastocytes dégranulés incluent des facteurs chimiotactiques pour les fibroblastes, et d'autres, tel l'interleukine (IL)-4, favorisant la synthèse collagénique par ces derniers (Borel et coll., 1998). De plus, la tryptase larguée par les mastocytes activés est un facteur de croissance pour les fibroblastes et pourrait ainsi être associée aux phénomènes de fibrose (Brostoff et coll., 1997). Les mastocytes secrètent également des enzymes protéolytiques qui activent les MMPs, dont la fonction principale est de dégrader les composantes de la MEC (Borel et coll., 1998).

1.1.3. Les neutrophiles

Les neutrophiles sont la première ligne de défense dans une plaie infectée où ils détruisent les bactéries et dégradent les tissus nécrosés. Cependant, contrairement aux macrophages, ils ne sont pas essentiels à la guérison d'une plaie non-infectée (Simpson et coll., 1972).

Les neutrophiles sont attirés au site d'infection par plusieurs facteurs, dont les fibrinopeptides, le C5a de la cascade du complément, le leucotriène B4 qui provient des neutrophiles activés, le platelet-activating factor (PAF) issu de cellules

endothéliales et de neutrophiles activés, le peptide formyle méthionyle clivé de protéines bactériennes, et le PDGF libéré par les plaquettes (Clark, 1996). Toutes ces molécules facilitent le passage du neutrophile à travers l'endothélium en induisant l'expression à sa surface de la protéine CD11/CD18 (Tonnesen et coll., 1989), qui amplifie son adhérence à l'endothélium, ainsi qu'en favorisant la libération d'élastase et de collagénase, deux enzymes qui facilitent la diapédèse (Albelda et coll., 1990). D'autres médiateurs peuvent influencer les neutrophiles; en effet IL-1 et TNF- α stimulent la libération de radicaux libres oxygénés (Dinarello et coll., 1999) et la production de collagénase et d'autres MMPs (Unemori et coll., 1994). De plus, les neutrophiles sont la source de plusieurs cytokines pro-inflammatoires.

Des processus enzymatiques impliquant des protéinases et des oxydases ainsi que des radicaux libres oxygénés sont les principales armes de destruction du neutrophile ayant phagocyté des contaminants. Ces mécanismes d'action n'ont pas de substrat particulier, ainsi un grand nombre de neutrophiles peuvent engendrer des dommages importants sur les tissus environnants (Greenhalgh, 1998). En plus de léser les tissus, les protéinases larguées par les neutrophiles peuvent cliver les composants de la MEC en protéines ayant un effet chimiotactique pour d'autres cellules inflammatoires. La persistance des neutrophiles, tel que noté dans les plaies appendiculaires du cheval (Wilmink et coll., 1999b) semble donc dommageable.

Lors de la guérison normale, le nombre de neutrophiles diminue à partir de 48 h (Borel et coll., 1998) par un ou plusieurs des mécanismes suivants: 1) emprisonnement dans le caillot; 2) désensibilisation du neutrophile envers ses chimioattractants; et 3) apoptose puis phagocytose par les macrophages. Un même macrophage peut phagocyter plus d'un neutrophile apoptotique, et ce, sans stimuler le relâchement de médiateurs généralement produits lors de la phagocytose (Haslett et coll., 1996). Le phénomène de l'apoptose est donc non-inflammatoire, ce qui prévient la destruction des tissus environnants.

1.1.4. Les macrophages

Les macrophages résidants de la peau sont en nombre insuffisant pour monter une réponse inflammatoire adéquate suite à un trauma. Les monocytes présents dans la circulation sanguine seront donc recrutés et subiront une différenciation en macrophage tissulaire afin de palier à cette pénurie. Le recrutement se fait sous l'influence de plusieurs facteurs chimiotactiques dont les fragments de collagène et de fibronectine, l'élastine, la thrombine active et le TGF- β . Les macrophages tissulaires se multiplient par la suite afin d'assurer le déroulement normal de l'inflammation et des étapes subséquentes de la guérison. Ils produisent à leur tour des composés qui sont chimiotactiques pour les macrophages ou pour les monocytes. En particulier, les β -chémokines, telle macrophage chemotactic protein (MCP)-1, permettent l'accumulation de monocytes et de macrophages pendant la phase inflammatoire (Kunkel et coll., 1991). Platelet derived growth factor et TGF- β , produits au départ par les plaquettes activées, puis par les macrophages tissulaires, stimulent la migration de ces derniers et agissent au niveau du remodelage et de l'angiogénèse (Pierce et coll., 1989). Il existe donc des cascades d'auto-amplification par lesquelles les macrophages seront de plus en plus nombreux au site de trauma. Depuis quelques temps, il est possible de suivre l'évolution de la phase inflammatoire repérant spécifiquement les macrophages par l'entremise de marqueurs de surface, comme le cluster differentiation (CD)68 qui se retrouve majoritairement sur ces cellules (Holness et coll., 1993b).

Les monocytes ont la capacité de produire des enzymes de dégradation avant leur différenciation en macrophages tissulaires. Ils synthétisent des hydrolases acides, des protéinases (sérines et cystéines) ainsi que des MMPs (collagénases et gélatinases) (Riches, 1996). Ils élaborent aussi le tissu inhibitor of metalloproteinase (TIMP)1 pour limiter la dégradation des composants de la MEC par les MMPs (Campbell et coll., 1987). Les monocytes participent donc directement à la phase inflammatoire en aidant au débridement de la blessure, cependant ils ne participent pas au remodelage comme le font les macrophages.

En effet, les macrophages ont plusieurs rôles dont le débridement, l'élimination des bactéries et l'organisation des phases subséquentes de prolifération et de synthèse et remodelage, qui sont exécutés grâce à plusieurs mécanismes rigoureusement contrôlés par l'environnement extracellulaire. Le débridement se fait principalement via l'activité de diverses enzymes de dégradation, telles les élastases et les collagénases, synthétisées par les macrophages (Werb et coll., 1980). Cette batterie d'enzymes permet au macrophage d'effectuer une première dégradation extracellulaire avant de phagocyter les fragments et de les digérer via un système d'enzymes lysosomales. Ce sont ces mêmes enzymes qui jouent un rôle important lors du remodelage.

Les macrophages agissent sur les phases subséquentes de la guérison notamment en relâchant des cytokines et des facteurs de croissance, qui vont par la suite influencer l'action de différents types cellulaires. Parmi ces facteurs on retrouve: EGF, TGF- α , fibroblast growth factor (FGF) de types a et b, PDGF, vascular endothelial growth factor (VEGF), TGF- β_1 , - β_2 et - β_3 , IL-1, -3, -6 et -8 (Borel et coll., 1998). Ils ont des rôles dans le mécanisme de l'induction de la migration et de la prolifération cellulaire ainsi que sur le contrôle de la synthèse de la MEC (Riches, 1996).

Lors de la résolution de l'inflammation les macrophages jouent un rôle important dans le nettoyage de la plaie, c'est-à-dire en éliminant les fluides via pinocytose et en phagocytant les protéines endommagées (Haslett et coll., 1996). Les fluides et quelques fragments du caillot peuvent aussi être éliminés par le système lymphatique (Haslett et coll., 1996). Les médiateurs chimiotactiques des monocytes doivent être éliminés, ainsi que les facteurs qui permettent leur différenciation, comme il était le cas pour les neutrophiles. Un certain nombre de macrophages meurent par apoptose; certains chercheurs croient que le TGF- β serait impliqué dans ce phénomène (Greenhalgh, 1998). Le moyen par lequel les macrophages apoptotiques sont finalement éliminés des tissus demeure incertain.

Une prompt résolution de l'inflammation est donc capitale à la guérison cutanée normale et comporte les étapes suivantes: élimination des stimuli initiaux,

arrêt d'émigration de neutrophiles et de monocytes sanguins, arrêt de sécrétion de stimuli inflammatoires par les granulocytes, arrêt de différenciation des monocytes en macrophages, élimination des fluides, des protéines et des bactéries par les neutrophiles et granulocytes, puis, réparation des tissus endommagés.

1.2. Phase de prolifération cellulaire

La phase proliférative débute alors que la phase inflammatoire diminue en intensité. Cette phase, comme la précédente, implique la participation de plusieurs types cellulaires, notamment les kératinocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les myofibroblastes. Ces types particuliers sont engagés dans différents processus, respectivement, la réépithélialisation, l'angiogénèse, la fibroplasie et la contraction. Plusieurs gènes sont impliqués durant cette phase et leur régulation est d'autant plus complexe vu le nombre d'interactions entre les cellules, les molécules de la MEC et les diverses enzymes participant à la dégradation de la MEC.

1.2.1. La réépithélialisation

Le phénomène de réépithélialisation est défini par le recouvrement de la plaie par un nouvel épithélium effectué par la migration des kératinocytes bordant la blessure à travers la matrice provisoire. Cette migration débute entre 24 et 48 h suivant le traumatisme. Pour migrer, les kératinocytes sont libérés de la membrane basale par l'action de l'uPA, produisant de la plasmine à partir du plasminogène présent dans la membrane basale, ce qui facilite la différenciation en kératinocytes migrants. Le mode exact de migration des kératinocytes n'est pas encore connu; on soupçonne l'action de facteurs chimiotactiques, une migration par guides de contact («contact guidance»), la perte des cellules voisines, ou encore une combinaison de ces derniers mécanismes (Winter et coll., 1972).

Certaines cytokines influencent les fonctions des kératinocytes. L'IL-1 est relâché par les kératinocytes de la plaie pour stimuler leur croissance, leur chimiotaxie (Sauder et coll., 1990) et leur production d'IL-1 et de TGF- α (Betchel

et coll., 1996). Le kératinocyte growth factor (KGF), qui est induit par l'action du TNF- α sur les kératinocytes, favorise leur migration (Brauchle et coll., 1994). L'epidermal growth factor amène les kératinocytes à migrer, à se diviser et à se différencier (Wenczak et coll., 1992) alors que TGF- β stimule la migration, la production de fibronectine (Greenhalgh, 1998) et inhibe la prolifération du kératinocyte.

Les kératinocytes non-migrateurs commencent à proliférer en bordure de la plaie deux jours après que la migration soit commencée, afin d'assurer le remplacement de ceux s'étant déplacés (Krawczyk, 1971). Une fois la réépithélialisation terminée, la membrane basale est restaurée en partant des bordures de la blessure jusqu'au centre (Clark et coll., 1982). La re-formation des différentes strates de l'épithélium se fera sur une plus longue période.

1.2.2. L'angiogénèse

L'angiogénèse est le processus par lequel les nouveaux vaisseaux sanguins sont créés. Lors de traumatisme cutané, de nouveaux vaisseaux doivent être formés pour alimenter en oxygène et en nutriments les différentes cellules nécessaires au processus de guérison; c'est pourquoi le tissu de granulation formé lors de la phase proliférative est très vascularisé. Une faible tension en oxygène ainsi que le VEGF et le bFGF sont des facteurs spécifiques à l'angiogénèse, alors que TGF- β , EGF et PDGF, aussi des facteurs promouvant l'angiogénèse, exercent une action indirecte en favorisant la production de VEGF et bFGF (Sato et coll., 1993).

Suite à un traumatisme, les cellules endothéliales des capillaires avoisinants migrent pour former de nouveaux vaisseaux. Pour ce faire, les platelet endothelial cell adhesion molecules (PECAM) en surface des cellules endothéliales microvasculaires se regroupent près de l'extrémité frontale au lieu d'un peu partout sur la cellule (Schimmenti et coll., 1992). Ce regroupement est essentiel pour la signalisation et la coordination des différents mécanismes impliqués lors de la migration des cellules endothéliales (Gratzinger et coll., 2003). Les cellules endothéliales migratoires ont la capacité d'interagir avec la MEC par l'entremise de

protéinases, dont la sécrétion est induite par bFGF (Moscatelli et coll., 1986; Mignatti et coll., 1991), pour digérer certains composants de la membrane basale (Mignatti et coll., 1986; Mignatti et coll., 1989; Montesano et coll., 1986), ainsi que par leur adhérence aux molécules telle la fibronectine qui agirait dans le processus de «contact guidance» (Clark et coll., 1986). Le contrôle de la migration fait appel à plusieurs médiateurs: PDGF et bFGF induisent la migration tandis que TGF- β et angiotensine II l'inhibent (Bell et coll., 1990; Bell et coll., 1992). Les intégrines $\beta 1$ semblent également jouer un rôle de premier ordre lors du processus migratoire en assurant des interactions avec la MEC, puisque leur inhibition avec des anticorps entrave la migration (Basson et coll., 1992).

Tout comme les kératinocytes de bord de plaie, les cellules endothéliales des capillaires avoisinants doivent assurer le remplacement des cellules migratoires. Pour ce faire elles prolifèrent, généralement deux ou trois jours suite au trauma, sous l'influence, entre autre, de TGF- β et PDGF (Marx et coll., 1994; Madri et coll., 1988).

La formation et la maturation de nouveaux microvaisseaux à partir des cellules ayant migré assurent le rétablissement de la circulation sanguine. La formation de ces capillaires dépend d'interactions intercellulaires ainsi qu'entre les cellules et la MEC, dont les PECAM et les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ sont, en grande partie, responsables (Madri et coll., 1992; Albelda et coll., 1990). La formation de la lumière du vaisseau est dépendante de deux phénomènes inverses maintenus en équilibre fragile. Le premier est l'action protéolytique induite par bFGF pour creuser la lumière. Le deuxième est l'action anti-protéolytique induite par TGF- β pour contrôler le diamètre du microvaisseau en formation (Pepper et coll., 1990; Montesano et coll., 1990).

Les stimuli de l'angiogénèse disparaîtront dans les phases subséquentes de la guérison, ayant comme résultat la régression des nouveaux capillaires. Cette régression sera maximale entre 16 et 25 jours suite à la blessure et résulte de l'apoptose des cellules endothéliales microvasculaires (Madri et coll., 1996). L'apoptose des cellules endothéliales survient parallèlement à celle des fibroblastes

(Greenhalgh, 1998) menant ainsi à une diminution de la cellularité du tissu de granulation pour éventuellement conduire à la formation d'une cicatrice acellulaire.

Comme l'angiogénèse est un phénomène essentiel à la guérison, et qu'il est parfois incriminé lors d'une mauvaise guérison, certains chercheurs ont investigué les gènes régulant ce processus. L'immunohistochimie ainsi que l'hybridation *in situ* ont été utilisés pour examiner l'expression des gènes Hox B3 et Hox D3 dans le système vasculaire suite à un trauma chez les souris qui guérissent normalement et celles manifestant une déficience lors de la guérison (Uyeno et coll., 2001). Les gènes Hox ou Homeobox constituent une famille de facteurs de transcription (Uyeno et coll., 2001). Plus précisément, Hox D3 encourage la migration des cellules endothéliales (Boudreau et coll., 1997) et induit leur synthèse de collagène de type I (Uyeno et coll., 2001), ce qui favorise l'angiogénèse cruciale à la guérison normale. Alors qu'aucune différence dans l'expression de Hox B3 ne fut décelée, l'expression de Hox D3 est fortement augmentée un jour suite au trauma et cette augmentation est soutenue jusqu'à au moins sept jours lors de la guérison normale. Lors de la guérison chronique, l'expression de Hox D3 est retardée et se retrouve en plus faible concentration (Uyeno et coll., 2001).

1.2.3. La fibroplasie

La fibroplasie correspond à la formation de tissu de granulation par des fibroblastes synthétiques. Ces derniers sont souvent incriminés lors de maladies impliquant la formation excessive de tissu de granulation telle qu'observée lors du développement de chéloïde. Les interactions complexes entre les fibroblastes, les composants de la MEC et les cytokines se doivent d'être élucidées avant de pouvoir soigner efficacement les patients atteints de fibroplasie excessive et de fibrose subséquente.

L'apparition de fibroblastes dans la plaie se fait entre cinq et sept jours suite au trauma (Theoret, 2001a). Ils proviennent soit de fibroblastes résidents ou de la migration de fibroblastes peuplant les tissus voisins, le phénotype migratoire étant le premier observé suite à une blessure. Les fibroblastes migratoires, sous

l'influence de diverses cytokines, produisent des enzymes protéolytiques, comme PA et différentes MMPs, afin de se frayer un chemin à travers la matrice provisoire (Grant et coll., 1987; Wilhelm et coll., 1987). Ils se lient aux composants de cette dernière via des récepteurs membranaires comme les intégrines (Gailit et coll., 1993), phénomène qui est aussi régulé par divers facteurs de croissance dont PDGF et TGF- β (Heino et coll., 1989; Ahlen et coll., 1994; Gailit et coll., 1996).

Une fois arrivés au site voulu, les fibroblastes substituent un phénotype synthétique à leur phénotype migratoire afin de synthétiser différents composants de la MEC tel la fibronectine, l'acide hyaluronique et le collagène. Les fibroblastes synthétiques relâchent également du TGF- β (Clark et coll., 1995) qui agit de manière autocrine pour induire une synthèse protéique accrue (Roberts et coll., 1986). L'IL-1 (Unemori et coll., 1994, Canalis, 1986), l'IL-4, l'EGF (Nanney et coll., 1996), le TNF- α (Senet et coll., 1997, Dayer et coll., 1985) et le PDGF (Senet et coll., 1997) en provenance de diverses sources, induisent aussi les fibroblastes à synthétiser des protéines peuplant la MEC. Après avoir déposé une matrice riche en collagène, les fibroblastes cessent de produire cette protéine même en présence de TGF- β , par l'entremise d'un rétrocontrôle négatif émanant de la matrice (Clark et coll., 1995; Senet et coll., 1997). La matrice produite par les fibroblastes en est une permanente mais immature qui sera, dans les étapes subséquentes de la guérison, remodelée et remplacée par une cicatrice acellulaire plus résistante.

En résumé, les fibroblastes affectent la MEC via la synthèse et la dégradation de différents composés de cette dernière, alors que la MEC influe les fibroblastes en contrôlant certaines de leurs fonctions. La réciprocité entre la MEC et les fibroblastes progressera au fur et à mesure que le tissu de granulation prendra de la maturité.

Les fibroblastes sont en partie éliminés par apoptose, comme plusieurs autres types cellulaires, ou alors se différencient en myofibroblastes. Les signaux exacts régulant l'apoptose du fibroblaste ne sont pas encore connus. L'interaction des fibroblastes avec la MEC pourrait aussi jouer un rôle dans le contrôle de l'apoptose. En effet, la modification de leur ancrage extracellulaire stimulerait

l'élimination des fibroblastes. De plus, certaines cytokines semblent augmenter ou diminuer l'apoptose des fibroblastes: l'insulin-like growth factor (IGF)-1 limite l'apoptose pour permettre aux fibroblastes de proliférer (Greenhalgh, 1998), alors que l'interféron (IFN) joue un rôle inverse puisqu'il entraîne une diminution du nombre de fibroblastes et de la synthèse de collagène par ces derniers (Harrop et coll., 1995, Pittet et coll., 1994). En plus de contrôler le nombre et l'activité des fibroblastes, l'apoptose est impliquée dans le contrôle de la dégradation du collagène (Greenhalgh, 1998). En effet, la protéine pro-apoptotique p53 se lie au promoteur du gène de la collagénase type IV, ce qui active sa production (Greenhalgh, 1998).

Il apparaît que les fibroblastes forment une population hétérogène à l'intérieur d'une plaie (Sempowski et coll., 1995). Comme ils peuvent adopter différents phénotypes, le stade de guérison et le site d'échantillonnage influenceront les caractéristiques des fibroblastes en culture. Ces phénotypes sont classés selon la fonction première du fibroblaste. On retrouve ainsi: 1) les fibroblastes migratoires; 2) les fibroblastes prolifératifs; 3) les fibroblastes synthétiques; et 4) les fibroblastes contractiles (myofibroblastes). Les recherches effectuées *in vitro* sont donc souvent réalisées sur des populations hétérogènes, ce qui peut entraîner une instabilité des cultures. Ainsi la forme, la vitesse de croissance, la grosseur des cellules, et leur capacité à produire différentes enzymes et différents facteurs de croissance en sont affectées.

Le contrôle génique de la fibroplasie est à ce jour très peu connu. En outre, la protéine Cyr61 a été le sujet d'une importante étude sur ce sujet. Cette protéine, synthétisée principalement par les fibroblastes et les cellules endothéliales, et associée à la MEC, est surtout connu pour ses capacités angiogéniques mais participe aussi aux phénomènes d'adhésion, de migration et de prolifération des fibroblastes (Chen et coll., 2000, Greszkiewicz et coll., 2001). De plus, cette protéine semble réguler l'activité de MMP3 (Chen et coll., 2001a). La recherche avait comme but d'identifier, à l'aide de la technique de micro-réseaux d'ADNc, les gènes régulés par la protéine Cyr61 chez les fibroblastes dermiques *in vitro* (Chen et coll., 2001b). Quarante gènes ont démontré une expression deux fois plus ou

moins importante chez les fibroblastes traités avec la protéine Cyr61. De ces 40, 12 ont été identifiés et confirmés par d'autres analyses. Parmi ces 12, 10 gènes sont induits par l'ajout de Cyr61; VEGF-A et -C, IL-1 β , MMP1 et -3, TIMP1, uPA, PAI-1, et les sous-unités α 3 et α 5 des intégrines. Les deux autres gènes, soit les sous-unités α 1 et α 2 du collagène type I, ont démontré une diminution de leur expression suite au traitement avec Cyr61. Une expérience *in vivo* a aussi permis de déterminer la cinétique d'expression génique de Cyr61 au cours de la guérison cutanée chez la souris (Chen et coll., 2001b). L'expression de Cyr61 atteint son maximum cinq jours après création d'une lésion cutanée, ce qui correspond à la phase où le tissu de granulation est fortement peuplé de fibroblastes. Une fois la phase de remodelage entamée, l'expression de Cyr61 est à peine détectable. Cette étude suggère un modèle d'action de Cyr61 lors de différentes phases (inflammation, angiogénèse et remodelage) de la guérison cutanée (Figure 1) (Chen et coll., 2001b).

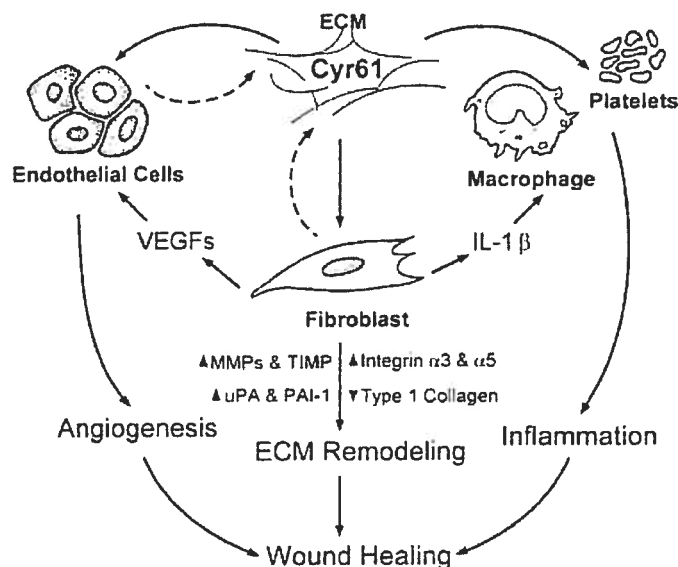


Figure 1 Schéma représentant un modèle des rôles de Cyr61 lors de la guérison cutanée (Chen et coll., 2001b)

1.2.4. La contraction

La contraction est un événement mécanique qui se concrétise par le rapprochement des bords de plaie afin d'en diminuer la superficie. Ce phénomène s'exécute grâce à un type cellulaire particulier, le myofibroblaste, qui provient de la différenciation du fibroblaste, et dépend des interactions entre les cellules, la MEC et les cytokines.

La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes engendre plusieurs changements phénotypiques, débutant durant la deuxième semaine de guérison en parallèle avec la fibroplasie. Parmi les caractéristiques observées on retrouve: 1) un système de microfilaments d'alpha-smooth muscle actin (α -SMA, ou ACTA1) bien développé (Gabbiani et coll., 1981); 2) la présence de fibres de stress et les fibronexies servant à l'adhésion entre les cellules et les divers substrats de la MEC; et 3) la présence de jonctions gaps qui relient les myofibroblastes entre eux (Singer, 1979; Singer et coll., 1984).

Les facteurs qui influencent la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes ne sont pas tous bien caractérisés. En outre, il a été démontré que TGF- β induit l'expression d'ARNm et de la protéine α -SMA dans les fibroblastes (Moulin et coll., 1999, Desmoulière et coll., 1993, Zhang et coll., 1999). Le granulocyte-macrophage growth stimulating factor (GM-CSF) favorise également la formation d'un tissu de granulation riche en myofibroblastes contenant l' α -SMA (Rubbia-Brandt et coll., 1991) alors que les cytokines PDGF et TNF- α n'ont pas d'influence sur la différenciation (Moulin et coll., 1999). L'IFN- γ agit à l'inverse du TGF- β 1; il diminue la quantité d' α -SMA dans le cytoplasme (ARNm et protéine) tout en atténuant la prolifération des fibroblastes (Desmoulière et coll., 1992a, Moulin et coll., 1999, Zhang et coll., 1999). Les cytokines ne sont pas les seules à influencer la différenciation phénotypique du fibroblaste en cellule contractile; les composants de la MEC sont aussi impliqués. Plus particulièrement, l'héparine augmente l'expression protéique et génétique (ARNm) d' α -SMA dans les fibroblastes (Desmoulière et coll., 1992b). La membrane basale de l'épiderme est,

quant à elle, impliquée dans le maintien des myofibroblastes différenciés (Streuli et coll 1993).

La contraction de la plaie implique un remodelage des fibres de collagène de la MEC avec lesquelles les myofibroblastes interagissent afin d'effectuer une contraction efficace. La transmission de la force contractile aux fibres de collagène se fait, *in vitro*, via l'attachement des myofibroblastes au collagène par les récepteurs intégrines $\alpha 2\beta 1$ (Klein et coll., 1991; Schiro et coll., 1991). De plus, les adhésions intercellulaires et entre les cellules et la fibronectine par l'entremise de fibronexies, seraient un moyen de renforcer la transmission de la force de traction du myofibroblaste à la matrice de la blessure (Singer et coll., 1984).

Une fois la contraction terminée, les myofibroblastes seront éliminés par mort cellulaire programmée, c'est-à-dire l'apoptose. L'IL- $\beta 1$ induit l'apoptose des myofibroblastes (Zhang et coll., 1999), alors que TGF- $\beta 1$ l'inhibe, permettant ainsi une accumulation cellulaire accrue suite à la phase proliférative de la guérison (Zhang et coll., 1999).

Une étude *in vitro* a récemment décrit le changement dans l'expression génique du fibroblaste (myofibroblaste) suite à la contraction, à l'aide d'analyses Northern et de la transcription inversée suivit de réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) (Rosenfeld et coll., 1998). Parmi les gènes investigués, c-fos a démontré une augmentation d'expression 30 min suite à l'initiation de la contraction, pour atteindre un maximum entre 50 et 60 min, après quoi son expression a diminué. La cinétique d'expression de fosb dans les mêmes circonstances était semblable à celle de c-fos. Les gènes c-myc, fra-1 et fra-2, ainsi que le facteur de transcription NF- κB , n'ont pas démontré de différence dans leur expression suite à l'initiation de la contraction. C-jun, quant à lui, a subi une légère augmentation. Il est proposé que ces gènes aient un rôle dans l'initiation de la prolifération et de la migration cellulaires induite lors de blessure. De plus, le gène c-fos pourrait être important pour la survie cellulaire (Schreiber et coll., 1995) ainsi que pour la différenciation des fonctions régulées par les forces mécaniques, comme celles qui rapprochent les bords de plaie.

1.3. Phase de synthèse et remodelage

La phase de synthèse et remodelage consiste en la modification de la matrice immature pour obtenir une cicatrice collagénique, relativement acellulaire. Comme son nom l'indique, cette phase comprend le remodelage de la matrice déjà existante (remplacement par des composants matures) ainsi que l'apoptose de divers types cellulaires. Cette dernière phase ne se produit pas en même temps partout dans la plaie; en effet, la phase de synthèse et remodelage débute aux marges de la plaie alors que le tissu de granulation se forme au centre de cette dernière. La composition de la MEC varie donc à tout moment dans les diverses régions de la plaie.

La première matrice provisoire, le caillot, est remplacée au cours de la fibroplasie par une matrice semi-permanente qui sera éventuellement remodelée. Le caillot de fibrine est en effet éliminé par protéolyse et une seconde matrice provisoire est déposée, celle-là riche en fibronectine et en hyaluronane, et qui favorise la migration et la prolifération cellulaires. Les fibroblastes synthétiques sont les principales cellules responsables de ces deux étapes. Cette matrice semi-permanente est graduellement éliminée puis remplacée par une matrice riche en protéoglycans et en collagène, qui conféreront force et résistance à la cicatrice finale.

Les protéoglycans répondent à plusieurs besoins lors de la guérison cutanée, tels 1) une meilleure organisation de la MEC, 2) l'entreposage de facteurs de croissance dans la MEC, 3) la liaison des récepteurs aux facteurs de croissance, 4) l'entreposage d'enzymes dans les granules cellulaires, et 5) la coagulation sanguine. En plus de ces fonctions, les protéoglycans contrôlent l'adhésion, la migration ainsi que la prolifération cellulaires, selon le type et la quantité présents. Parmi les protéoglycans déposés on retrouve ceux contenant la chondroïtin-4-sulfate et le dermatan sulfate. Ces derniers semblent accélérer la polymérisation du collagène et ainsi influencer la force tensile de la peau (Reed et coll., 2003). Il a récemment été démontré que le dermatan sulfate proteoglycan (DSPG) stimule aussi la migration

et la prolifération des fibroblastes, par l'entremise de facteurs de croissance (Denholm et coll., 2000; Clark et coll., 2004).

Le collagène, dont il existe plusieurs types, est également synthétisé durant cette phase. Les plus importants lors de la guérison cutanée sont ceux de type III (immature), et de type I (mature), mais on y retrouve également d'autres types comme le V (Betz et coll., 1993) et VI (Oono et coll., 1993). La propriété qui fait du collagène une molécule indispensable lors de la guérison cutanée est la capacité de ses fibrilles à se polymériser, soit côte à côte ou encore bout à bout, pour former de longues fibres. Cette caractéristique permet au collagène, tout au long de la phase de remodelage, de devenir très résistant et, par le fait même, d'augmenter la force tensile de la cicatrice en formation. Le collagène de type III apparaît avant celui de type I. Ces deux types atteignent un maximum de déposition entre les jours sept et 14 suivant une blessure cutanée (Clare et coll., 1979); en effet, l'ARNm du collagène de type I est exprimé à sept jours suivant un trauma cutané chez le cheval (Schwartz et coll., 2002). Chez cette espèce, la protéine s'accumule plus fortement et de façon chaotique dans les plaies prédisposées à la cicatrisation excessive (Wilmink et coll., 1999b; Schwartz et coll., 2002). L'accumulation de collagène dans la blessure entraîne une autorégulation négative au niveau des fibroblastes et encourage le remodelage de la matrice par ces mêmes cellules.

Suivant la synthèse de nouvelles molécules, la matrice est réorganisée, permettant à la cicatrice en formation de devenir à la fois plus solide et moins cellulaire. Le remodelage est effectué par de nombreuses protéinases qui dégradent la MEC et qui sont assignées à trois grandes classes dont: les sérines protéinases, les cystéines protéinases (cathepsine), et les MMPs (Mignatti et coll., 1993). Toutes ces enzymes sont synthétisées par différents types cellulaires, notamment les macrophages, les fibroblastes et les kératinocytes.

La classe des sérines protéinases comprend PA, la cathepsine G et l'élastase des leucocytes. Le tPA est plutôt impliqué dans la lyse du caillot, tandis que l'uPA joue un rôle dans le processus de remodelage. En effet, la plasmine produite par uPA dégrade plusieurs molécules de la MEC (Mignatti et coll., 1996) et active

également les pro-MMPs (He et coll., 1989), les progélatinases A (Sato et coll., 1994) et les élastases latentes (Mignatti et coll., 1996).

Les cystéines protéinases sont impliquées dans plusieurs processus tel que l'activation de proenzyme, l'inactivation d'enzyme, la présentation des antigènes et le remodelage tissulaire (Shi et coll., 1995). De plus, les cystéines protéinases semblent jouer un rôle dans différentes pathologies comme les glomérulonéphrites et le cancer.

Les MMPs sont subdivisées en fonction de leur substrat, malgré que toutes aient un site de liaison catalytique pour le Zn^{2+} et soient produites sous une forme inactive. Le premier sous-groupe, les collagénases interstitielles, comporte trois membres qui possèdent comme substrat le collagène natif de types I, II et III (Mignatti et coll., 1996). MMP1 est nécessaire à la migration cellulaire et à l'angiogénèse, en plus du remodelage tissulaire. Chez le porc, il n'y a aucune expression d'ARNm pour MMP1 dans la peau intacte, alors que suite à une blessure, les niveaux sont maximaux dès 24 h pour ensuite graduellement s'estomper sur une période de 35 jours (Wang et coll., 2000). Chez le cheval, il n'existe que des données préliminaires concernant l'expression génique de MMP1 lors de guérison cutanée; des taux plus élevés d'ARNm ont été observés dans la peau intacte du thorax que dans celle située sur l'extrémité distale du membre, alors que ces différences ont disparues à sept jours suivant un trauma (Schwartz et coll., 2002).

Le deuxième sous-groupe est composé aussi de trois enzymes, nommées stromelysines, qui dégradent plusieurs types de molécules. La stromelysine-1, aussi appelé MMP3, a la capacité de dégrader le collagène de types III, IV, V et IX, la fibronectine, la laminine, les protéoglycans et la gélatine, ainsi que d'activer MMP1 (Mauviel, 1993). Elle serait exprimée par les kératinocytes en contact avec la membrane basale, ce qui pourrait faciliter leur détachement et initier leur migration, et par les fibroblastes du tissu de granulation (Saarialho-Kere et coll., 1994).

Les métallo-gélatinases, formant le troisième sous-groupe, dégradent le collagène dénaturé, la membrane basale, la fibronectine et l'élastine insoluble (Murphy et coll., 1991). Il en existe deux: la gélatinase A (72-kDa) et la gélatinase B (92-kDa). La gélatinase A est produite constitutivement par la plupart des cellules (Overall et coll., 1991), alors que la gélatinase B est exprimée activement par les éosinophiles et les macrophages (Stahle-Bäckdahl et coll., 1994; Stahle-Bäckdahl et coll., 1993; Hasty et coll., 1990). Une étude investiguant la cinétique d'expression des ARNm de différentes MMPs et TIMPs lors de la guérison chez le rat a permis de déterminer à quel moment elles sont le plus fortement exprimées (Soo et coll., 2000). La gélatinase B atteint un maximum entre 24 h et 3 jours suivant la création d'une plaie cutanée, alors que l'expression de la gélatinase A est plus tardive et atteint son maximum à cinq jours (Soo et coll., 2000).

Le quatrième sous-groupe comprend de plus petites MMPs, les matrilysines. Elles ont une activité de protéoglycanase mais peuvent également dégrader la membrane basale, la laminine, la fibronectine, la gélatine et l'élastine insoluble (Murphy et coll., 1991; Sires et coll., 1993), à la manière des gélatinases A et B. Selon l'étude de Soo, l'ARNm de la matrilysine est exprimé fortement de 3 à 14 jours suivant un trauma cutané (Soo et coll., 2000).

Finalement, deux autres MMPs ont été identifiées, mais n'appartiennent à aucun sous-groupe décrit précédemment. Elles sont connues sous les noms de métalloélastase de macrophage et métalloprotéinase transmembranaire. Leur interaction avec la MEC n'est pas complètement décrite mais il leur est assigné quelques rôles soit: une dégradation de l'élastine insoluble et du collagène de type IV (Shapiro et coll., 1993), et une activation de la pro-gélatinase A (Sato et coll., 1994), respectivement.

L'activité enzymatique des MMPs est contrôlée par l'action de diverses TIMPs, qui agissent en bloquant le site catalytique des MMPs. Jusqu'à présent trois TIMPs sont connues: TIMP1, TIMP2 et TIMP3. L'expression d'ARNm de TIMP1 chez le rat atteint son maximum entre deux et trois jours suivant la création d'une plaie cutanée; TIMP2, qui est exprimée de façon constitutive par la peau normale non-lésée, augmente un peu au cours de la guérison dès 24 h suivant le trauma et

persiste jusqu'à 14 jours, alors que l'expression de TIMP3 diminue suite au trauma (Soo et coll., 2000).

Plusieurs cytokines ainsi que la MEC semblent moduler les collagénases et leurs inhibiteurs afin de maintenir un équilibre étroit entre la synthèse et la dégradation des composants de la MEC, sans quoi une plaie peut devenir chronique ou, à l'inverse, une fibrose excessive peut s'y développer. Il est donc crucial que la synthèse des protéines peuplant la matrice, ainsi que des protéinases et de leurs inhibiteurs, soit étroitement régulée et ce tant au niveau génique que protéique.

Lorsque le processus de guérison survient normalement, la plaie gagnera seulement 20% de sa force finale après trois semaines de guérison. Le remodelage doit donc se poursuivre sur de très longues périodes afin que la cicatrice obtienne une force tensile acceptable. Malgré tous les efforts de synthèse et de remodelage, la cicatrice ne retrouvera jamais la force initiale de la peau non-lésée; au plus, elle atteindra 70% de cette valeur.

2. Contrôle génique de la guérison cutanée normale

Une récente étude a déterminé le profil d'expression génique chez l'homme suite à une blessure cutanée, à l'aide de la technique de micro-réseaux d'ADNc (Cole et coll., 2001a). Trente minutes suite au trauma 124 gènes, principalement impliqués dans la transcription et les cascades de signalisation, ont doublé leur expression alors qu'aucun investigué n'était sous-exprimé. Une heure suite au trauma, 46 gènes ont doublé leur expression et 264 gènes l'ont diminué de moitié. Les mêmes chercheurs ont aussi déterminé le degré de variabilité d'expression génique dans la peau normale entre différents individus sains (Cole et coll., 2001b). Ils ont trouvé une variabilité chez 71 gènes, principalement ceux impliqués dans les cascades de signalisation et les protéines de surface cellulaire, soit, des gènes rarement étudiés lors de la guérison cutanée et sur lesquels on devrait se pencher davantage. Par ailleurs, une technique modifiée de differential display-polymerase chain reaction (DD-PCR) a aussi été utilisée pour identifier les gènes exprimés différemment lors de la guérison normale par rapport à la peau non-lésée, dans un modèle de guérison *in vivo* chez le rat (Soo et coll., 2002). Trente-cinq gènes ont

démontré une expression différentielle lors de la guérison et treize d'entre eux ont été séquencés. Parmi ces treize gènes, dix avaient une homologie importante à des gènes déjà connus. L'expression de gènes homologues à ceux de la lipoprotéine lipase du rat, de la molécule titine humaine, du calcium dependent activator protein (CAPS) du rat, et du signal recognition particle (SRP)9 de la souris diminuait suite au trauma. Au contraire, une augmentation de l'expression a été observée pour les gènes homologues à ceux de l'IL-1 β du rat, du macrophage-specific gene (MPS)1 de la souris, du migration inhibitory factor-related protein (MRP)14, du human melanoma differentiation associated gene (mda)-7, de la protéine ribosomale S24 du rat, et du versican du rat. Certains de ces gènes n'ont pas encore de rôle connu dans la guérison cutanée; c'est le cas pour SRP9, la molécule titine, CAPS, MSP1 et la protéine ribosomale S24. Le gène MRP14 n'a pas de rôle connu lors de la guérison cutanée, cependant sa concentration sérique est augmentée chez des individus atteints de maladies inflammatoires telles l'arthrite rhumatoïde et la bronchite chronique (Kerkhoff et coll., 1998). Les autres sont des gènes dont la présence lors de la guérison cutanée était déjà connue. Le gène mda-7, par exemple, joue potentiellement un rôle lors de la prolifération de fibroblastes durant la guérison cutanée (Soo et coll., 1999). L'IL-1 β pourrait induire la production du FGF-7, aussi nommé KGF, par les fibroblastes lors de la guérison cutanée (Chedid et coll., 1994). L'implication de FGF-7 est essentielle à la réépithélialisation (Werner et coll., 1994) et il est exprimé sept jours suivant un trauma cutané chez la souris (Werner et coll., 1992). Enfin, le versican est une protéine de la MEC ayant la capacité de promouvoir la migration cellulaire en diminuant l'adhésion des cellules (Yamagata et coll., 1993).

Les gènes impliqués lors de la guérison fœtale ont aussi été investigués afin de mieux comprendre le phénomène de régénération et de pouvoir ensuite le comparer à la cicatrisation. En effet, contrairement à la guérison chez l'adulte, celle du fœtus ne mène pas à la formation de cicatrice, et en soit, ressemble plutôt à la régénération qu'à la réparation tissulaire. Une compréhension des différents phénomènes particuliers à la guérison fœtale est préalable à la reproduction de ce modèle chez l'adulte. Une étude de RT-PCR sur les 38 gènes Homeobox a permis

de déterminer que deux d'entre eux, soit paired-related homeobox gene (PRX)-2 et homeobox (Hox)B13, étaient exprimés différemment lors de la guérison fœtale par rapport à la guérison chez l'adulte (Stelnicki et coll., 1998). En effet, l'expression de PRX-2 est fortement augmentée lors de la guérison fœtale mais pas lors de la cicatrisation chez l'adulte, alors que le gène HoxB13 démontre une cinétique d'expression inverse (Stelnicki et coll., 1998). La construction d'une librairie soustraite d'ADNc a aussi été complétée à l'aide d'une modification de la technique d'hybridation soustractive suppressive (HSS); en effet les chercheurs ont utilisé 3 populations d'ADNc au lieu de 2 soit: des ADNc de plaies cutanées chez l'adulte, des ADNc de plaies cutanées chez le fœtus, ainsi que des ADNc de peau fœtale non-lésée (Zhang et coll., 2004). Les résultats de cette étude ne sont pas encore publiés.

3. Guérison cutanée problématique

La guérison est un processus complexe qui implique le chevauchement de différentes phases et dont l'évolution normale dépend d'un contrôle génique rigoureux. Une perturbation de l'expression génique, incitant une mauvaise transition entre les phases, pourrait provoquer des problèmes de cicatrisation tel les plaies chroniques qui affichent un retard de guérison, ainsi que les cicatrices hypertrophiques et les chéloïdes qui, en contraste, guérissent de manière excessive.

3.1. Les plaies chroniques

Les plaies chroniques sont affligées d'une phase inflammatoire prolongée et inefficace et affichent un retard de cicatrisation caractérisé par une piètre production de tissu de granulation (Cochrane, 1997), une contraction inadéquate ainsi qu'une réépithélialisation déficiente. Finalement, le processus d'apoptose par lequel le tissu de granulation progresse normalement vers une cicatrice mature et acellulaire est retardé (Danby et coll., 1997). La cause du délai de cicatrisation est variable et peut être d'origine endocrinienne, nutritionnelle, vasculaire, hématologique, iatrogénique, ou encore peut résulter de maladies du tissu conjonctif ou autres (Senet et coll., 1997).

Les implications géniques lors de la guérison chronique demeurent nébuleuses. Une étude récente a comparé la guérison rapide, se rapprochant de la régénération, à la guérison lente chez la souris, par la technique de micro-réseaux d'ADNc (Li et coll., 2001). Il a été démontré que l'expression de 50 gènes est augmentée chez la souris guérissant lentement mais pas chez celle à guérison rapide. Parmi ces 50 gènes on en retrouve qui régulent la phase inflammatoire: stomatin-like protein (SLP)1, CD14 et mixed-lineage leukemia; puis, certains se rapportant à la MEC: a disintegrin and metalloproteinase domain (ADAM)8 et heparine cofactor II. Une autre étude *in vitro* a permis de mieux caractériser le remodelage défectueux de la matrice des plaies chroniques (Cook et coll., 2000). Cette dernière démontre un niveau semblable de pro-MMP2 entre les fibroblastes de peau normale et ceux de plaie chronique, mais un niveau moindre de MMP2 actif. De plus, une production accrue de TIMP1 et 2 dans les fibroblastes de plaies chroniques a été mise à l'évidence. Cette étude suggère donc que les plaies chroniques ont une mauvaise réorganisation de la matrice *in vitro* résultant d'une trop forte production de TIMP1 et 2 par les fibroblastes.

3.2. Les cicatrices hypertrophiques et les chéloïdes

Malgré des différences macroscopiques et microscopiques, les chéloïdes et les cicatrices hypertrophiques partagent une physiopathologie similaire. En effet, ils semblent tous deux résulter d'une phase proliférative exagérée, où la synthèse de composants de la MEC excède leur dégradation et leur remodelage, favorisant la fibrose excessive du derme (Tredget et coll., 1997; Tuan et coll., 1998).

Les chéloïdes et cicatrices hypertrophiques démontrent des différences majeures avec les cicatrices normales et la peau non lésée. Les fibroblastes provenant d'un chéloïde se divisent plus rapidement que les fibroblastes dermiques normaux (Luo et coll., 2001) et répondent plus intensément aux facteurs de croissance tel PDGF (Haisa et coll., 1994) et TGF- β (Bettinger et coll., 1996). Les fibroblastes de cicatrice hypertrophique démontrent également une expression soutenue de récepteurs au TGF- β de types I et II, ce qui augmente leur réponse à ce facteur de croissance pro-fibrotique (Schmid et coll., 1998). D'autre part, il est

apparent que les microvaisseaux présents dans les cicatrices pathologiques sont occlus (Kischer et coll., 1982). Cette occlusion pourrait causer une hypoxie locale qui favoriserait à la fois la synthèse de TGF- β_1 (Hakinnen et coll., 1996) et la production de récepteurs à ce facteur de croissance parmi une sous-population de fibroblastes synthétiques peuplant la cicatrice, résultant en une production accrue de collagène par ces derniers (Falanga et coll., 1990).

La pathogenèse des chéloïdes et des cicatrices hypertrophiques est seulement partiellement élucidée, mais semble sous contrôle génétique. En effet, une prédisposition familiale a été notée parmi les hommes de race noire (Thomas et coll., 1994). McCauley (1992) a démontré que les concentrations de TNF- α et d'IFN- α et $-\gamma$ étaient diminuées dans les cellules mononucléaires du sang périphérique de patients de race noire souffrant de chéloïdes. Polo (1997), pour sa part, rapporte des concentrations élevées de TGF- β_2 dans des échantillons sanguins provenant de patients atteints de cicatrices hypertrophiques.

Des études récentes démontrent que le mécanisme apoptotique est déficient dans les fibroblastes provenant de chéloïdes (Ladin et coll., 1998, Luo et coll., 2001). En effet, il survient 22% de moins d'apoptose en culture cellulaire de fibroblastes issus de chéloïdes comparativement à ceux provenant de peau normale non lésée (Ladin et coll., 1998). La technique de micro-réseaux d'ADNc a permis d'investiguer 64 gènes liés à l'apoptose, dans des tissus de chéloïdes et de cicatrices normales afin d'élucider le rôle de la mort cellulaire programmée dans la cicatrisation excessive (Sayah et coll., 1999). Des 64 gènes examinés, huit étaient significativement sous-exprimés dans les tissus chéloïdes comparativement aux cicatrices normales. Ces gènes auraient possiblement un rôle dans le contrôle de l'apoptose. Parmi ceux-ci, quatre sont des promoteurs de l'apoptose: c-myc, TNF receptor 1-associated protein (TRADD), interacting protein (NIP)-3, et cytoplasmic dynein light chain (HDLC)1. Les quatre autres seraient des inhibiteurs possibles de l'apoptose: defender against cell death (DAD)-1, glutathione S-transferase (GST), glutathione S-transferase microsomal (GSTM), et glutathione peroxidase (GP). De plus, cette dernière étude a confirmé par la méthode de terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL) que les chéloïdes,

particulièrement dans leur région centrale, contiennent moins de cellules apoptotiques que les cicatrices normales. À la lumière de ces résultats connexes, il pourrait donc être spéculé que si la régulation génique de l'apoptose fait défaut lors de la cicatrisation, une prolifération cellulaire exagérée, accompagnée d'une surproduction de composants de la MEC, pourrait mener à la formation de chéloïdes.

La technique de micro-réseaux d'ADNc fut employée de nouveau pour comparer l'expression génique dans les cicatrices hypertrophiques, les cicatrices normales et la peau normale (Tsou et coll., 2000). Les résultats de cette étude indiquent que: 1) 142 gènes sont sur-exprimés et 50 sont sous-exprimés dans les cicatrices normales comparativement à la peau normale; 2) 107 gènes sont sur-exprimés et 71 gènes sont sous-exprimés dans les cicatrices hypertrophiques comparativement à la peau normale; et 3) 44 gènes sont sur-exprimés et 124 gènes sont sous-exprimés dans les cicatrices hypertrophiques comparativement aux cicatrices normales. Une augmentation significative de l'expression de collagen type III alpha1 (COL3A)1, collagen type I alpha (COL1A)2 et collagen type VI alpha (COL6A)1 fût démontré à la fois dans les cicatrices normales et les cicatrices hypertrophiques comparativement à la peau non-lésée. Les gènes démontrant une sur-expression significative dans les cicatrices hypertrophiques par rapport aux cicatrices normales incluent; COL3A1, COL1A2, COL14, COL6A3, COL6A et IGF-2.

4. Guérison cutanée chez le cheval

Chez le cheval, il arrive que la guérison par seconde intention ne se produise pas selon le modèle décrit chez d'autres espèces. En effet, il peut se manifester un dérèglement des phases de la guérison, particulièrement lorsque la plaie survient à l'aspect distal du membre. Plus précisément, la formation excessive de tissu conjonctif lors de la phase proliférative inhibe les étapes subséquentes telles la contraction et la formation d'un nouvel épithélium (Chvapil et coll., 1979). Ce tissu de granulation exubérant est connu sous le nom de « bouton de chair » chez le cheval. Le bouton de chair se rapproche du chéloïde et de la cicatrice

hypertrophique en ce qui a trait au tissu de granulation excessif; il résulte d'un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation du collagène, et a tendance à récidiver suite à la résection chirurgicale. La majeure différence se situe au niveau de la réépithélialisation, qui est incomplète lors de la formation d'un bouton de chair (Theoret, 2001b).

Des différences entre la guérison du poney et du cheval sont aussi observées. En effet, il a été démontré que les plaies du poney guérissent plus rapidement que le cheval, généralement sans formation excessive de tissu de granulation. Même si les plaies du membre de poney guérissent plus lentement que les plaies du corps, cette différence est significativement plus importante chez le cheval (Wilmink et coll., 1999 a). Notamment, l'inflammation des plaies du membre chez les poneys est plus efficace, de grande intensité mais brève, comparativement à celle du cheval chez qui la réponse inflammatoire persiste jusqu'au moins 12 semaines. Cette prolongation de la phase inflammatoire pourrait provoquer la formation de bouton de chair. À l'inverse, l'inflammation chronique pourrait aussi mener à la formation d'un tissu de granulation immature tel que remarqué dans les plaies chroniques chez l'homme. Dans les deux cas, la réépithélialisation sera affectée (Knottenbelt, 2003). Les plaies chroniques observées chez les chevaux résultent de différents facteurs incluant l'infection, le mouvement, la présence de corps étrangers et de tissu nécrotique (Knottenbelt, 2003). Ces derniers sont tous des facteurs impliqués lors de la guérison des plaies de membres, en effet, elles sont difficiles à immobiliser, facilement infectées et compromises par la présence de corps étrangers étant donné leur proximité au sol et aux excréments.

La cause spécifique de la fibroplasie excessive chez le cheval demeure inconnue. Les facteurs proposés comme étant associés à ce phénomène incluent la mobilité, la prédisposition à l'inflammation et à l'infection, le faible apport sanguin, la tension excessive de la peau adjacente, ainsi que l'absence relative de tissus mous sous-jacents à la plaie (Booth et coll., 1992, Wilson et coll., 1996). De plus, l'approche thérapeutique peut modifier les phases de guérison et entraîner des problèmes spécifiques d'espèce. Par exemple, les plaies mises sous bandage maintiennent un environnement hypoxique et retiennent les cellules inflammatoires

à leur surface, ce qui stimule l'angiogénèse et la fibroplasie. Or, chez le cheval, il a été observé que l'application d'un bandage à une plaie appendiculaire favorise la production excessive de tissu de granulation (Barber, 1990; Theoret et coll., 2002a; Berry, 2003). Puisque l'hypoxie peut stimuler la synthèse de TGF- β_1 (Hakkinen et coll., 1996) ainsi qu'augmenter le nombre de récepteurs à ce facteur de croissance (Falanga et coll., 1990), l'occlusion d'une plaie par l'entremise d'un bandage pourrait expliquer la production exagérée de composants de la MEC par les fibroblastes.

Une différence de croissance fibroblastique entre les plaies du membre et du corps pourrait également être un facteur contribuant au développement du bouton de chair. Parce que les plaies appendiculaires sont plus sujettes à la production d'un tissu de granulation exubérant, il a été suggéré que les fibroblastes du membre auraient une croissance plus rapide que ceux provenant du tronc (Bacon-Miller et coll., 2000). Cependant, cette étude sur la croissance des fibroblastes *in vitro* a démontré que les fibroblastes du membre du cheval avaient une activité mitotique moindre que ceux provenant des autres sites soit, du corps des chevaux, du corps des poneys, et des membres des poneys. Ces résultats sont contraires à ceux anticipés et peuvent être reliés à la variabilité de croissance des fibroblastes *in vivo* et *in vitro*. Malgré qu'*in vitro* le contraire fût déterminé, il a été observé *in vivo* 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 (Wilmink et coll., 1999b).

La guérison de plaie au niveau du membre équin est donc souvent un processus lent et compliqué. En outre, le tissu de granulation exubérant entrave les processus subséquents de la phase proliférative, incluant la réépithélialisation et la contraction (Jacobs et coll., 1984). En effet, il apparaît que l'activité mitotique des cellules épithéliales est remarquablement réduite en l'occurrence d'un bouton de chair (Wilmink et coll., 1999b), ce dernier agissant de plus comme obstacle physique à la migration des kératinocytes sur le lit de la plaie. Par ailleurs, le mécanisme de contraction est supérieur au niveau des plaies thoraciques (Jacobs et coll., 1984; Theoret et coll., 2001b) et de la croupe (Wilmink et coll., 1999b).

comparativement aux plaies situées à l'aspect distal du membre. En plus d'accélérer la guérison, la contraction améliore l'apparence cosmétique et la force de la cicatrice, puisqu'elle diminue la surface de la plaie devant être recouverte d'un nouvel épithélium fragile et dénué d'annexes cutanées (Jacobs et coll., 1984). Donc, chez le cheval, un degré de contraction élevé est désirable lors de la guérison, contrairement à l'homme, où elle peut entraîner la formation de contractures et de cicatrices inesthétiques. Il est proposé que le degré de contraction soit déterminé par les capacités contractiles innées des cellules ainsi que par les conditions tissulaires locales. Chez le cheval, il fut établi que la force contractile innée des myofibroblastes peuplant les plaies appendiculaires est similaire à celle des myofibroblastes du tronc (Wilmink et coll., 2001). Toutefois, le tissu de granulation des plaies situées sur l'extrémité du membre démontre une organisation chaotique des cellules contractiles alors que les myofibroblastes garnissant les plaies du tronc sont bien ordonnés (Wilmink et coll., 1999b ; Schwartz et coll., 2002). Puisque c'est le degré d'organisation plutôt que le nombre de myofibroblastes qui détermine la vitesse et l'ampleur de la contraction, ce phénomène pourrait contribuer au déficit de contraction. Ceci n'exclut pas que des facteurs environnementaux, tel le profil de cytokines libérées lors de la réponse inflammatoire au trauma, puissent aussi influencer l'étendue de la contraction lors de la guérison.

À cet effet, certains chercheurs ont voulu comparer la cinétique d'expression de facteurs de croissance lors de la guérison de plaies appendiculaires et corporelles chez le cheval. Il a ainsi été établi que l'expression de la protéine pro-fibrotique TGF- β_1 est maintenue à travers la phase proliférative de guérison dans les plaies localisées sur les membres, alors que dans les plaies corporelles, l'expression retourne à un niveau de base dès la fin de la phase inflammatoire (Theoret et coll., 2001c ; Van Den Boom et coll., 2002). Également, une production plus accrue d'ARNm pour le TGF- β_1 , associé à une hausse parallèle d'ARNm pour le collagène de type I, a été démontrée pendant quatre semaines dans des plaies appendiculaires par rapport à celles situées sur le poitrail (Schwartz et coll., 2002). Ces constatations supportent l'hypothèse qu'une surproduction de TGF- β_1 serait liée à la fibrose chez le cheval, puisque ce sont les plaies du membre qui sont prédisposées

au développement de bouton de chair alors que les plaies corporelles guérissent normalement. Il a été révélé par immunohistochimie que ce sont les macrophages et les fibroblastes dermiques qui expriment le plus fortement le TGF- β_1 dans les plaies appendiculaires (Theoret et coll., 2002a), cependant, il a été impossible d'établir de façon significative que l'expression du TGF- β_1 dans les plaies développant un bouton de chair cliniquement apparent soit plus élevée que dans les plaies guérissant normalement (Theoret et coll., 2002b). Comme il a été proposé chez l'homme qu'une sous-population de fibroblastes dermiques possédant des capacités accrues de répondre au TGF- β s'accumule temporairement (Hakkinen et coll., 1996), même si les concentrations de TGF- β_1 dans les plaies cicatrisant normalement et dans celles développant un bouton de chair soient semblables, les fibroblastes du bouton de chair pourraient être plus réceptifs à ce facteur de croissance pro-fibrotique. Ceci fut récemment confirmé par De Martin et Theoret (2004), qui ont illustré par immunohistochimie qu'en vertu de la cellularité accrue du bouton de chair, la présence de récepteurs au TGF- β de types I et II dans les plaies appendiculaires développant un tissu de granulation excessif surpasse grandement celle des plaies appendiculaires guérissant normalement et celle des plaies thoraciques, durant la phase proliférative de réparation.

Aucun traitement connu actuellement ne conduit de façon systématique à la prévention du bouton de chair chez le cheval. En effet, plusieurs études rapportent des résultats décourageants lors de différents traitements visant à améliorer la rapidité et la qualité de la guérison des plaies appendiculaires chez le cheval, par exemple: l'application d'une membrane de collagène bovin (Yvorchuk-St Jean et coll., 1995); l'application de surnageant de macrophage activé (Wilson et coll., 1996); l'application de rh-TGF- β_1 (Steel et coll., 1999); l'utilisation de la thérapie par laser (Petersen et coll., 1999); l'utilisation de Solugel (25% propylène glycol hydrogel) (Dart et coll., 2002a); l'injection intramusculaire d'hormone de croissance (Dart et coll., 2002b); l'application topique d'onguent iodé ou de sulfadiazine d'argent (Berry et coll., 2003); et l'application de greffes auto ou allogènes et de divers biomatériaux (Gomez et coll., 2004). Ces échecs ne

surprennent pas, puisque la pathogénèse de la fibrose excessive survenant lors de la guérison chez le cheval n'est pas encore élucidée.

5. Hybridation soustractive suppressive

Certaines techniques de biologie moléculaire promettent de solutionner les problèmes de guérison pathologique. Notamment, la détermination de l'expression génique lors de différentes situations procure beaucoup d'information sur une pathologie donnée, en relativement peu de temps. Des études de ce genre sont critiques à la compréhension de la pathogénèse fondamentale de la cicatrisation pathologique qui survient communément chez le cheval. Le contrôle génique de la guérison commence à être connu chez l'homme, néanmoins, il reste beaucoup à clarifier. Parmi les techniques fréquemment utilisées à cette fin on retrouve le HSS, le differential display reverse transcription polymerase chain reaction (DDRT-PCR) et les réseaux et micro-réseaux d'ADNc.

Le DDRT-PCR permet la découverte de nouveaux gènes (Liang, 2002), mais est long et parfois complexe. De plus, il fournit peu de matériel pour des expériences ultérieures. Les réseaux ou micro-réseaux d'ADNc sont actuellement très prisés en recherche biomédicale, surtout pour leur simplicité d'utilisation. Malheureusement, ces derniers ne permettent pas la découverte de nouveaux gènes en soit. Le développement d'un gene chip équin est tout récent (Gu et Bertone, 2004). Ce dernier possède plus de 3200 gènes se rapportant à la régulation de la mort cellulaire, au cycle cellulaire, ou à la signalisation et au développement cellulaires, mais pas distincts au processus de guérison cutanée. De plus, il n'est pas disponible commercialement. La méthode que nous préconisons est celle du HSS puisqu'elle permet la découverte de nouveaux gènes, est spécifique d'espèce et au processus biologique étudié, assure la production de matériel diagnostique, comme des sondes, pour des expériences ultérieures et ne nécessite qu'une faible quantité d'ARN de départ. Cette méthode permet d'amplifier et d'analyser seuls les gènes qui sont exprimés différenciellement entre le processus d'intérêt et son contrôle. Le HSS possède une étape de normalisation et d'enrichissement des ADNc peu abondants, facilitant ainsi leur identification. Cette étape fait du HSS une technique unique qui

peut compléter ou remplacer l'utilisation des micro-réseaux d'ADNc (Cao et coll., 2004). Initialement cette technique était utilisée pour comparer seulement deux populations, ce qui, pour certaines études, était insuffisant. Dernièrement un groupe de chercheur a mis au point une variante de cette technique qui permet de comparer trois populations d'ADNc donnant beaucoup plus de flexibilité à la méthode (Zhang et coll., 2004). Il demeure cependant que lors d'études comparant un nombre supérieur de populations, la technique des micro-réseaux d'ADNc est mieux adapté. De plus, le HSS requiert passablement de temps et d'énergie; en effet, pour obtenir des résultats représentatifs il faut sélectionner un nombre important de clones. Malgré ces limites, le HSS demeure une technique sensible qui permet une première caractérisation d'un processus biologique.

6. Hypothèse et objectif

L'hypothèse générale de notre étude sous-entend que l'activité transcriptionnelle de certains gènes est modifiée lors du processus de guérison cutanée chez le cheval. L'objectif spécifique de cette étude est d'identifier les gènes impliqués lors de la phase proliférative en comparant l'expression de gènes dans la peau normale, non-lésée, à ceux présents dans le bord de plaie sept jours après sa création sur le thorax. La caractérisation génique de la guérison cutanée normale chez le cheval est préalable à la compréhension de la guérison problématique.

Méthodologie

1. Modèle de guérison

Les quatre juments utilisées pour l'étude étaient âgées de 2 à 3 ans, de race Standardbred. Un examen général a été effectué pour s'assurer de leur bonne santé. Elles ont été maintenues à la ferme du Centre de Recherche en Reproduction Animale (CRRRA), où elles ont reçu une alimentation en foin ainsi qu'un accès illimité à l'eau, tout au long du projet. Les plaies ont été créées sous sédation suite à l'injection IV du mélange suivant : 4 mg de chlorhydrate de détomidine (10 mg/ml, Dormosedan[®]; Orion corporation, Espoo, Finlande) et 10 mg de tartrate de butorphanol (10 mg/ml, Torbugesic[®]; Wyatt Santé Animale, Ville St-Laurent, QC, Canada). L'anesthésie locale à l'aide du chlorhydrate de lidocaïne (20 mg/ml, Lurocaïne[®]; Vétoquinol, Lavaltrie, QC, Canada) à raison de 20 ml par site a aussi été utilisée. Le modèle de guérison préconisé pour cette étude est le même qui a été utilisé pour une étude menée en parallèle sur la physiologie de la guérison. Chaque cheval possédait 15 plaies regroupées en trois sites; cinq sur le thorax et cinq sur la partie distale de chacun des membres antérieurs. Deux chevaux portaient les plaies thoraciques à gauche et les deux autres à droite. Pour notre expérience, seule une plaie thoracique par cheval a été biopsiée, puisque nous cherchions à caractériser la guérison normale du cheval après une semaine de guérison. Ce moment correspond à la phase proliférative (fibroblastique), qui est souvent excessive chez le cheval. Le protocole respectait les politiques et les normes du Comité de déontologie animale de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, en conformité avec les principes et recommandations du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA).

2. Prise d'échantillons

Les échantillons de peau normale (IS) ont été obtenus lors de la création de plaies. Les échantillons des plaies en voie de guérison ont été pris à sept jours suivant le trauma à l'aide d'un punch à biopsie de 6 mm de diamètre (Acu•Punch; Acuderm

Inc., Ft Lauderdale, FL, USA). Ces biopsies contenaient le bord de plaie (WM), c'est-à-dire les marges cutanées, le nouvel épithélium prolifératif et migratoire, ainsi que du tissu de granulation. Les échantillons récupérés ont été immédiatement déposés dans un contenant sur glace et rincés avec de la saline stérile à 4°C, puis le surplus de liquide a été épongé sur un papier absorbant. Les échantillons ont été emballés dans du papier d'aluminium et plongés dans l'azote liquide, puis transférés dans un congélateur à -80°C jusqu'à usage ultérieur.

3. Extraction et traitement de l'ARN

L'extraction de l'ARN total des divers échantillons a été effectuée selon la technique de Chomzynski et Sacchi (1987), qui a été adaptée au laboratoire (Brûlé et coll., 2000). Les échantillons IS et WM, congelés et d'environ 6 mm de diamètre par 2 mm d'épaisseur ont été séparés en deux. Une demie a été coupée en petits morceaux à l'aide d'une lame de rasoir. Par la suite, les morceaux ont été homogénéisés dans 2.5 ml de solution dénaturante (4 M guanidium isothiocyanate, 0.5% Na-N-laurylsarcosine, 25 mM Na-citrate, pH 7) à l'aide d'un polytron à une vitesse moyenne de 8000 rpm. L'homogénat a été transféré sur un coussin de chlorure de césium (5.9 M ClCs, 0.1 M EDTA) puis centrifugé 4 h à 267 000 G à une température de 20°C. Le culot d'ARN a été dissout dans 400 µl de solution dénaturante (4 M guanidium isothiocyanate, 0.5% Na-N-laurylsarcosine, 25 mM Na-citrate, pH 7) puis extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'isopropanol (Sambrook et Russell, 2001). La concentration d'ARN total ainsi que sa qualité ont été estimés respectivement par la densité optique à 260 nm et le ratio des densités optiques à 260 nm / 280 nm. De plus, la qualité de l'ARN a été appréciée par la visualisation des bandes ribosomales 28S et 18S suite à la séparation électrophorétique de 1 µg d'ARN total sur gel d'agarose 1% en conditions dénaturantes (0.74 M formaldéhyde, 40 mM MOPS, 0.01 mM Na-acétate, 0.2 mM EDTA, pH 7), suivi d'un transfert par capillarité dans le 10X SSC (1.5 M NaCl, 150 mM Na-Citrate) sur une membrane de nylon non-chargée (Hybond-N; Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada) suivi d'une coloration de l'ARN au bleu de méthylène (Sambrook et Russell, 2001).

4. RT-PCR par la méthode SMART®

Pour procéder à l'étape de RT-PCR, des pools d'ARN total ont été formés. Pour ce faire 1 µg d'ARN total de chaque échantillon ont été regroupés soit IS ou WM, afin de contrer la variabilité de l'expression génique entre les animaux et, par le fait même, obtenir une meilleure représentativité des gènes exprimés à ce stade de la guérison. De ces pool, 1 µg d'ARN total a été transformé en ADNc de pleine longueur à l'aide de la trousse « SMART PCR cDNA synthesis » (Clontech Lab Inc, Palo Alto, CA, USA), en respectant les recommandations du manufacturier (user manual : PT3041-1) à l'exception de l'ajout de 42 ng de la protéine du gène 32 du phage T4 (« T4 Gene 32 Protein »; Roche Molecular Biochemicals, Laval, QC, Canada).

La technique de SMART se divisait en deux étapes, la première étant la synthèse du simple brin d'ADNc à partir de l'ARN total. Les ADNc simple brin ont été synthétisés à l'aide d'un oligo-dT₃₀ (CDS: tableau I) spécialement formulé. La rétrotranscription à l'aide de la transcriptase inverse PowerScript (Clontech Lab Inc) a servi à augmenter la représentativité des régions 5' non-traduite (5'-UTR) des ARNm. La seconde étape a permis l'amplification par PCR des ADNc simple brin des deux populations, IS et WM. Un µl d'ADNc simple brin a été utilisé, ainsi que la polymérase Advantage 2 (Clontech Lab Inc). Deux oligos ont été utilisés, un oligo sens qui s'ancrait aux guanosines en 5'-UTR (SMART II) et un oligo anti-sens qui s'ancrait à la queue polyA⁺ (CDS: Tableau I). Le nombre de cycles de PCR optimum pour les deux populations différait, soit, 20 cycles pour les échantillons IS et 19 cycles pour ceux de WM.

5. Analyse des ADNc

L'analyse des ADNc obtenus suite au RT-PCR a été réalisée en plusieurs étapes (Figure 2). Les ADNc ont été digérés par l'enzyme de restriction RsaI. L'expression des gènes a été comparée entre les deux populations d'ADNc, soit IS et WM, à l'aide de la technique HSS puis une vérification de l'efficacité de la

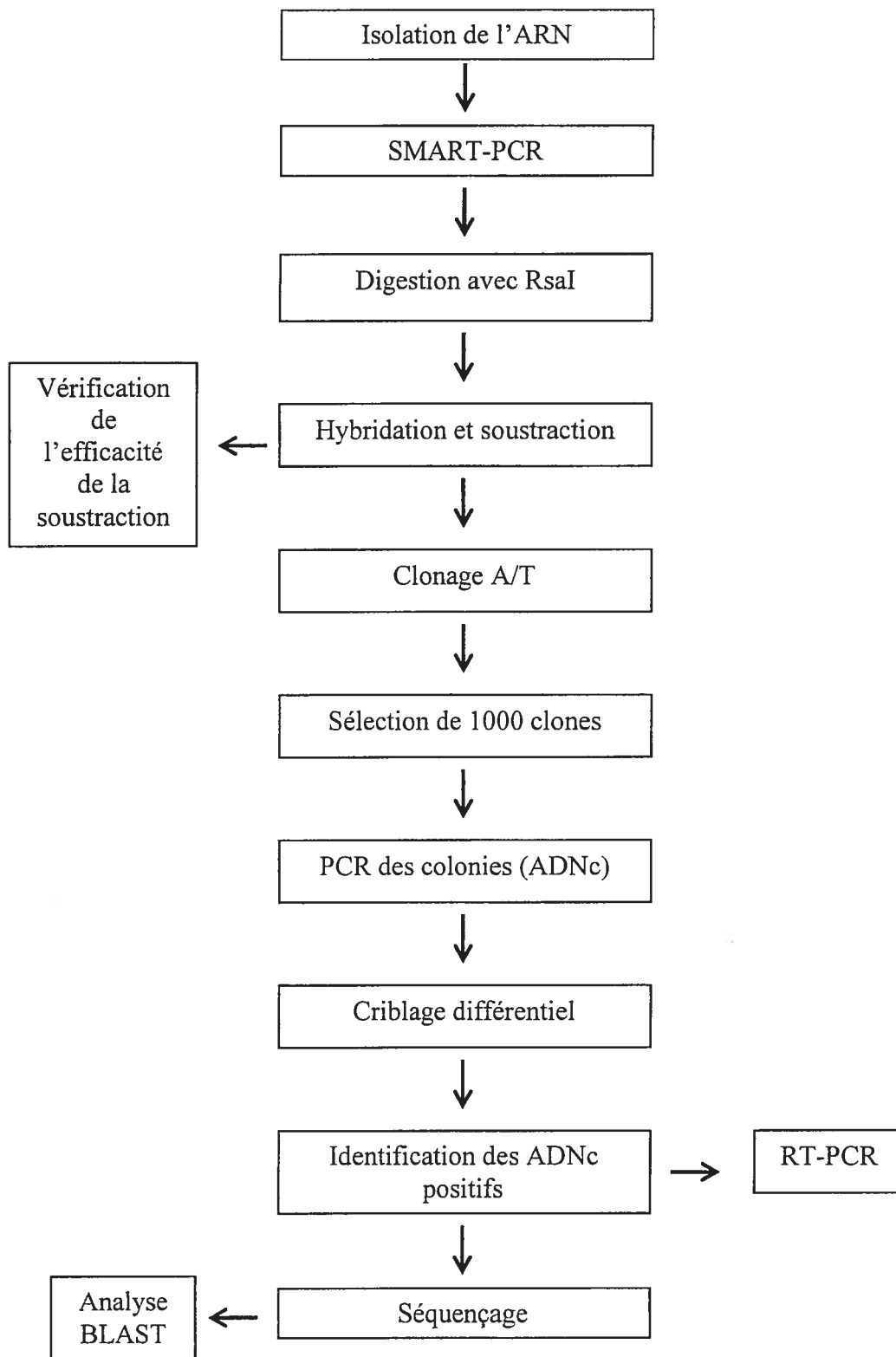


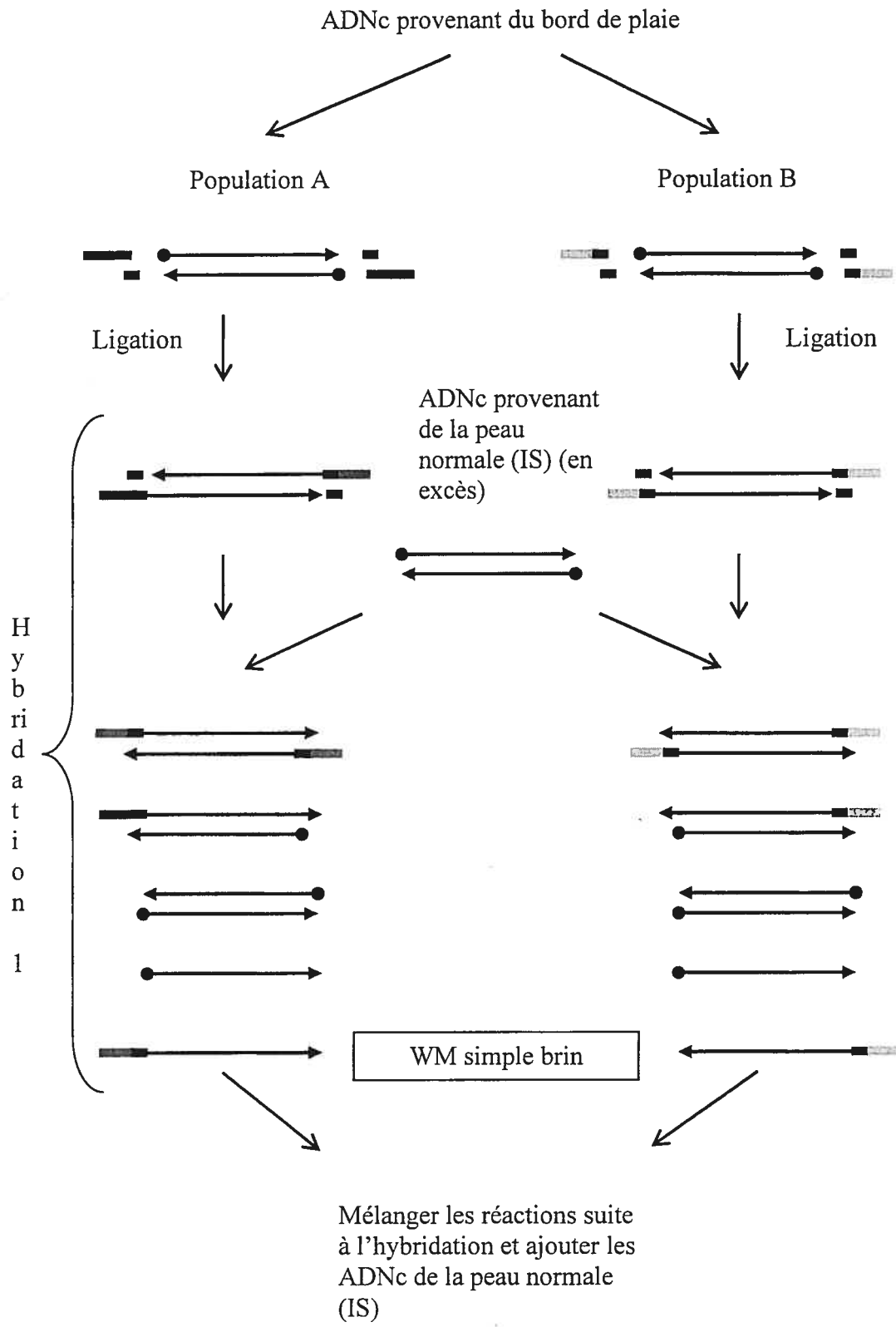
Figure 2 Schéma représentant les différentes étapes de l'analyse effectuée lors de l'exécution de la technique de HSS

soustraction a été effectuée. Une génothèque soustraite d'ADNc (WM-IS) a été générée puis criblée. Les ADNc différentiellement exprimés ont été séquencés puis comparés dans GenBank. L'expression différentielle de certains ADNc identifiés par HSS a été confirmée par analyse RT-PCR semiquantitatif.

L'expression des gènes a été analysée dans les échantillons de peau normale (IS) et de plaie en guérison (WM). La comparaison des ces deux populations d'ARNm total a été effectuée par la méthode de HSS (Diatchenko et coll., 1996) (Figure 3). Cette technique permet l'amplification sélective par PCR de fragments d'ADNc correspondants aux ARNm ayant une expression différentielle, tout en prévenant l'amplification des ADNc qui ne subissent pas de variation de leur niveau d'expression (Diatchenko et coll., 1999). La reproductibilité et l'efficacité de cette technique ont été démontrées préalablement (Endege et coll., 1999, Gurskaya et coll., 1996). L'enrichissement des ADNc varie d'un facteur de 1 000 à 5 000 si les conditions sont optimales (Villalva et coll., 2001).

6. Hybridation et soustraction

La trousse « PCR-Select cDNA subtraction » (user manual : PT1117-1; Clontech Lab Inc) a été utilisée pour la technique HSS selon les instructions du manufacturier et quelques modifications. La première étape consistait en une digestion des ADNc obtenus précédemment par PCR à l'aide d'une enzyme de restriction à coupures franches, soit *RsaI*, qui génère des fragments d'ADNc se situant entre 0.2 et 2 kb. Par la suite, les ADNc provenant des WM ont été divisés en deux populations, auxquelles ont été ligués des adaptateurs différents fournis dans la trousse (oligonucléotides : 1 ou 2R; Tableau I). La première hybridation a été réalisée sur les deux populations WM-1, WM-2R en les incubant 8 h à 68°C avec les ADNc provenant de l'échantillon IS. Cette première hybridation consistait en une soustraction et en une normalisation. La soustraction a pour objectif d'éliminer les ADNc communs entre le WM et le IS tandis que la normalisation permet d'enrichir les gènes faiblement exprimés par rapport à ceux fortement exprimés lors de la guérison cutanée afin d'obtenir une meilleure représentativité des gènes exprimés dans l'échantillon étudié (Diatchenko et coll., 1999).



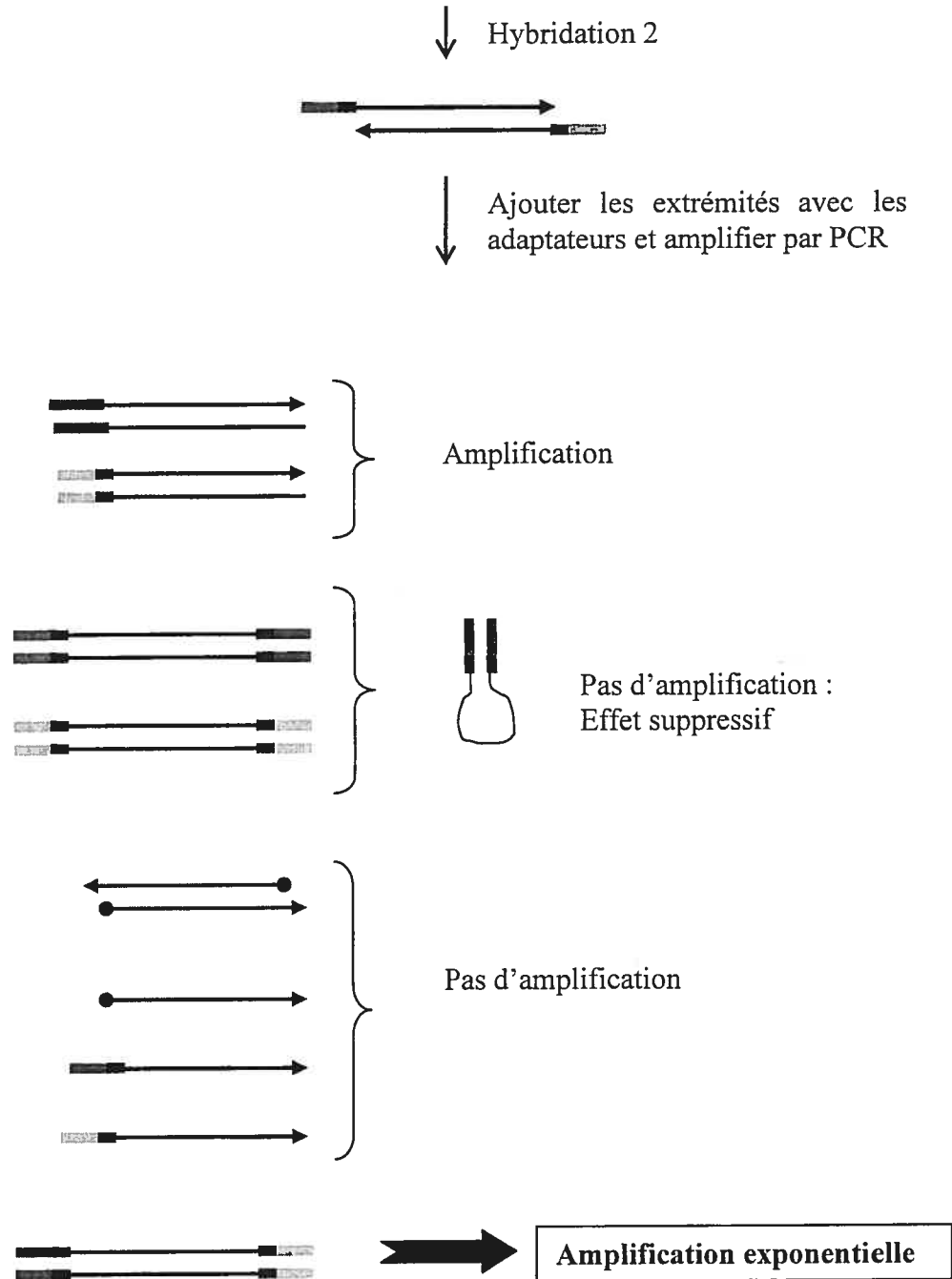


Figure 3 Schéma représentant les différentes étapes requises pour l'exécution de la technique HSS

La seconde hybridation consistait à regrouper les deux populations d'ADNc, WM-1 et WM-2R, puis d'ajouter à ce mélange un excès d'ADNc de IS. Cette hybridation complétait la soustraction des ADNc communs entre les deux populations. Lors de cette hybridation les ADNc de WM-1 et WM-2R se sont hybridés et représentent les ADNc exprimés différenciellement à ce stade de la guérison. Ces ADNc ont été sélectivement amplifiés par deux réactions de PCR. La première fut une réaction de 27 cycles (un préchauffage à 94°C : 25 sec, puis 94°C : 10 sec ; 66°C : 30 sec, 72°C : 1.5 min) réalisée à partir de 1 µl d'ADNc dilué de la seconde hybridation. Le mélange pour ce PCR contenait 19.5 µl d'eau stérile, 2.5 µl de tampon de réaction PCR 10X, 5 mM de dNTP, 10 µM de PCR primer 1 et 0.5 µl de 50X Advantage cDNA Polymerase 2 Mix (Clontech Lab Inc). La seconde réaction de PCR fut de 12 cycles (94°C : 10 sec ; 68°C : 30 sec ; 72°C : 1.5 min) et fut réalisée à partir de 1 µl d'une dilution 1:10 de la première PCR. Le mélange pour ce PCR contenait 18.5 µl d'eau stérile, 2.5 µl de tampon de réaction PCR 10X, 5 mM de dNTP, 10 µM de PCR-Nested 1, 10 µM de PCR-Nested 2R et 0.5 µl de 50X Advantage cDNA Polymerase 2 Mix (Clontech Lab Inc).

La soustraction des ADNc WM-IS a été réalisée, puis, en parallèle, la soustraction inverse (IS-WM) a été faite. La population d'ADNc WM-IS a été utilisée afin d'établir la génothèque soustraite. Lors du criblage différentiel de la génothèque soustraite, les deux populations d'ADNc soustraits (WM-IS et IS-WM) ont été utilisées comme sondes d'hybridation.

Tableau I Liste des oligonucléotides utilisés et qui sont fournis dans les trousseaux « SMART PCR cDNA Synthesis » et « PCR-Select cDNA Subtraction » de Clontech

Noms	Séquence (5' vers 3')
SMART II	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG
CDS	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT (30) (A/C/G/T) (A/G/C)
PCR-Nested 1	TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT
PCR-Nested 2R	AGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT
PCRprimer 1	CTAATACGACTCACTATAGGGC

7. Vérification de la soustraction

La vérification de la soustraction a été effectuée grâce à des gènes contrôles tel que décrit par la trousse « PCR-Select cDNA Subtraction » (user manual : PT1117-1 ; Clontech Lab Inc). Cette vérification a été effectuée par PCR sur les deux populations d'ADNc soustraites, WM-IS et IS-WM, ainsi que sur les deux populations d'ADNc non soustraites, WM et IS. Une analyse comparant un nombre croissant de cycles de PCR a été réalisée pour deux gènes préalablement déterminés en fonction de leur profil d'expression lors de la guérison cutanée. Le gène du glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPD) est constitutivement exprimé tandis que l'expression du gène MMP3 est induite lors de la guérison cutanée (Madlener et coll., 1998, Okada et coll., 1997). Les amorces utilisées pour amplifier ces deux gènes [GAPD (eGAPD-1 et eGAPD-A) et MMP3 (eMMP3-1 et eMMP3-A)] ont été déterminées à partir de séquences équines disponibles dans GenBank (GAPD GenBank accession number AF157626 et MMP3 GenBank accession number U62529) et sont définies au tableau II. L'amplification des fragments d'ADNc a été positionnée entre les sites RsaI de l'ADNc. Les cycles de PCR furent de 15, 20, 25, 30 cycles et les conditions d'amplification furent les suivantes : 94°C : 30 sec ; 64°C : 30 sec ; 68°C : 2 min (appareil GeneAmp PCR system 9700, Roche Molecular Systems, Inc, Branchburg, NJ, USA). L'analyse des produits de PCR aux différents cycles a été effectuée sur un gel d'agarose 2% coloré au bromure d'éthidium.

Tableau II Liste des oligonucléotides formulés pour la vérification de la soustraction

Noms	Séquence (5' vers 3')
eGAPD-A	CAAGTTCCATGGCACAGTCACGG
eGAPD-1	AAAGTGGTCGTTGAGGGCAATGC
eMMP3-A	GTTACTATGCGTGGCAGCGTGC
eMMP3-1	GTGTTGGTCGAGTGATAGAGACC

8. Clonage des ADNc soustraits

Les ADNc WM-IS ont premièrement subi une réaction d'élongation de 15 min à 72°C à l'aide de 0.8 µl d'AmpliTaq DNA polymérase (5 U/µl ; PE, Roche

Molecular Systems Inc) et une purification (QIAquick, PCR Purification Kit, Qiagen Inc, Mississauga, ON, Canada). Le clonage a été réalisé dans un vecteur plasmidique pDrive (Qiagen Inc) puis a servi à transformer les bactéries *E.coli* compétentes TOP10F'. La croissance de ces bactéries a été effectuée sur un milieu sélectif LB contenant 40 ug/ml de kanamycine (kan), 300 ug/ml de (S-Gal) et 30 ug/ml d'isopropylthio- β -D-galactosidase (IPTG), permettant une sélection visuelle des colonies recombinantes. Environ 950 colonies blanches ont été repiquées aléatoirement dans des plaques à 96 puits contenant 200 ul de milieu de congélation Hogness (8.8% glycérol, 55 mM K₂HPO₄ dibasique, 1 mM MgSO₄, 26mM KH₂PO₄ monobasique, 15 mM NH₄(SO₄), complété avec le milieu LB puis incubées à 37 °C toute la nuit avec agitation.

9. Criblage différentiel de la génothèque soustraite d'ADNc

9.1. Établissement des macro-réseaux

Le criblage différentiel se divisait en trois étapes; soit l'établissement des macro-réseaux, la synthèse des sondes radioactives d'ADNc et l'hybridation et détection des clones positifs. Afin d'établir les macro-réseaux, chaque clone d'ADNc de la génothèque soustraite WM-IS a été amplifié par PCR puis déposé sur une membrane de nylon. Les colonies repiquées dans les plaques de 96 puits ont été diluées avec de l'eau stérile à raison de 1:5. De cette dilution, 5 ul de chaque puits ont été transférés dans les plaques à PCR de 96 puits. À ce 5 ul s'est ajouté 15 ul du pré-mélange qui contenait : 2 ul de tampon de PCR 10X avec MgCl₂ (PE, Roche Molecular Systems, Inc.), 0.6 ul d'oligonucléotides PCR-Nested 1 (10 uM), 0.6 ul d'oligonucléotides PCR-Nested 2R (10 uM), 0.4 ul de dNTP (10 mM), 0.2 ul d'AmpliTaq DNA polymérase (5 U/ μ l ; PE, Roche Molecular Systems Inc) et 11.2 ul d'eau stérile. Pour éviter l'évaporation des échantillons, chaque puits a été recouvert d'une goutte d'huile minérale. Le PCR comprenait 27 cycles (95°C : 30 sec ; 67°C : 1 min ; 72°C : 2 min) dans l'appareil de PCR Twin Block™ System (EasyCycler™ Series, San Diego, CA, USA) puis les produits furent conservés à 4°C.

L'établissement des membranes de macro-réseaux a été effectué à partir d'une dilution 1:20 des produits de PCR dans une solution de NaOH 0.3 N contenant 5 % de bleu de bromophénol. Quinze μl du mélange de produits de PCR dénaturés ont été transférés sur des membranes de nylon chargées (Hybond- N^+ , Amersham-Pharmacia Biotech) à l'aide d'un appareil pour réaliser les macro-réseaux à 96 puits. Par la suite, les ADNc ont été fixés aux rayons ultraviolets à une énergie de 150 Mjoulles (Gs Gene Linker, Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada).

Des ADNc contrôles ont été fixés sur les membranes de macro-réseaux. Le contrôle positif (MMP3) a été généré à partir de 1 μl produit de PCR secondaire de la population soustraite WM-IS (section 6, Méthodologie). Le volume final de la réaction était de 30 μl et contenait : 1 μl du produit de PCR, 1.2 μl de l'amorce sens (10 μM), 1.2 μl de l'amorce antisens (10 μM), 3 μl de tampon 10X, 0.6 μl de dNTP mix (10mM) et 0.6 μl de polymérase Advantage 2 DNA polymerase 50X (BD Biosciences Clontech). Le PCR comprenait 40 cycles et les conditions d'amplification étaient les suivantes : 94°C : 30 sec ; 64°C : 30 sec ; 68°C : 2 min (appareil GeneAmp PCR system 9700, Roche Molecular Systems, Inc). Le contrôle négatif Equ C1 a été généré à partir d'une amplification PCR de l'ADNc pleine longueur cloné dans un plasmide avec les amorces décrites au tableau I (NP-1 et NP-2). Le volume final de la réaction de PCR était de 25 μl et contenait : 1 μl de produit de PCR, 2.5 μl de tampon 10X, 1 μl de Nested primer 1 (10 μM), 1 μl de Nested primer 2 (10 μM), 0.5 μl de dNTP mix (10 μM) et 0.5 μl de polymérase Advantage 2 (BD Biosciences Clontech). Le PCR comprenait 12 cycles et les conditions d'amplification étaient les suivantes : 94°C : 15 sec ; 68°C : 30 sec ; 72°C : 1.5 min ; 72°C : 7 min. Les produits de PCR ont été analysés sur gel de 2 % d'agarose, puis ont été purifiés (QIAquick, PCR purification Kit, Qiagen Inc). Des plaques de bromure d'éthidium ont été utilisées pour estimer la concentration des ADNc contrôles (Sambrook et Russell, 2001). Ces derniers ont été fixés aux membranes de macro-réseaux tel que mentionné précédemment à raison de 2.5 μl de MMP3 (80 ng/ μl) et 1 μl de Equ C1 (100 ng/ μl).

9.2. Synthèse des sondes radioactives d'ADNc

Les populations soustraites d'ADNc WM-IS et IS-WM ainsi que les populations non-soustraites WM et IS provenant du PCR secondaire (section 6, Méthodologie) ont été utilisées comme sondes d'hybridation afin de réaliser le criblage différentiel de la génothèque d'ADNc WM-IS (section 8). Les produits de PCR ont été purifiés (QIAquick, PCR purification Kit, Qiagen Inc) et les concentrations d'ADNc ont été estimées sur une plaque de bromure d'éthidium [environ 80 ng/ μ l pour les différents échantillons (WM-IS, WM, IS-WM, IS)] (Sambrook et Russell, 2001). Trois digestions successives ont été réalisées afin d'éliminer les interactions non spécifiques possibles par les adaptateurs présents aux extrémités des produits de PCR secondaire. Deux μ g de produits de PCR de chaque population ont été digérés. La première digestion a été réalisée dans un volume final de 30 μ l pendant 1 h à 37°C à l'aide d'AfaI (10 U/ μ l ; Amersham-Pharmacia Biotech) et 3 μ l de 10X tampon 4 (New England Biolabs Inc, Mississauga, ON, Canada). La deuxième digestion a été réalisée avec l'ajout de 1 μ l de SmaI (20 U/ μ l ; New England Biolabs Inc) pendant 1 h à 30°C. La dernière digestion fut réalisée suite à l'ajout de 59 μ l d'eau, 10 μ l de 10X tampon 3 (New England Biolabs Inc) et 1 μ l d'EagI (10 U/ μ l ; New England Biolabs Inc) pendant 1 h à 37°C (Diatchenko et coll., 1999). L'élimination des adaptateurs digérés a été effectuée par une purification (QIAquick, PCR Purification Kit, Qiagen Inc). La trousse « Megaprime DNA Labelling System » (Amersham Pharmacia Biotech) a été utilisée pour marquer au P^{32} les sondes d'ADNc (160 ng : IS-WM, ou WM-IS, ou IS et WM), selon les instructions du manufacturier. Le marquage fut réalisé en incorporant 50 μ Ci de [α - P^{32}]-dCTP (Perkin Elmer Life Sciences Inc, Boston, MA, USA) au milieu de marquage. La radioactivité non incorporée fut purifiée par des colonnes d'affinité (QIAquick Nucleotide Removal Kit, Qiagen Inc).

9.3. Hybridation et détection des clones positifs

La préhybridation a été effectuée à 72°C pour une période de 4 h dans un volume de 20 ml comprenant 4X SET (0.6M NaCl, 120mM Tris pH 7.4, 4 mM

EDTA), 0.1% NaPP, 0.2% SDS, 500 µg/ml d'héparine et 1 mM de chacun des oligonucléotides suivants dénaturés 5 min à 100°C : PCR-Nested 1, PCR-Nested 2R, P1-INV, P2R-INV et 2 mM de poly dADT (Amersham-Pharmacia Biotech). Les sondes radioactives d'ADN ont été quantifiées à l'aide d'un compteur bêta afin d'incorporer le même nombre de CPM de sondes marquées aux bouteilles d'hybridation. La solution d'hybridation contenait 4X SET, 0.1% NaPP, 0.2 % SDS, 500 µg/ml d'héparine, 10% de dextran sulfate, 1 mM de chacun des oligonucléotides (PCR-Nested 1, PCR-Nested 2R, P1-INV, P2R-INV), 2 mM de poly-dAdt et les sondes radioactives dénaturées 5 min à 100°C. L'hybridation a été effectuée à 72°C pour une période minimale de 12 h dans un volume de 15 ml. Les membranes ont subi trois lavages, le premier, d'une durée de 20 min à 68°C, dans le 2X SSC (0.3 M NaCl, 30 mM C₆H₅ Na₃O₇ x 2H₂O), 0.1% SDS. Les deux derniers lavages ont été effectués dans le 0.1X SSC, 0.1 % SDS à 68°C pour 45 min. Les résultats d'hybridation ont été révélés par autoradiographie à l'aide d'une cassette *Kodak Biomax* possédant un écran d'intensification de signal et d'un film *Kodak Biomax MS* pour une durée minimale de 4 h à température pièce jusqu'à une durée maximale de 12 h à -70°C. Le développement des films a été effectué à l'aide de l'appareil Konica SRX-201.

10. Sélection, séquençage et analyse d'homologie des ADNc

10.1. Sélection des clones d'ADNc

Les résultats de criblage ont permis la sélection des ADNc différenciellement exprimés (section 9, Méthodologie). Les ADNc sélectionnés correspondaient à ceux qui démontraient : 1) une hybridation plus forte aux sondes soustraites WM-IS qu'aux sondes non-soustraites WM; 2) une hybridation plus faible aux sondes soustraites IS-WM qu'aux sondes non-soustraites IS; et 3) une hybridation plus forte aux sondes soustraites WM-IS qu'aux sondes soustraites IS-WM. Une amplification par PCR des ADNc sélectionnés a été réalisée à partir des produits de PCR générés lors de l'établissement des macro-réseaux (section 9.1, Méthodologie). La réaction de PCR a été effectuée dans un volume final de 25 µl et comprenait : 1 µl d'ADNc provenant du produit de PCR, 2.5 µl de tampon 10X, 1 µl de PCR-Nested 1 (10 µM),

1 μ l de PCR-Nested 2 (10 μ M), 0.5 μ l du mélange de dNTP (10 mM), 18.5 μ l d'eau et 0.5 μ l d'Advantage 2 polymerase (BD Biosciences Clontech). La réaction de PCR comprenait 12 cycles : 1) 94°C : 15 sec ; 68°C : 30 sec ; 72°C : 1.5 min, suivit d'une réaction d'élongation de 7 min à 72°C (PCR System 9700, Gene Amp, Roche Molecular Systems, Inc). Par la suite, les ADNc amplifiés ont été visualisés sur un gel d'agarose 2% avec du bromure d'éthidium afin de conserver les produits de PCR ne contenant qu'une seule bande d'ADNc. Ces derniers ont été purifiés sur une colonne d'affinité (QIAquick, PCR Purification Kit, Qiagen Inc) avant de procéder à leur séquençage.

10.2. Séquençage et analyse d'homologie

Les ADNc amplifiés et purifiés ont été séquencés avec l'amorce PCR-Nested 1 (1.5 mM) selon la méthode didéoxo à l'aide de la trousse « Big Dye Terminator 3.0 » (ABI Prism, Applied BioSystem, PE, Branchburg, NJ). Les produits de séquençage ont été séparés sur un séquenceur automatique (ABI Prism 310, Applied BioSystem, PE). Les ADNc ne pouvant être séquencés avec cette amorce furent séquencés avec l'amorce PCR-Nested 2 en respectant la même technique. L'analyse d'homologie des séquences a été réalisée à l'aide de la fonction BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) dans les banques de données NR et EST de GenBank. Pour être considérées homologues à une séquence de GenBank, les séquences d'ADNc devaient avoir un match d'au moins 100 paires de bases (pb) et une valeur de probabilité moindre que e^{-30} pour la banque NR, et moindre que e^{-20} pour la banque EST.

11. Validation de l'expression différentielle d'ADNc sélectionnés

La technique de RT-PCR semiquantitatif a été utilisée pour confirmer le profil d'expression différentielle de certains gènes identifiés par l'application du HSS.

11.1. Sélection et préparation des ADNc

Les ADNc choisis pour la validation de l'expression différentielle ont été sélectionnés selon plusieurs critères; 1) la disponibilité des séquences équines, 2) leur redondance lors du criblage et 3) leur rôle. GAPD a été utilisé pour normaliser les valeurs des autres gènes alors que le gène contrôle utilisé lors de l'étude était MMP3, puis trois autres gènes dont le rôle dans la guérison était connu, soit MMP1, COL1A2 et DSPG2 ont été utilisés. De plus, trois autres gènes dont le rôle dans la guérison était inconnu ont été validés, soit CD68, CD163 et ADAM9. Tous ces gènes ont été analysés à l'aide d'amorces conçues à partir de séquences équines (MMP1 GenBank accession number AF48882, COL1A2 GenBank accession number AB070839, DSPG2 GenBank accession number AF038127, CD68 GenBank accession number DN625868, CD163 GenBank accession number DN625936 et ADAM9 GenBank accession number DN625845) (Tableau III). La validation a été effectuée sur les mêmes échantillons de peau utilisés pour le HSS, sauf que cette fois-ci les ARN totaux n'ont pas été regroupés (section 4, Méthodologie). Nous avons ainsi analysé les gènes précédents pour chacun des 4 chevaux, séparément.

11.2. RT-PCR semiquantitatif

Pour effectuer la validation des gènes sélectionnés, 0.85 µg d'ARN total des quatre chevaux ont été transformés en ADNc à l'aide de la trousse de « SMART cDNA PCR synthesis » (Clontech Lab Inc) tel que décrit à la section 4. Le nombre de cycles nécessaire pour la réaction de PCR de 100 µl du Smart fut déterminé avec le gène GAPD, pour qu'il soit de même intensité pour tous les chevaux, soit entre 18 et 22 cycles. Par la suite les produits de PCR ont été dilués 10 fois dans le tampon TE en prévision des PCR avec les oligos spécifiques. Les PCR spécifiques ont tous été faits dans un volume final de 25 µl comprenant : 18.5 µl d'eau, 2.5 µl 10 X tampon PCR, 1 µl primer sens (10µM), 1 µl de primer antisens (10µM), 0.5 µl de dNTP mix (10µM) et 0.5 µl de polymérase Advantage 2, et avaient tous les mêmes paramètres soit ; 94°C : 30 sec, 64°C : 30 sec et 68°C : 2 min. Les amorces pour les différents gènes sont présentées dans le tableau ci-dessous, sauf GAPD et MMP3 décrit dans le tableau II. Le nombre de cycles requis pour les différents gènes étaient : GAPD, 18

cycles ; MMP3, 27 cycles ; MMP1, 20 cycles ; COL1A2, 15 cycles ; DSGP2, 24 cycles ; CD68, 19 cycles ; CD163, 23 cycles et ADAM9, 25 cycles. Les produits de PCR obtenus ont été entièrement transférés sur un gel d'agarose 2% avec bromure d'éthidium et visualisés à l'aide de rayons ultraviolets. Des photos digitales ont été prises à partir de ces gels et une analyse densitométrique des résultats a été effectuée avec le programme NIH Image (Research Services Branch (RSB) of the National Institute of Health (NIH) : <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

Tableau III Liste des oligonucléotides formulés pour la validation de la méthodologie

Noms	Séquences (5' vers 3')
eMMP1-1	GAATGAGAGAGTCCAAGGGAATG
eMMP1-A	GACACAGGAGCCCAGTCGTTG
eCOL1A2-1	GTCCAAAAGTGCAATGTCAAGGATG
eCOL1A2-A	CGAAACCTGTATCCGGGCTCAAC
eDSGP2-1	CAAGTGAAGTTCCTCAAATGAGG
eDSGP2-A	GACACCACGCTGCTGGACCTG
eCD68(2)-1	GCTCAGAGTGGCTGGTAGGTG
eCD68(2)-A	GCAGCGCAGTGGACATTCTTGG
eCD163-1	GTAAGCAGCTGTCTCTGTCTTCG
eCD163-A	CACTACTTGTCTGGACGTGTGG
eADAM9-1	CAGAGGACTGCTGCACATAGAC
eADAM9-A	GCTGATCTGGTTTCCAGTTGTCC

12. Analyse statistique

Les valeurs obtenues avec l'analyse par RT-PCR des différents gènes ont été normalisées avec les valeurs de GAPD correspondant. Les variances entre les biopsies des échantillons IS et WM ont été vérifiées par le test O'Brian et Brown-Forsythe (JMP, 1989). Les valeurs corrigées des niveaux d'ARNm des différents gènes ont été comparées entre les biopsies de IS et de WM à l'aide d'un T-test unilatéral apparié (SAS version 9.0, Cary NC).

Article**Profiling of Differentially Expressed Genes in Dermal Wound Margin Biopsies of Horses, Using Suppression Subtractive Hybridization**

Josiane Lefebvre-Lavoie BSc, Jacques G. Lussier DMV, PhD, Christine L. Theoret DMV, PhD, DACVS

From the Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, 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: 

Version corrigée soumise à Physiological Genomics, 11 avril 2005

1. Abstract

Disturbed gene expression may disrupt the normal process of repair and lead to pathologic situations resulting in excessive scarring. To prevent and treat impaired healing it is necessary to first define baseline gene expression during normal repair. The objective of this study was to compare gene expression in normal intact skin (IS) and wound biopsies (WM), using suppression subtractive hybridization (SSH) to identify genes differentially expressed during wound repair in horses. Tissue samples included both normal intact skin and biopsies from 7 day old wounds. IS cDNAs were subtracted from WM cDNAs to establish a subtracted (WM-IS) cDNA library. 226 non-redundant cDNAs were identified. Detection of genes previously shown to be expressed 7 days following trauma, including COL1A2, ANXA2, COL6A3, ACTB, FGF-7, LAMR1, MMP1, SPARC and TIMP2, supported the validity of the experimental design. An RT-PCR assay confirmed an increase or induction of the cDNAs of specific genes (COL1A2, MMP1, DSPG2, CD68, CD163 and ADAM9) within wound biopsies. Among these, COL1A2 and MMP1 had previously been documented in horses. 68.8% of the cDNAs had not previously been attributed a role during wound repair, of which SSAT, SERPINB10 and SNX9 were highly expressed and whose known functions in other processes made them potential candidates in regulating the proliferative response to wounding. In conclusion, we have identified novel genes that are differentially expressed in equine wound biopsies and which may modulate repair. Future experiments must correlate changes in mRNA levels for precise molecules with spatio-temporal protein expression within tissues.

2. Introduction

Traumatic wounds are common in the horse where primary closure is frequently precluded by considerable tissue loss and contamination, such that repair must occur by second intention. Horses suffer from chronic non-healing wounds similar in appearance to venous leg ulcers in man, and, conversely, from excessive fibroplasia also referred to as "proud flesh", that subsequently compromises

epithelialization and contraction. Both conditions ultimately lead to extensive scarring which may adversely affect function.

Chronic, indolent wounds appear to result, in part, from an imbalance between matrix metalloproteinases (MMP)s and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)s. Chronic wound fluid is characterized by elevated levels of proteinases which lead to excessive protein degradation and the inactivation of critical growth factors (72). Chronic wounds also contain reduced levels of TIMPs, exacerbating the degradative environment.

Equine proud flesh resembles pathologic scarring in man (hypertrophic scar; keloid) in which the normal sequence of repair becomes dysregulated and the evolving scar is trapped in the proliferative phase of repair (24, 31). Several factors have been incriminated in this condition in horses including an inefficient inflammatory response to trauma (78, 79), persistent local up-regulation of pro-fibrotic cytokines (69, 70, 73), a disparity between the synthesis and degradation of collagen (61), as well as microvascular occlusion and deficient apoptosis of the cellular components of granulation tissue (unpublished data). Despite this knowledge, attempts at ameliorating the repair of chronic wounds and preventing the development of keloids in the horse have been disappointing. This no doubt relates to the lack of information pertaining to the molecular mechanisms regulating repair.

Dermal wound repair involves intricate exchanges between multiple cell types, cytokines and ECM molecules acting locally and in parallel with numerous systemic factors such as platelets, the coagulation cascade, and cellular and humoral components of the immune system (66). Events are conventionally divided into synchronized and interrelated phases including acute inflammation, cellular proliferation, and finally, matrix synthesis and remodeling with scar formation. The transition between phases requires the activation and/or silencing of many genes, such that a disturbance in gene expression could lead to abnormal scarring.

A handful of studies have analyzed the expression of specific genes during normal or impaired healing, in particular those regulating ECM molecules and cytokines (56, 9, 62), although only one has been performed in the horse (61). While these investigations have yielded valuable data, they are far from comprehensive.

Indeed, given the complexity of the repair process, a thorough outline of all contributing molecules is required if healing is to be positively influenced. Furthermore, prior to interpreting abnormal genetic responses to wounding, the gene expression profile of normal injured skin must be characterized, as has recently been done in man (12) and rats (66).

The objective of this study was to pinpoint genes that are differentially expressed during the proliferative phase of repair by comparing gene expression in biopsies of seven day-old wounds with that in intact skin. Identification and characterization of gene expression patterns will contribute to a better understanding of the overall repair process and ultimately permit the development of novel diagnostic and therapeutic strategies to resolve wound healing complications.

3. Materials and methods

3.1. Experimental animal model, tissue collection, and RNA isolation

Four healthy, 2-to-3 year old Standardbred mares were used for the experiment, which was sanctioned by the Canadian Council on Animal Care. The animals were kept in standing stalls, examined daily for signs of discomfort and systemic illness and wounds were monitored until complete healing.

Horses were sedated then local anesthesia was performed at the site destined for wounding on one randomly chosen hemi-thorax per horse. The surgical sites were aseptically prepared and a full-thickness, 6.25cm² wound was created with a scalpel and left to heal by second intention with no dressing. Excised skin from each wound was kept as the normal intact skin sample (IS). Full-thickness specimens were taken seven days post-operatively with an 8-mm diameter biopsy punch. The biopsies (WM) included a 3- to 4-mm section of the wound margin composed of peripheral skin and the migrating epithelium, as well as a 3- to 4-mm section of granulation tissue from the wound center. Biopsies were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. Total RNA from IS and WM was extracted as previously described (3). The concentration of total RNA was quantified by measuring optical density at 260 nm, and its quality was evaluated by visualizing the

28S and 18S ribosomal bands following electrophoretic separation on agarose gel with ethidium bromide (58).

3.2. Suppression subtractive hybridization (SSH)

In order to counter inter-animal variation, identical amounts (1 µg) of total RNA from each horse were pooled within IS and WM groups. The SSH procedure was validated and is used routinely in our laboratory (36, 17, 8). Briefly, the SMART PCR cDNA synthesis kit was used to generate double-stranded cDNA for both IS and WM samples, according to the manufacturer's instruction (user manual PT30411; BD Biosciences Clontech, Mississauga, ON, Canada). To produce the first strand cDNA, 1 µg of total RNA from each pooled group was reverse-transcribed in a total volume of 10 µl with the addition of 42 ng of T4 gene 32 protein (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada) with an oligo-dT30 primer (CDS: 5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT(30)(A/C/G/T)(A/G/C)-3') and PowerScript reverse transcriptase (BD Biosciences Clontech). Second-strand cDNAs were generated with the SMART II 5'-anchored oligo (5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG-3'), followed by a PCR amplification of 20 cycles for IS samples and of 19 cycles for WM samples, using Advantage 2 DNA polymerase (BD Biosciences Clontech). The forward (WM-IS) and reverse (IS-WM) reactions were obtained by subtracting respectively the IS cDNAs from WM cDNAs and WM cDNAs from IS cDNAs using PCR-Select cDNA subtraction technology (user manual PT1117-1; BD Biosciences Clontech). To execute this subtraction, WM and IS cDNAs were digested with RsaI to generate blunt-ended cDNA fragments (0.2 to 2 kb) suitable for optimal subtractive hybridization.

Subtraction efficiency was assessed via PCR amplification using equine gene-specific primers, by comparing the abundance of cDNAs before and after subtraction. Two genes were analyzed, one that is constitutively expressed: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPD), (GAPD GenBank accession number AF157626; sense: 5'-CAAGTTCATGGCACAGTCACGG-3'; antisense: 5'-AAAGTGGTCGTTGAGGGCAATGC-3'); and another that is known to be up-regulated in wound healing in rodents: MMP3 (40, 47), (MMP3 GenBank accession number

U62529; sense: 5'- GTTACTATGCGTGGCAGCGTGC-3'; antisense: 5'-GTGTTGGTTCGAGTGATAGAGACC-3'). Advantage 2 DNA polymerase (BD Biosciences Clontech) was used to perform PCR amplification, and 5µl aliquots were removed after 15, 20, 25 and 30 cycles for analysis on agarose gel. Subtraction efficiency was estimated by noting the different number of cycles needed to generate approximately equal amounts of the corresponding PCR product in subtracted and unsubtracted samples.

3.3. Cloning of subtracted complementary DNAs

The subtracted cDNAs were cloned into the pDrive plasmid (Qiagen PCR cloning kit, Qiagen Inc, Mississauga, ON, Canada) in 10 µl ligation reaction to construct the WM-IS subtracted library and used to transform competent TOP10F' *E. coli* as described previously (36).

3.4. Differential hybridization screening

The subtracted WM-IS cDNA library (950 individual colonies) was used to establish macroarrays for differential screening, as previously described (36, 17). The insert of each cDNA clone was amplified by PCR (27 cycles) in 96-well plates using the PCR-nested primers 1 and 2R as supplied by the manufacturer (BD Biosciences Clontech) along with AmpliTaq DNA polymerase (Roche Molecular Systems Inc). An aliquot of each amplification product was denatured in 0.3 M NaOH containing 5% bromophenol blue, and 15 µl were vacuum transferred onto a nylon membrane (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada) using a 96-well dot-blot apparatus in order to create the cDNA microarrays. Membranes were then cross-linked with 150 mJ UV light (GS Gene Linker, Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Positive (MMP3) and negative (EquC1 – glycoprotein member of the lipocalin superfamily) control cDNAs were transferred onto the macroarrays. For each 96-well plate, four replicate cDNA macroarray membranes were generated.

The subtracted (WM-IS; IS-WM), as well as unsubtracted (WM; IS) cDNA pools were used as complex hybridization probes for differential screening of macroarrays of the WM-IS cDNA library. The cDNA probes were labelled by

random priming incorporating [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (NEN Life Sciences, Boston, MA, USA) as previously described (17). Hybridization and washing conditions of macroarrays were as previously described (17). Equal quantities (CPM) of each heat-denatured cDNA probe, subtracted (WM-IS; IS-WM) or unsubtracted (WM; IS), were used to individually hybridize replicate WM-IS macroarray membranes. The membranes were then thoroughly washed and exposed to a phosphor screen for 4 h and the images were digitized (Storm 840, Amersham-Pharmacia Biotech). DNA sequencing and gene expression analysis were finally used to further characterize the differentially hybridizing cDNA clones.

3.5. DNA sequencing and sequence analysis

PCR amplification of the cDNA clones identified as differentially expressed by the WM-IS subtracted probe was performed on the PCR product generated initially for the macroarrays. The primers used for the 12 PCR cycles were PCR-Nested 1 and PCR-Nested 2R. Products were purified and visualized on agarose gel to keep those containing a single cDNA band. Sequencing reactions were performed on clones via the dideoxy method (Big Dye Terminator 3.0, ABI Prism; Applied Biosystem PE, Branchburg, NJ, USA) using the PCR-nested 1 (1.5 mM) or PCR-nested 2R (1.5 mM) primers. An ABI Prism 310 sequencer (Applied Biosystem) was used to analyze the sequencing reactions. Ultimately, 315 clones provided adequate results and their nucleic acid sequences were analyzed by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) against GenBank data bases (NR and EST). To be considered as homologous to a GenBank sequence, a cDNA sequence was required to have at least 100 base pairs (bp) matched with a probability value of less than e^{-30} for the NR bank and less than e^{-20} for the EST bank. The differentially expressed cDNA clones were then categorized into three groups: 1) gene with known sequence and function; 2) gene with known sequence but unknown function; and 3) sequence with no significant match.

3.6. Gene expression analysis

Semi-quantitative RT-PCR was used to confirm the differential expression pattern of selected cDNA clones identified by SSH. The clones were analyzed with RNA from the four horses used in the experiment, and for each horse the IS and WM samples were compared. SMART PCR cDNA synthesis technology (BD Biosciences Clontech) was used to generate cDNAs from 1 µg of total RNA from each IS and WM sample, as described above. Equine gene-specific primers were for MMP1 (MMP1 GenBank accession number AF48882; sense: 5'-GACACAGGAGCCCAGTCGTTG-3'; antisense: 5'-GAATGAGAGAGTCCAAGGGAATG-3'), pro- α 2 chain of type I pro-collagen (COL1A2 GenBank accession number AB070839; sense: 5'-CGAAACCTGTATCCGGGCTCAAC-3'; antisense: 5'-GTCCAAAAGTGCAATGTCAAGGATG-3'), dermatan sulfate proteoglycan 2 (DSPG2 GenBank accession number AF038127; sense: 5'-GACACCACGCTGCTGGACCTG-3'; antisense: 5'-CAAGTGAAGTTCCTCAAATGAGG-3'), cluster differentiation-68 (CD68 GenBank accession number DN625868; sense: 5'-GCAGCGCAGTGGACATTCTTG-3'; antisense: 5'-GCTCAGAGTGGCTGGTAGGTG-3'), CD163 GenBank accession number DN625936 (sense: 5'-CACTACTTGTCTGGACGTGTGG-3'; antisense: 5'-GTAAGCAGCTGTCTCTGTCTTCG-3'), disintegrin and metalloproteinase domain-9 (ADAM9 GenBank accession number DN625845; sense: 5'-GCTGATCTGGTTTCCAGTTGTCC-3'; antisense: 5'-CAGAGGACTGCTGCACATAGAC-3'), and GAPD and MMP3 described earlier. The PCR products were separated on a TAE-agarose gel with ethidium bromide, visualized with UV light and the images were then digitized. Image signal intensity was analyzed by densitometry using NIH Image (Research Services Branch of the National Institutes of Health: <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

3.7. Statistical analysis

Gene-specific signals for RT-PCR analyses were normalized by establishing a ratio with corresponding GAPD signals for each sample. Homogeneity of variance between IS and WM biopsies was verified by O'Brian and Brown-Forsythe tests (28). Corrected values of gene-specific mRNA levels were compared between intact skin

and wound margin biopsies by one-tailed paired T-test (SAS version 9.0, Cary NC). Data are presented as least-square means \pm SEM.

4. Results

4.1. Experimental animal model

Wounds in all horses went on to heal uneventfully. None became infected or developed exuberant granulation tissue (proud flesh).

4.2. Identification of differentially expressed genes using SSH

A cDNA library containing transcripts up-regulated seven days post-wounding was obtained by subtracting IS cDNAs from WM cDNAs via SSH (WM-IS). A reverse library was also constructed by subtracting WM cDNAs from IS cDNAs to be used as a control (IS-WM). PCR amplification analysis was used to verify efficiency of the subtraction procedure by comparing the expression of GAPD and MMP3 before and after subtraction. As expected, GAPD showed a marked decrease in relative abundance of cDNA in the WM-IS sample following SSH. Indeed, GAPD products were detected after only 15 PCR-cycles in the WM unsubtracted sample whereas in the subtracted sample (WM-IS), 20 PCR-cycles were necessary for detection on agarose gel (Fig. 1A). To evaluate the enrichment efficiency of genes known to be up-regulated during wound repair in rodents, the abundance of MMP3 (40, 47) cDNAs was investigated (Fig. 1B). MMP3 PCR products were observed after 25 PCR-cycles in both unsubtracted samples while in the subtracted sample (WM-IS), MMP3 signal was detected after only 20 PCR-cycles, revealing that MMP3 cDNA had been efficiently enriched. Conversely, the reverse-subtracted sample (IS-WM) presented no signal, indicating a complete depletion of MMP3 cDNA. These results confirm the effectiveness of both the normalization and the subtraction steps.

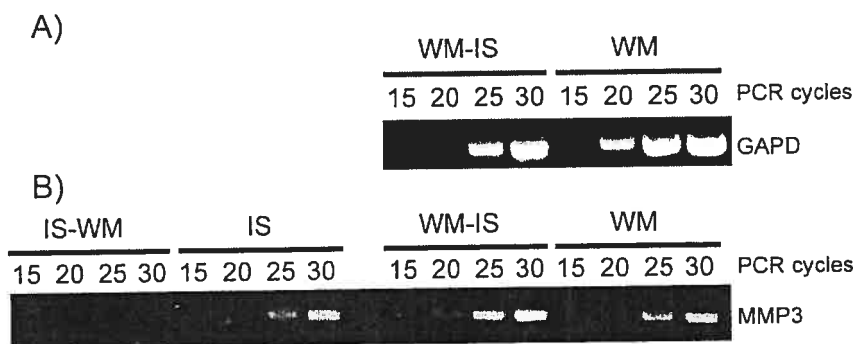


Figure 1

Evaluation of subtraction efficiency

A) Reduction of GAPD cDNA following subtraction in the WM-IS sample. Equine GAPD-specific primers were used to performed PCR on WM-IS subtracted and WM unsubtracted samples. Aliquots were collected at different PCR cycles as indicated. GAPD PCR products (760 pb) were present after only 15 PCR cycles in the WM unsubtracted sample whereas in the subtracted sample (WM-IS), 20 PCR cycles were necessary for detection. B) Enrichment of MMP3 cDNA following subtraction in the WM-IS sample. Equine MMP3-specific primers were used to performed PCR on WS-IS and IS-WM subtracted as well as WM and IS unsubtracted samples. Aliquots were collected at different PCR cycles as indicated. MMP3 PCR products (670 pb) were observed after fewer cycles for the WM-IS subtracted sample (20 PCR cycles) than for the WM unsubtracted sample (25 PCR cycles).

Subtracted cDNAs were then cloned into a plasmid vector to generate the WM-IS cDNA library. Differential hybridization screening was performed on the 950 randomly selected bacterial colonies to eliminate false positive clones. Colonies were spotted onto four identical sets of macroarrays, and the subtracted (WM-IS and IS-WM) and unsubtracted (IS and WM) cDNA preparations were respectively used as probes to hybridize the macroarrays. Selection of differentially expressed cDNA clones was achieved by comparing signal intensities between the four macroarrays as defined by the following criteria. Positive clones hybridized: 1) more strongly with WM-IS subtracted probes than with WM unsubtracted probes; 2) more weakly with IS-WM subtracted probes than with IS unsubtracted probes; and 3) more strongly with WM-IS subtracted probes than with IS-WM subtracted probes. Representative differential screening results are illustrated in Fig 2.

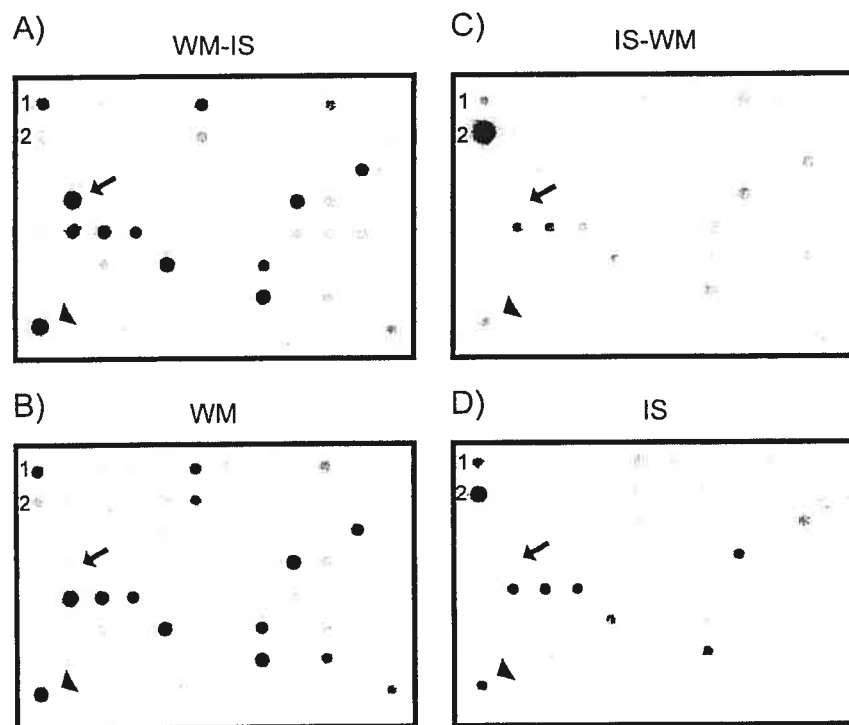


Figure 2 Representative results of differential screening by macroarrays of the WM-IS cDNA library. Four identical sets of membranes were dot-blotted with PCR-amplified cDNA fragments obtained by SSH. Hybridization of macroarrays was then performed with four different probes: A) WM-IS subtracted cDNAs, B) WM unsubtracted cDNAs, C) IS-WM subtracted cDNAs and D) IS unsubtracted cDNAs. The dots in the upper left-hand corner served as internal controls: 1 indicates MMP3 (positive control) and 2 indicates Equ C1 (negative control). Examples of cDNAs that were preferentially expressed in WM compared to IS are indicated by an arrow (NRAS-related gene) and an arrowhead (COL1A2).

Of the initial 950 clones, differential screening identified 405 true positives. Following visualization on agarose gel, 361 clones were deemed of adequate quality to be analyzed by sequencing. Three hundred and fifteen clones ultimately generated satisfactory sequencing results and were matched against GenBank databases. This comparison revealed that 61.9 % (195/315) corresponded to 94 non-redundant known genes, 20.9 % (66/315) corresponded to uncharacterized cDNAs (BAC or EST clones) of which 47 were non-redundant, and 17.2 % (55/315) corresponded to novel

sequences of which 41 were non-redundant (Fig 3). Table 1 lists all the compared sequences, the known genes, the uncharacterized and the novel sequences, as well as their frequency of identification during the differential screening. Furthermore, among the 125 known genes, 31 (24.8%) have already been documented in dermal wound repair, 8 (6.4%) have been reported in tissue repair, not necessarily specific to skin, while the expression of 86 (68.8%) has not previously been described during wound repair (Fig 3).

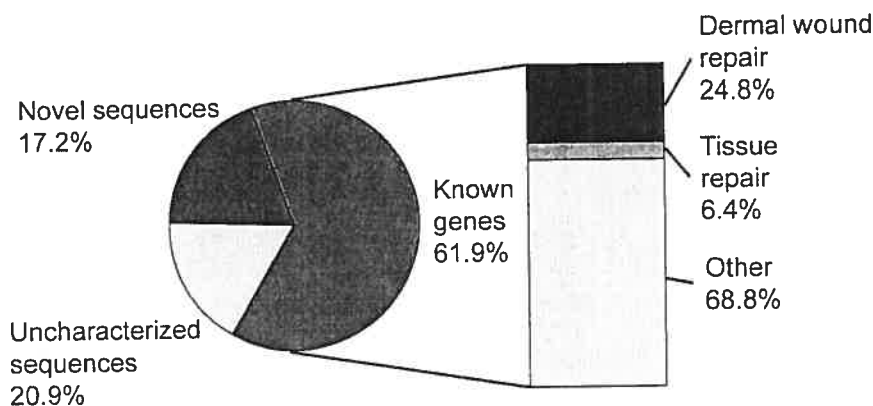


Figure 3 Classification of the sequenced WM-IS cDNA clones

“Known genes” correspond to genes with known sequence and function ($E < e^{-30}$). “Uncharacterized sequences” correspond to genes with known sequence but unknown functions (BAC clones, cDNAs or EST) ($E < e^{-20}$). “Novel sequences” correspond to sequences with no significant match in the GenBank database ($E > e^{-20}$). “Known genes” were further subdivided into three categories; 1) genes whose presence had previously been documented in dermal wound repair; 2) genes whose presence had previously been reported in tissue repair, not necessarily specific to skin; 3) and genes whose presence had not previously been reported during wound repair.

4.3. Gene expression analysis

To confirm that the genes we identified by SSH are differentially expressed between normal intact skin and a seven day-old wound margin, a comparative RT-PCR assay was performed on seven selected genes as described in Table I. For this procedure, cDNAs were generated from total RNA and the number of PCR cycles

was optimized for each gene. All of the genes analyzed in this manner showed a statistically significant increase in seven day-old wound margins compared with normal intact skin (Fig. 4).

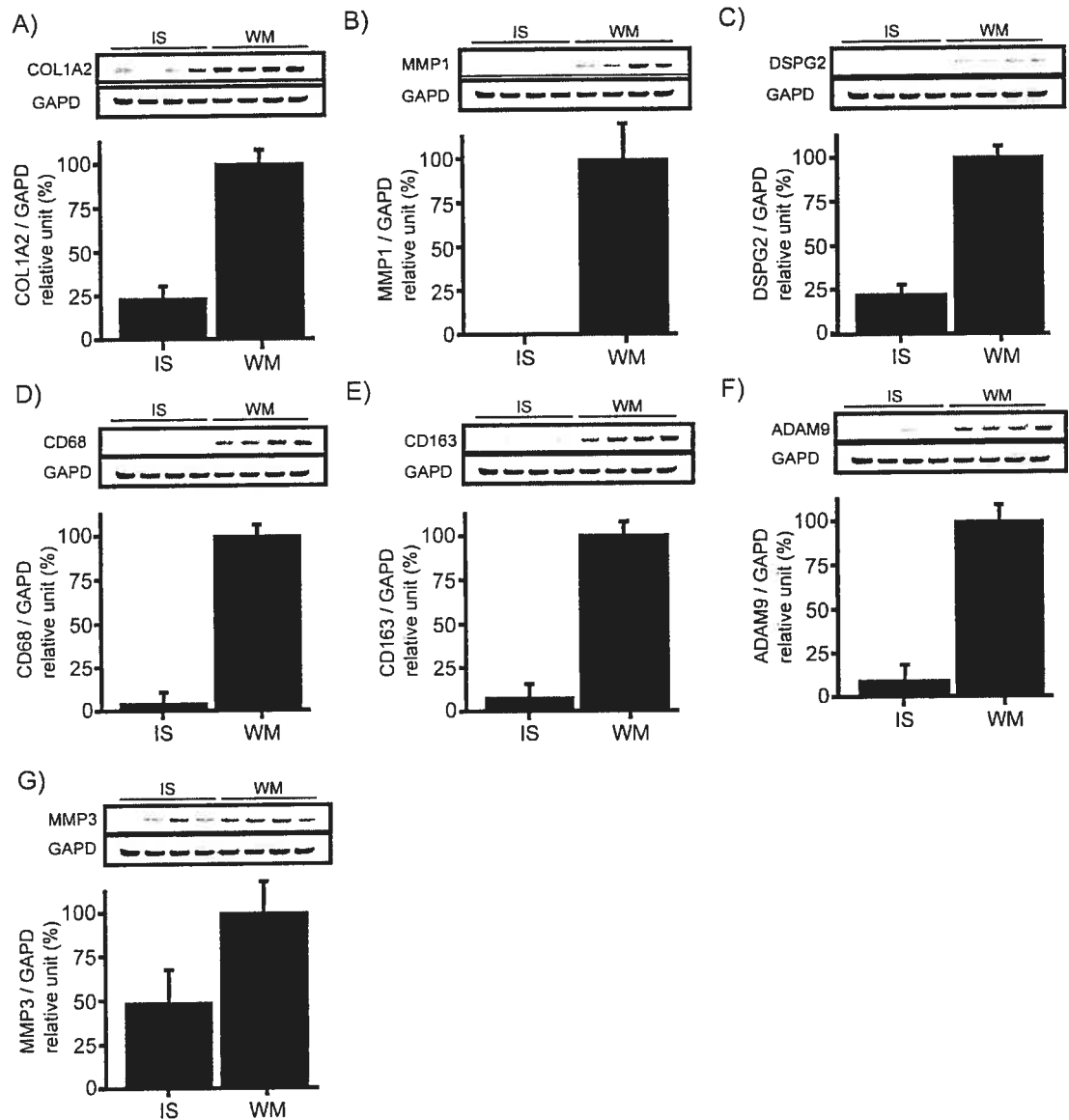


Figure 4

Analysis of mRNA expression by RT-PCR

Total RNA was extracted from IS and from seven day old WM from 4 horses used in the experiments. The precise methodology is described in the *Materials and Methods* section. The control gene, GAPD, showed no significant difference between WM and IS samples. Gene-specific signals were thus normalized with corresponding GAPD mRNA signals for each sample. A) COL1A2 mRNA displayed a 4-fold higher expression level in WM than in IS ($p < 0.001$); B) Expression level of MMP1 mRNA was induced in WM ($p < 0.003$); C) DSPG2 displayed a 5-fold higher expression level in WM than in IS ($p < 0.001$); D) Expression of CD68 mRNA was 25-fold higher in WM than in IS ($p < 0.001$); E) Expression of CD163 mRNA was 14-fold higher in WM than in IS ($p < 0.001$); F) Expression of ADAM9 mRNA was 11-fold higher in WM ($p < 0.003$); and G) Expression of MMP3 mRNA was 2-fold higher in WM than in IS ($p < 0.003$). Probability values were obtained by one-tailed paired t-test analyses. Data are presented as least-square means \pm SEM.

The increase was 4-fold for COL1A2, 5-fold for DSPG2, 25-fold for CD68, 14-fold for CD163, 11-fold for ADAM9 and 2-fold for MMP3, while MMP1 was induced in wound margin compared with intact skin.

Tableau I Identification of cDNA clones found by SSH to be differentially expressed in equine wound margin biopsies (WM) compared to intact skin (IS)

Sequence Identification		Homology		Accession number	% *	Expected value
EST#	Accession number	Freq ‡	Description†			
<i>Sequences coding with known genes</i>						
JLL11-G3	DN625906	1	ABCF2: HS ATP-binding cassette, sub-family F, member 2	BC001661	95	e -129
JLL5-G2	DN625844	1	ACAT2: HS acetyl-coenzyme A acetyltransferase 2	NM_005891	89	e-163
JLL11-H7	DN625902	1	ACTA1: OC alpha smooth muscle actin	X60732	93	e -163
JLL13-E9	DN779256	1	ACTA2: HS actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	NM_001613	93	2e -54
JLL7-B12	DN625865	3	ACTB: BT beta-actin	AY141970	89	9e -38
JLL13-E6	DN625934	1	ACTR2: HS actin-related protein 2 homolog	NM_005722	91	e-175
JLL6-A10	DN625845	2	ADAM9: HS disintegrin and metalloproteinase domain 9	NM_003816	92	0.0
JLL8-G5	DN625878	1	ADAMDEC1: HS ADAM-like, decysin	NM_014479	86	e -101

			1			
JLL13-G5	DN625939	2	ALDH7A1: HS aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1	NM_001182	92	e-168
JLL12-D11	DN625911	2	ADRP: SC adipose differentiation-related protein	AF234676	90	e-101
JLL12-C11	DN625925	1	ANTXR2: HS anthrax toxin receptor 2	BC042596	94	e-129
JLL8-D9	DN625870	2	ANXA2: HS annexin A2	NM_004039	87	2e-46
JLL6-D1	DN625855	2	ARHE: HS ras homolog gene family, member E	BC012513	88	2e-94
JLL13-G6	DN625940	1	ARP1: CF centractin	S45367	93	e-134
JLL5-C3	DN625842	2	ARPC1A: HS actin related protein 2/3 complex, subunit 1A	NM_006409	93	0.0
JLL12-D2	DN625922	1	ATPMB: BT mitochondrial ATP synthase b-subunit	X06088	93	0.0
JLL6-A12	DN625846	1	BAT1: HS HLA-B associated transcript 1	BC000361	91	e-126
JLL12-C9	DN625910	1	C2orf11: HS chromosome 2 open reading frame 11	NM_144629	88	e-138
JLL14-E9	DN625951	1	C6orf130: HS chromosome 6 open reading frame 130	BC021579	89	4e-31
JLL6-H3	DN625853	1	CALU: HS calumenin	NM_001219	94	e-159
JLL7-B3	DN625861	1	CCNT1: CH cyclin T1 gene	AF506747	89	1e-73
JLL13-F7	DN625936	1	CD163: SC putative CD163 antigen	AJ311716	90	1e-95
JLL15-G4	DN625967	1	CD36: BT CD 36 antigen	NM_174010	84	7e-47
JLL8-E4	DN625868	3	CD68: EC macrophage antigen CD68	AY499346	99	0.0
JLL11-E9	DN625898	1	CDC16: HS cell division cycle 16	NM_003903	89	e-141
JLL9-H3	DN625889	1	CDH11: HS cadherin 11, type 2	NM_033664	96	4e-61
JLL8-E9	DN625872	1	CDK4: HS cyclin-dependent kinase 4	BC010153	93	0.0
JLL15-A10	DN625961	1	CLTC: HS clathrin, heavy polypeptide	BC054489	93	0.0
JLL14-H1	DN625945	14	COL1A2: EC collagen, type I, alpha 2	AB070839	98	e-169
JLL13-D6	DN625928	4	COL3A1: HS collagen, type III, alpha 1	NM_000090	87	2e-159
JLL7-E8	DN625866	2	COL5A2: SC collagen, type, V alpha 2	AB097498	93	2e-53
JLL11-G2	DN625900	1	COL6A3: HS collagen, type VI, alpha 3	NM_004369	88	1e-76
JLL7-C7	DN625863	2	CTNNB: SC beta-catenin	AB046171	96	0.0
JLL11-F3	DN625899	1	CTSK: HS cathepsin K	BC016058	81	3e-31
JLL12-F5	DN625914	3	CYFIP1: HS cytoplasmic FMR1 interacting protein 1	BC005097	92	e-138
JLL7-G6	DN625864	1	DDX5: HS DEAD box polypeptide 5	NM_004396	96	0.0
JLL7-A2	DN625860	1	DNCI2: HS dynein, cytoplasmic, light intermediate polypeptide 2	BC022934	90	2e-100
JLL15-C2	DN625960	3	DSPG2: EC dermatan sulfate proteoglycan 2	AF038127	99	0.0
JLL12-E9	DN625912	2	EIF4A2: HS eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	BC012547	94	1e-65
JLL8-D10	DN625874	1	ELOVL1: HS elongation of very long chain fatty acids-like 1	BC000618	93	2e-46

JLL9-A9	DN625882	1	EPO4: HS for likely ortholog of mouse immediate early response, erythropoietin 4	BC021102	86	5e -70
JLL14-C10	DN625954	1	FGF-7: OA fibroblast growth factor-7	AF239241	87	2e -78
JLL9-F11	DN625886	3	FTH: EC ferritin heavy chain	AY112742	94	e -176
JLL15-F12	DN625959	1	FTL: EC ferritin light chain	D14523	98	e -116
JLL11-C11	DN625895	1	GPR116: HS G protein-coupled receptor 116	NM_015234	85	3e -75
JLL6-C10	DN625848	1	GPR86: HS G protein-coupled receptor 86	NM_023914	86	e -117
JLL14-H5	DN625957	1	H3.3B: HS H3 histone, family 3B	BC012813	94	1e -46
JLL12-C7	DN625920	1	HLA-DRA: EC (haplotype ELA-DRA(2)-1/1) MHC class II DR-alpha (DRA) gene	L47174	99	e -125
JLL15-H2	DN625958	4	HNOEL iso protein: HS olfactomedin-like 3	BC009920	93	0.0
JLL9-C5	DN625890	1	hnRNP-K: OC heterogenous nuclear ribonucleoprotein K	AJ003024	92	3e -74
JLL15-F5	DN779259	1	IARS: HS isoleucine-tRNA synthetase	NM_013417	90	7e -46
JLL9-E2	DN625884	1	ILF2: HS interleukin enhancer binding factor 2, 45KDa	BC000382	95	5e -49
JLL8-E12	DN625871	1	ITGBL1: HS integrin, beta-like 1	BC036788	92	0.0
JLL14-F3	DN779257	1	ITM1: HS for integral membrane protein 1	BC048348	89	8e -87
JLL12-H7	DN625917	1	K-alpha-1: HS tubulin, alpha, ubiquitous	BC009512	94	2e -45
JLL11-B5	DN625903	1	KPNA1: HS karyopherin alpha 1	NM_002264	89	e -125
JLL6-D11	DN625852	3	LAMR1: HS laminin receptor 1	BC008867	92	e -169
JLL6-C12	DN625849	2	LBP-1a: HS upstream binding protein 1	BC047235	89	e -170
JLL8-H9	DN625879	2	LPC1: EC lipocortin-1	AF544227	100	0.0
JLL11-C2	DN625896	1	LUM: BT lumican	NM_173934	87	3e -47
JLL9-G6	DN625888	1	MEFC2: HS MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C	BC026341	91	e -120
JLL9-G2	DN625887	1	MMP1: EC matrix metalloproteinase 1	AF148882	94	e -129
JLL14-D10	DN625949	1	Mn-SOD: EC manganese superoxide dismutase	AB001639	99	1e -64
JLL14-C11	DN625946	7	MT: EC mitochondrial DNA	X79547	100	0.0
JLL11-H10	DN625905	1	NANB: PN gene for non-A non-B hepatitis-associated microtubular aggregates protein p44	D90034	85	3e -37
JLL8-F2	DN625880	1	NAT1: OC translation repressor NAT1	U76113	97	e -137
JLL14-F2	DN625953	1	NDUFB6: HS NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6	NM_175787	88	4e -57
JLL7-C5	DN625862	1	NUMB: HS numb homolog (Drosophila)	BC033824	87	5e -70
JLL11-B3	DN625894	1	OGT: HS mRNA for O-linked N-acetylglucosamine transferase	AJ315767	92	e -171

JLL13-D8	DN625932	1	OSPL8: HS oxysterol binding protein-like 8	NM_020841	66	2e -73
JLL12-G4	DN625916	1	P5CSL: HS pyrroline-5-carboxylate synthase long form	U76542	92	e -172
JLL11-A12	DN625893	2	PECAM: BPplatelet endothelial cell adhesion molecule-1	D82082	86	5e -61
JLL11-H2	DN625901	1	PHKB: OC phosphorylase kinase beta subunit	M646557	90	2e -79
JLL7-G7	DN625867	1	PIGN: HS phosphatidylinositol glycan, class N	BC028363	88	e -159
JLL11-F2	DN625892	8	PIINP: BT pro-collagen type III	L47641	91	e -170
JLL6-G2	DN625844	1	PIL: HS protease inhibitor 1-like	AF201948	88	2e -57
JLL5-C4	DN625843	1	PREI3: HS preimplantation protein 3	NM_199482	84	3e -59
JLL12-C2	DN625909	1	PRIM2A: HS primase, polypeptide 2A	NM_000947	95	0.0
JLL13-A8	DN625930	1	PRSS23: HS protease, serine, 23	BC001278	92	e -112
JLL12-E6	DN625926	1	PSAP: HS prosaposin	NM_002778	87	6e -73
JLL6-C4	DN625856	1	PSMB1: HS proteasome subunit, beta type, 1	NM_002793	91	3e -44
JLL13-E10	DN625944	1	PSMC3: HS proteasome 26S subunit, ATPase, 3	BC008713	94	5e -83
JLL14-H2	DN625956	1	PSS1: HS phosphatidylserine synthase 1	BC004390	90	6e -31
JLL13-H9	DN625941	1	RhBG: SC Rh type B glycoprotein	AY013261	85	8e -63
JLL9-C6	DN625891	1	RiFI: HS telomere-associated protein RIF1 homolog	NM_018151	84	5e -74
JLL12-F11	DN625913	1	RPL7: EC ribosomal protein L7	AY246730	100	1e -85
JLL13-E12	DN625933	1	SEC24D: HS SEC24 related gene family, member D	NM_0148222	90	e -143
JLL12-G1	DN625907	2	SEPP1: HS selenoprotein P, plasma, 1	BC015875	80	2e -88
JLL13-C12	DN625943	1	SERPINB10: HS serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 10	NM_005024	85	5e -95
JLL13-F9	DN625937	1	SERPINF1: HS serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F, member 1	NM_002615	90	e -103
JLL8-C4	DN625869	1	SLC38A2: HS solute carrier family 38, member 2	BC016909	90	4e -74
JLL8-F7	DN625873	1	SMC1: BT structural maintenance of chromosomes 1	AF072712	92	e -159
JLL6-C7	DN625851	1	SNBPA: HS alpha synuclein binding protein	AB069975	95	0.0
JLL14-D4	DN625955	1	SNX9: HS sorting nexin 9	NM_016224	84	3e -37
JLL12-H9	DN625918	5	SPARC: EC secreted protein, acidic, cystein-rich (osteonectin)	AF115756	100	e -113
JLL12-C3	DN625919	1	SPARCL1: HS SPARC-like 1 (mast9, hevin)	BC033721	92	9e -78
JLL14-A8	DN625948	1	SRP9: CL signal recognition particle 9 protein	M34952	84	2e -32

JLL9-A12	DN625881	2	SRPX: HS sushi-repeat-containing protein, X-linked	BC020684	90	2e -97
JLL12-B2	DN625924	1	SSAT: HS spermidine/spermine N1-acetyltransferase	Z14136	85	6e -88
JLL13-G1	DN625938	1	SSR1: HS signal sequence receptor, alpha	NM_003144	86	3e -56
JLL8-G6	DN625876	1	STX12: HS syntaxin 12	BC046999	83	2e -44
JLL15-A8	DN625966	1	SUPT16H: HS suppressor of Ty 16 homolog	NM_007192	95	2e -88
JLL8-D12	DN625877	1	SYNE2: HS spectrin repeat containing, nuclear envelope 2	NM_015180	81	3e -43
JLL6-B11	DN625847	3	TCF12: HS transcription factor 12	NM_207040	96	0.0
JLL14-A10	DN625947	1	TF: EC transferrin gene	AF140799	95	3e -59
JLL6-C5	DN625850	2	THBS2: HS thrombospondin 2	NM_003247	89	6e -70
JLL15-C1	DN625965	1	TIMP2: HS similar to tissue inhibitor of metalloproteinase 2	BC040445	88	1e -55
JLL15-G9	DN625968	1	TNFAIP1: HS tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	AY065346	88	1e -42
JLL14-F12	DN625952	1	TOP2A: HS topoisomerase	AB009387	95	0.0
JLL9-E6	DN625885	1	TPM4: HS tropomyosin 4	BC037576	90	e -102
JLL15-H4	DN625964	1	TXNDC: HS thioredoxin domain containing	BC016769	85	2e -42
JLL12-G11	DN625915	1	TYRP1: EC tyrosinase-related protein 1	BK000021	94	e -149
JLL6-G6	DN625854	3	UBQLN1: HS ubiquilin 1	BC039294	88	1e -70
JLL13-C5	DN625931	1	UNP: HS ubiquitin specific protease	AB014458	92	e -174
JLL12-B5	DN625908	1	VCL: SC vinculin	AF165172	89	e -131
JLL11-D8	DN625897	1	VNN3: HS vanin 3	NM_018399	85	2e -54
JLL15-E5	DN625962	1	YWHA: HS tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	BC051814	97	1e -90
JLL15-F10	DN625963	1	ZNF207: HS zinc finger protein 207	BC008023	97	e -176
JLL9-D11	DN625883	1	HS Bcl-2-associated transcription factor short	AF249273	95	0.0
JLL12-D10	DN625921	2	HS likely ortholog of mouse Mak3p homolog	BC012731	84	2e -32
JLL13-B6	DN625942	1	HS lung cancer-related protein 8	BC005005	90	1e -46
JLL13-C1	DN625929	3	HS NRAS-related gene	BC017662	96	0.0
JLL6-H6	DN625859	1	HS putative breast adenocarcinoma marker	BC002502	92	e -165
JLL11-F5	DN625904	1	HS translocation T(4:11) of ALL-1 gene to chromosome 4	L04731	87	1e -55
JLL14-E12	DN625950	1	HS WD repeat and SOCS box-containing 1	BC048007	91	e -122

Sequences coding with uncharacterized sequences

JLL12-H4	DN626010	1	HS 3 BAC clone RP11-531F16	AC092953	91	e -112
----------	----------	---	----------------------------	----------	----	--------

JLL14-G7	DN626017	1	HS 12 BAC clone RP11-900F13	AC024941	90	e -128
JLL9-B1	DN779258	3	SC clone RP44-361I24	AC104481	90	2e -73
JLL14-F6	DN626015	1	EC clone CH241-67M21	AC124908	99	e -136
JLL14-H7	DN626018	1	EC clone CH241-137P22	Ac124904	99	4e -46
JLL14-A4	DN626012	1	HS chromosome 1 clone RP11-397P13	AC114402	91	e -168
JLL11-C7	DN626004	1	HS chromosome 5 clone CTC-498M5	AC008541	88	e -114
JLL14-F1	DN626014	1	HS cDNA FLJ41763 fis	AK123757	86	2e -63
JLL9-B9	DN626000	1	HS cDNA FLJ35446 fis	AK092765	90	e -125
JLL11-G7	DN626006	1	HS cDNA FLJ34052 fis	AK091371	88	1e -33
JLL11-H12	DN626008	1	HS cDNA FLJ35315 fis	AK092634	90	2e -51
JLL13-D7	DN626011	1	HS cDNA FLJ13267 fis	AK023329	87	2e -54
JLL9-D5	DN626002	1	HS cDNA FLJ12993 fis	AK023055	93	1e -34
JLL11-G8	DN626021	1	HS cDNA FLJ90697 fis	AK075178	89	e -131
JLL9-A10	DN625999	2	HS mRNA for KIAA0196 gene	D83780	94	0.0
JLL12-C12	DN626009	1	HS mRNA for KIAA0152 gene	D63486	82	5e -39
JLL14-G12	DN626016	1	MM RIKEN cDNA 4833420I20 gene	BC027003	89	e -142
JLL14-G5	DN626019	1	MM adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library	AK076570	91	7e -43
JLL6-E3	DN625996	1	HS hypothetical protein FLJ20171	BC052574	95	e -131
JLL9-C3	DN626001	1	HS hypothetical protein MGC4825	BC002333	90	8e -87
JLL11-C3	DN626003	1	HS hypothetical protein FLJ10375	BC038855	94	3e -27
JLL11-D7	DN626005	1	HS hypothetical protein FLJ21908	NM_024604	93	e -180
JLL11-H5	DN626007	1	HS hypothetical protein FLJ10407	BC003082	91	2e -72
JLL7-A6	DN625997	1	HS DNA sequence	AL929236	92	1e -89
JLL14-A5	DN626013	1	HS DNA sequence	AL158824	86	3e -78
JLL15-A7	DN626020	2	HS DNA sequence	AL138765	83	4e -40
JLL5-A7	DN625969	1	HS Soares fetal liver spleen 1NFLS	BX097361	90	1e -29
JLL11-A11	DN625979	1	HS Soares_fetal_heart_NbHH19W	W93572	84	6e -29
JLL6-D4	DN625857	3	HS Soares placenta Nb2HP	BX104964	93	2e -20
JLL12-H10	DN625927	1	HS Soares melanocyte 2NbHM	H98062	90	4e -26
JLL12-H2	DN625923	1	HS clone 602704037F1 NIH_MGC_15	BG746714	83	6e -27
JLL5-A6	DN625970	2	HS Melton Normalized Human Islet 4 N4-HIS 1	CK820276	87	2e -38
JLL7-H1	DN625972	2	EC Unstimulated peripheral blood leukocytes	CD535673	98	0.0
JLL8-A7	DN625973	1	EC Unstimulated peripheral blood leukocytes	CD535494	98	e -120
JLL12-D7	DN625986	1	EC Unstimulated peripheral blood leukocytes	CD464172	100	3e -34
JLL11-C6	DN625984	1	EC Stimulated peripheral blood leukocytes	CD468324	93	9e -61
JLL9-H6	DN625978	1	EC Stimulated peripheral blood leukocytes	CD469071	98	0.0
JLL8-F8	DN625976	1	EC Stimulated peripheral blood leukocytes	CD468948	98	0.0

JLL13-B4	DN625990	1	EC Stimulated leukocytes	peripheral blood	CD469425	93	4e -43
JLL12-D8	DN625987	1	EC Stimulated leucocytes	peripheral blood	CD468959	99	e -103
JLL13-G4	DN625992	1	EC Stimulated leukocytes	peripheral blood	CD467436	98	e -106
JLL8-C3	DN625974	4	EC Liver		BM780857	99	e -142
JLL8-F5	DN625975	1	EC Monocytes		BM735053	97	e -103
JLL11-H4	DN625981	1	EC Monocytes		BM735591	100	1e -61
JLL12-B9	DN625985	1	EC Monocytes		BI961510	97	e -144
JLL14-E10	DN625995	1	EC Monocytes		BM735517	93	2e -43
JLL13-G9	DN625991	1	BT 4095638 BARC 10BOV		CK955664	87	8e -29
JLL9-C11	DN625977	1	BT 4113410 BARC 9BOV		Ck981340	86	1e -30
JLL11-H9	DN625982	1	SC adipocyte		AU055628	89	1e -21
JLL12-F12	DN625988	2	SC 880153 MARC 4PIG		CF791799	81	4e -30
JLL11-D12	DN625980	1	SC 938741 MARC 4PIG		CK467438	82	5e -21
JLL8-G2	DN625875	1	SC 935960 MARC 4PIG		CK464903	98	4e -31
JLL11-G9	DN625983	1	EC Horse Lambda Zap Express Library Equus caballus cDNA 5'		AW261090	96	1e -33
JLL14-D7	DN625993	1	CF Canine heart normalized cDNA Library in pBluescript		CF410349	94	8e -29
JLL14-C9	DN625994	1	EC Mesenteric lymph node (MLN1)		BM780943	97	1e -75

Novel sequences

JLL6-G10	CX135784	3		No match
JLL9-C7	CX135763	2		No match
JLL6-D7	CX135793	2		No match
JLL7-D5	CX135779	2		No match
JLL9-G4	CX135783	2		No match
JLL13-F3	CX135766	2		No match
JLL11-G5	CX135762	1		No match
JLL11-F9	CX135764	1		No match
JLL15-B11	CX135765	1		No match
JLL14-G3	CX135767	1		No match
JLL12-C4	CX135768	1		No match
JLL11-A5	CX135769	1		No match
JLL13-H4	CX135770	1		No match
JLL13-H11	CX135771	1		No match
JLL11-A10	CX135772	1		No match
JLL12-A10	CX135773	1		No match
JLL11-D2	CX135774	1		No match
JLL5-E6	CX135775	1		No match
JLL9-A3	CX135776	1		No match
JLL7-A3	CX135777	1		No match
JLL13-G7	CX135778	1		No match
JLL13-C4	CX135780	1		No match

JLL13-B5	CX135781	1	No match
JLL14-C3	CX135782	1	No match
JLL12-G8	CX135785	1	No match
JLL14-G1	CX135786	1	No match
JLL5-H9	CX135787	1	No match
JLL14-D6	CX135788	1	No match
JLL6-F11	CX135789	1	No match
JLL13-B11	CX135790	1	No match
JLL12-A9	CX135791	1	No match
JLL12-A3	CX135792	1	No match
JLL14-D11	CX135794	1	No match
JLL12-H5	CX135795	1	No match
JLL12-D6	CX135796	1	No match
JLL6-B6	CX135797	1	No match
JLL8-G12	CX135798	1	No match
JLL13-D5	CX135799	1	No match
JLL7-B11	CX135800	1	No match
JLL9-H9	CX135801	1	No match
JLL9-B6	CX135802	1	No match
JLL9-H11	CX135803	1	No match
JLL15-B9	CX135804	1	No match
JLL11-F12	CX135805	1	No match
JLL8-F11	CX135806	1	No match
JLL11-C9	CX135807	1	No match
JLL5-H8	CX135808	1	No match

‡Frequency of cDNA clone identification from macroarray analyses of WM-IS subtracted library.

†HS: Homo sapiens; OC: Oryctolagus cuniculus; BT: Bos taurus; SC: Sus crofa; CF: Canis familiaris; CH: Capra hircus; EC: Equus caballus; OA: Ovis aries; PT: Pan troglodytes; BP: Bos primigenius; CL: Canis lupus; BAC: bacterial artificial chromosome; MM: Mus musculus

*Identity represents percent homology estimates of equine cDNA fragments with nucleotide sequences in GenBank (NR or EST) via BLAST search

5. Discussion

Disruption in the regulation of gene transcription might favor the development of chronic indolent wounds or fibroproliferative disorders such as “proud flesh” in the

horse. Characterization of the specific genes regulating the proliferative phase of repair should provide valuable information about processes such as angiogenesis, fibroplasia and epithelialization. Although some key genes are already known, it is clear that many more remain to be identified.

Our biopsies contained multiple distinct cell types which rendered data interpretation challenging, however, as the interaction between these cells is central to repair we deemed it crucial to investigate wound margin samples rather than isolated cells in culture. Because several of the basic events controlling wound repair at the gene level remain obscure, we elected to use SSH rather than more conventional molecular approaches which target candidate genes.

Of the high throughput molecular techniques currently available, cDNA microarrays are very efficient as they allow to determine the simultaneous expression of thousands of genes. However, gene identification is limited to those present on the microarray, precluding the discovery of new genes. Additionally, at the onset of our study, equine-specific microarrays had not yet been developed (20). An added benefit of SSH over cDNA microarray technology is that PCR amplification of the cDNA pools prior to hybridization enables SSH to be performed with limited quantities of mRNA, a significant advantage when attempting RNA extraction from tough horse skin.

To verify the differential expression of genes identified by SSH, an RT-PCR assay compared the expression of specific genes in normal intact skin and in seven day-old wound biopsies. These genes were selected according to the availability of equine-specific primers as well as their redundancy of expression, their oligonucleotide sequence and their role. Three had a previously described role in dermal wound repair [COL1A2 (65, 61); DSPG2 (5); MMP1 (65, 74, 61)] while the others were not known to be expressed in healing dermal wounds (CD68; CD163; ADAM9). All six genes showed a statistically significant increase in wound margins compared with normal intact skin, validating both the model and the techniques. Additionally, we identified nine other genes which had previously been detected in seven day old wounds in other species: COL1A2 (61); MMP1 (61); TIMP2 (65); COL6A3 (48); secreted protein acidic cystein rich (SPARC) (53); FGF-7 (76);

annexin A2 (ANXA2) (44); laminin receptor (LAMR)1 (49); and beta-actin (ACTB) (4). Their identification further corroborates our methodology.

The COL1A2 gene codes for the pro- α 2 chain of type I pro-collagen. While collagen is essential to the structural integrity and mechanical strength of tissues, its abnormal accumulation results in fibrosis. During wound repair, collagen participates in wound contraction via cross-linking and regulates cytokine activity through specific binding. Cytokines, in particular transforming growth factor-beta (TGF- β), can stimulate collagen type I synthesis by fibroblasts (23). Collagen type I α 2 mRNA is expressed in equine dermal wounds seven days following trauma (61). The protein has been shown to accumulate to a greater extent and in a disorganized manner in horse wounds that are predisposed to excessive scarring (78, 61). In the present study, screening of our WM-IS subtracted cDNA library identified the COL1A2 gene 14 times.

Dermatan sulfate proteoglycans (DSPG)s play a significant role in tissue development and assembly, as well as participating in direct and indirect signaling and modulating the cellular response to growth factors (18). For example, DSPGs are thought to increase growth factor-mediated fibroblast migration and proliferation (15). Dermatan sulfate proteoglycan 2 (DSPG2) was previously identified in dermal wound repair seven days following trauma (5) and was found twice in the current study. Since "proud flesh" is characterized by an increased density of dermal fibroblasts, it might be interesting to study the implication of DSPG2 in limb wounds predisposed to excessive scarring.

Matrix metalloproteinase 1 is critical to wound repair as it is one of only three collagenases able to degrade interstitial collagens. Reduced expression of MMP1 retards such important processes as cell migration, angiogenesis and tissue remodeling, thus slowing the repair process. A study defining the pattern of change during the repair of skin wounds in pigs reported no detectable mRNA for MMP1 in intact skin, however by 24 hours post-wounding levels peaked then progressively declined until day 35 (74). In the present study, screening of the WM-IS cDNA library confirmed the presence of MMP1 in seven day old body wounds in horses. Defective collagenolysis is a feature of hypertrophic scars and keloids in man and

excess TGF- β , which inhibits ECM turnover by concurrently inducing TIMP and reducing MMP expression, has been incriminated. While TGF- β mRNA and protein levels persist over time in repairing equine limb versus body wounds (61, 69), a recent study documented a significantly greater amount of MMP1 mRNA in body than in leg skin of horses prior to wounding, however this difference in gene expression disappeared seven days following trauma (61). These data are unexpected, as it could be anticipated that wounds of the horse limb, predisposed to excessive fibroplasia, would display reduced levels of MMPs during the proliferative phase of repair. We plan to verify this data using SSH to compare biopsies from seven day old body and leg wounds in horses.

While CD68, CD163 and ADAM9 have not specifically been associated with the repair of skin wounds, these genes are known to regulate certain responses to trauma. Human CD68 and its mouse homolog macrosialin are trans-membrane proteins found almost exclusively in macrophages and macrophage-like cells (27). Although the exact function of CD68/macrosialin proteins remains to be elucidated, in practice CD68 is often used to evaluate the importance of monocytes/macrophages in tissues (22). We report an increase in CD68 expression in seven-day wound margin biopsies compared to intact skin, suggesting the presence of monocytes/macrophages in the tissues, previously shown histologically (69). Interestingly, wound repair in the horse is characterized by a weak but protracted inflammatory phase (78), which may perpetuate the release of tissue-damaging lysosomal enzymes as well as mediators such as TGF- β which over-stimulate fibroplasia leading to the formation of exuberant granulation tissue (13). It would be interesting to investigate whether CD68 mRNA is differentially expressed in equine limb wounds predisposed to the development of “proud flesh” versus the normally repairing body wounds investigated herein.

CD163 is exclusively expressed on peripheral blood monocytes and tissue macrophages (32). Binding of haptoglobin-hemoglobin complexes to CD163-bearing cells allows degradation of the ligand and metabolism of heme, which appears to minimize inflammation. Moreover, shedding of CD163 generates substantial amounts of soluble receptor in plasma (43), which actively inhibits lymphocyte proliferation thereby modulating the cells' response to an inflammatory stimulus (71). It has

recently been shown that TGF- β markedly reduces the expression of CD163, via transcriptional regulation (51). The protective effect of CD163 against inflammation may be relevant in wound repair. In the current study we documented a significant increase of CD163 in seven day old wounds compared with intact skin. Interestingly, an increased expression of CD163 was also documented in chemically-induced skin blisters in humans, concomitant with differentiation of blood monocytes into macrophages (50). In view of the prolonged inflammation (78) and persistent expression of TGF- β within repairing equine limb wounds in comparison to body wounds (61, 69), we hypothesize that CD163 gene expression might be diminished in limb wounds in horses.

Meltrin gamma (ADAM9) contains both metalloproteinase and disintegrin domains and is probably implicated in the transition from wound bed provisional matrix to collagenous scar. The disintegrin domain supports integrin-mediated cell adhesion and may thus play a role in regulating cell motility and proliferation. Furthermore, ADAMs have emerged as major sheddases in that they enable release of cell-surface proteins including cytokines, their receptors, and cell adhesion molecules, with a subsequent impact on extracellular signaling (30). The ability of ADAM9 to interact with integrins and ECM proteins as well as play a decisive role in signaling events suggests that it could modulate wound repair (77). Wounds on the limbs of horses may become trapped in the proliferative phase of repair, triggering subsequent delays in wound contraction and epithelialization. Given the roles of ADAM9, a deficiency might impede the replacement of fibronectin by proteoglycans and collagen, sustaining immature granulation tissue within the wound bed. This is a feature of chronic wounds, as are delays in epithelial migration, also a potential effect of insufficient ADAM9. Conversely, excess ADAM9 could stimulate over-proliferation of fibroblasts with attending hypergranulation, characteristic of limb wounds of horses. This might be compounded by the release of certain cytokines, exerting chemotactic and mitogenic effects. It would be interesting to study the spatio-temporal expression of ADAM9 during the proliferative phase of repair in horses, given its likely role in both normal and pathologic repair.

Of the 31 genes previously shown by others to be expressed during dermal repair, nine had been documented specifically seven days following trauma (mentioned above) while the presence of 22 had been shown in dermal wound repair but not specifically during the proliferative phase (Table II).

Table II Classification of the 22 genes previously reported to be present in dermal wound repair but not known to be expressed specifically during the proliferative phase

EST #	Homology - Description	Model	References
<i>coding for cellular proteins</i>			
JLL11-H7	ACTA1 : OC alpha smooth muscle actin	<i>in vivo</i>	61, 59 and 14
JLL13-E9	ACTA2 : HS actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	<i>in vivo</i>	12
JLL13-G6	ARPI : CF centractin	<i>in vivo</i>	12
JLL8-E9	CDK4 : HS cyclin-dependent kinase 4	<i>in vivo</i>	52
JLL14-A8	SRP9 : CL signal recognition particle 9 protein	<i>in vivo</i>	66
JLL14-C11	MT : EC mitochondrial DNA	<i>in vivo</i>	63
JLL13-E6	ACTR2 : HS actin-related protein 2 homolog	<i>in vitro</i>	41
JLL5-C3	ARPC1A : HS actin related protein 2/3 complex, subunit 1A	<i>in vitro</i>	41
JLL15-A10	CLTC : HS clathrin, heavy polypeptide	<i>in vitro</i>	67
JLL7-A2	DNCI2 : HS dynein, cytoplasmic, light intermediate polypeptide 2	<i>in vitro</i>	16 and 80
JLL12-B5	VCL : SC vinculin	<i>in vitro</i>	55 and 7
<i>coding for membrane proteins</i>			
JLL15-G4	CD36 : BT CD 36 antigen	<i>in vivo</i>	64
JLL11-A12	PECAM : BPplatelet endothelial cell adhesion molecule-1	<i>in vivo</i>	19
<i>coding for ECM proteins</i>			
JLL13-D6	COL3A1 : HS collagen, type III, alpha 1	<i>in vivo</i>	59
JLL11-F2	PIIINP : BT pro-collagen type III	<i>in vivo</i>	37 and 33
JLL7-E8	COL5A2 : SC collagen type V alpha 2	<i>in vivo</i>	6
JLL12-G1	SEPP1 : HS selenoprotein P, plasma, 1	<i>in vivo</i>	37
JLL15-C2	DSPG2 : EC dermatan sulfate proteoglycan 2	<i>in vivo</i>	5
JLL6-C5	THBS2 : HS thrombospondin 2	<i>in vivo</i>	2, 35 and 34
<i>coding for cellular and membrane proteins</i>			
JLL7-C7	CTNNB : SC beta-catenin	<i>in vivo</i>	10
<i>coding for serum proteins</i>			
JLL14-A10	TF : EC transferrin gene	<i>in vivo</i>	26
JLL15-H4	TXNDC : HS thioredoxin domain containing	<i>in vivo</i>	1

We also identified eight cDNAs corresponding to genes documented in the repair of bone [cathepsin K (CTSK) (29); calumenin (CALU) (45)], retina [serine proteinase inhibitor, clade F, member 1 (SERPINF1) (68, 60)], cornea [lumican (LUM) (57) and cadherin (CDH)11 (42)], or nervous tissue [prosaposin (PSAP) (21) and lipocortin-1 (LPC1), LUM and ferritin light chain (FTL) (46)].

The remaining 68.8% cDNAs identified by SSH screening had not previously been attributed a role in wound repair. Among these, we believe that spermidine/spermine-N-acetyltransferase (SSAT), serine proteinase inhibitor B10 (SERPINB10) and sorting nexin 9 (SNX9) in particular could be interesting novel candidate genes associated with the proliferative phase of dermal wound repair in horses.

Catabolism of polyamines spermidine and spermine is achieved by the collaborative effort of two enzymes, cytosolic SSAT and a polyamine oxidase (25). Spermidine and spermine appear crucial to the proliferation of mammalian cells via the promotion of cell growth or the induction of apoptosis when they occur in excess (75), while it appears that an activation of polyamine catabolism, via SSAT, is more closely related to an anti-proliferative action (25). It has recently been shown that overexpression of SSAT enhances integrin-mediated migration of leukocytes and epithelial and endothelial cells (11). Thus, SSAT could potentially be involved in cell migration and / or apoptosis, both critical to wound repair. Specifically, it would be interesting to investigate the role of SSAT during angiogenesis and epithelialization, as well as during chronic inflammation when leukocyte migration is excessive and persistent.

The SERPINS are a superfamily of proteins that trap their targets by undergoing a conformational rearrangement in order to protect cells from proteinase-mediated injury. SERPINB10, formerly known as proteinase inhibitor 10 (PI10) or BOMAPIN, belongs to the ovalbumin/serpin clade B and is a competitive inhibitor of thrombin and trypsin. It possesses a 45% amino acid identity with plasminogen activator inhibitor-2, human leukocyte elastase inhibitor, and cytoplasmic antiproteinase (54). It has been attributed a role in the regulation of cell growth or

differentiation, angiogenesis, as well as tumor cell invasiveness. It is thus possible that SERPINB10 is involved in both the inflammatory and proliferative phases of repair, where it may modulate clot formation and/or alter the formation of new blood vessels within granulation tissue.

Sorting nexin 9 belongs to a group of proteins believed to participate in sorting processes in the cell. It has been found to cooperate with activated Cdc42-associated kinase-2 (Ack2) through an interaction occurring between a proline-rich domain of Ack2 and the Src homology 3 domain of SNX9. In mammalian cells, Ack2 interacts with the receptor for EGF, interaction stabilized by SNX9. Upon stimulation with EGF, SNX9 becomes tyrosine-phosphorylated and is suggested to play a role together with Ack2 in the degradation and recycling of the receptor for EGF, leading to reduced levels in cells (38). Since EGF modulates numerous cellular activities during the healing process, depletion of its receptor through the action of SNX9 must be tightly regulated or could lead to aberrant repair including, among others, delays in epithelialization.

It is worthwhile to note that this study profiled gene expression at one specific time-point, while wound repair is a dynamic process. Indeed, one would expect progressive changes in the expression pattern of a gene over time. Future studies have been planned to address this issue; specifically, we intend to map the spatio-temporal expression of selected genes in both normal wounds and those healing aberrantly.

In conclusion, we have succeeded, through the use of SSH, in sketching a partial blueprint of the baseline gene expression profile during the proliferative phase of normal dermal wound repair in horses. It is apparent from this study and others that more genes may be active players in the normal transcriptional response to injury. Although the immediate significance of some gene sequences identified by SSH may not be readily apparent, we did identify several others that are highly expressed after injury and may have an unappreciated role in regulating the proliferative response to wounding. This initial step serves as a precursor to elucidating abnormal genetic responses to trauma in order to eventually predict which wounds may be predisposed to a chronic inflammatory response or excessive

fibroplasia and extensive scarring. Moreover, the data generated herein enables the design of hypothesis-driven studies that will describe the function of key genes in biological processes. Future experiments must correlate changes in mRNA levels for precise molecules with spatio-temporal protein expression within the tissues.

6. References

1. Abdiu A, Nakamura H, Sahaf B, Yodoi J, Holmgren A, and Rosen A. Thioredoxin blood level increases after severe burn injury. *Antioxid Redox Signal* 2: 707-716, 2000.
2. Agah A, Kyriakides TR, Letrondo N, Bjorkblom B, and Bornstein P. Thrombospondin 2 levels are increased in aged mice: consequences for cutaneous wound healing and angiogenesis. *Matrix Biol* 22: 539-547, 2004.
3. Bédard J, Brûlé S, Price CA, Silversides DW, and Lussier JG. Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicles in cattle. *Mol Reprod Dev* 64: 152-165, 2003.
4. Becker JC, Gillitzer R, and Brocker EB. A member of the melanoma antigen-encoding gene (MAGE) family is expressed in human skin during wound healing. *Int J Cancer* 58: 346-348, 1994.
5. Bently JP. Rate of chondroitin sulphate formation in wound healing. *Ann Surg* 165: 186-191, 1967.
6. Betz P, Nerlich A, Wilske J, Tubel J, Penning R, and Eisenmenger W. Analysis of the immunohistochemical localization of collagen type III and V for the time-estimation of human skin wounds. *Int J Legal Med* 105: 329-332, 1993.

7. Boemi L, Allison GM, Graham WP, Krummel TM, and Ehrlich HP. Differences between scar and dermal cultured fibroblasts derived from a patient with recurrent abdominal incision wound herniation. *Plast Reconstr Surg* 104: 1397-1405, 1999.
8. Boyer A, Lussier JG, Sinclair AH, McClive PJ, and Silversides DW. Pre-sertoli specific gene expression profiling reveals differential expression of Ppt1 and Brd3 genes within the mouse genital ridge at the time of sex determination. *Biol Reprod* 73: 820-827 2004.
9. Braun S, Hanselmann C, Gassmann MG, auf dem Keller U, Born-Berclaz C, Chan K, Kan YW, and Werner S. Nrf2, transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Mol Cell Biol* 22: 5492-5505, 2002.
10. Cheon SS, Cheah AYL, Turley S, Nadesan P, Poon R, Clevers H, and Alman BA. β -Catenin stabilization dysregulates mesenchymal cell proliferation, motility, and invasiveness and causes aggressive fibromatosis and hyperplastic cutaneous wounds. *Proc Natl Acad Sci* 99: 6973-6978, 2002.
11. Chen C, Young BA, Coleman CS, Pegg AE, and Sheppard D. Spermidine/spermine N1-acetyltransferase specifically binds to the integrin alpha-9 subunit cytoplasmic domain and enhances cell migration. *J Cell Biol* 167: 161-170, 2004.
12. Cole J, Tsou R, Wallace K, Gibran N, and Isik F. Early gene expression profile of human skin to injury using high-density cDNA microarrays. *Wound Rep Reg* 9: 360-370, 2001.
13. Cotran SC, Kumar V, and Robbins SL. Cellular growth and differentiation: normal regulation and adaptations; Inflammation and repair. In: *Robins Pathologic basis of disease*, edited by Schoen FJ (ed 5). Philadelphia, PA: Saunders; 1994, p. 35-92.

14. Darby I, Skalli O, Gabbianni G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 63: 21-29, 1990.
15. Denholm EM, Cauchon E, Poulin C, and Silver PJ. Inhibition of human dermal fibroblast proliferation by removal of dermatan sulfate. *Eur J Pharmacol* 400: 145-153, 2000.
16. Dujardin DL, Barnhart LE, Stehman SA, Gomes ER, Gundersen GG, and Valle RB. A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *J Cell Biol* 163: 1205-1211, 2003.
17. Fayad T, Lévesque V, Sirois J, Silvesides DW, and Lussier J. Gene expression profiling of differentially expressed genes in granulosa cells of bovine dominant follicles using suppression subtractive hybridization. *Biol Reprod* 70: 523-533, 2004.
18. Fischer JW, Kinsella MG, Levkau B, Clowes AW, and Wight TN. Retroviral overexpression of decorin differentially affects the response of arterial smooth muscle cells to growth factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 777-784, 2001.
19. Galeano M, Altavilla D, Cucinotta D, Russo GT, Calo M, Bitto A, Marini H, Marini R, Adamo EB, Seminara P, Minutoli L, Torre V, and Squadrito F. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 53: 2509-2517, 2004.
20. Gu W and Betone AL. Generation and performance of an equine-specific large-scale gene expression microarray. *Am J Vet Res* 65: 1664-16673, 2004.
21. Hiraiwa M, Liu J, Lu AG, Wang CY, Misasi R, Yamauchi T, Hozumi I, Inuzuka T, and O'Brien JS. Regulation of gene expression in response to brain injury:

enhanced expression and alternative splicing of rat prosaposin (SGP-1) mRNA in injured brain. *J Neurotrauma* 20: 755-765, 2003.

22. Holness CL and Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 81: 1607-1613, 1993.

23. Inagaki Y, Truter S, and Ramirez F. Transforming growth factor- β stimulates $\alpha(2)$ I collagen gene expression through a cis-acting element that contains an Sp1-binding site. *J Biol Chem* 269: 14828-14834, 1994.

24. Jacobs KA, Leach DH, Fretz PB, and Townsend HGG. Comparative aspects of the healing of excisional wounds on the leg and body of horses. *Vet Surg* 13: 83-90, 1984.

25. Janne J, Alhonen L, Pietila M, and Keinanen TA. Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. *Eur J Biochem* 271: 877-894, 2004.

26. Jeschke MG, Herndon DN, Wolf SE, DebRoy MA, Rai J, Thompson JC, and Barrow RE. Hepatocyte growth factor modulates the hepatic acute-phase response in thermally injured rats. *Crit Care Med* 28: 504-510, 2000.

27. Jiang Z, Shih DM, Xia YR, Lusi AJ, de Beer FC, de Villiers WJ, van der Westhuyzen DR, and de Beer MC. Structure, organization, and chromosomal mapping of the gene encoding macrosialin, a macrophage-restricted protein. *Genomics*. 50: 199-205, 1998.

28. JMP. Software for statistical visualisation on the Apple McIntosh. Version 2. SAS Institute Inc. Cary, NC; 1989.

29. Kawana F, Sawae Y, Sahara T, Tanaka S, Debari K, Shimizu M, and Sasaki T. Porcine enamel matrix derivative enhances trabecular bone regeneration during wound healing of injured rat femur. *Anat Rec* 264: 438-446, 2001.
30. Kheradmand F and Werb Z. Shedding light on sheddases: role in growth and development. *Bioessays* 24: 8-12, 2002.
31. Knottenbelt DC. Equine wound management: are there significant differences in healing at different sites on the body? *Vet Dermatol* 8: 273-290, 1997.
32. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SKA, and Moestrup SK. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409: 198-201, 2001.
33. Kurkinen M, Vaheri A, Roberts PJ, and Stenman S. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab Invest* 43: 47-51, 1980.
34. Kyriakides TR, Tam JW, and Bornstein P. Accelerated wound healing in mice with a disruption of the thrombospondin 2 gene. *J Invest Dermatol* 113: 782-787, 1999.
35. Kyriakides TR, Zhu YH, Yang Z, Huynh G, and Bornstein P. Altered extracellular matrix remodelling and angiogenesis in sponge granulomas of thrombospondin 2-null mice. *Am J Pathol* 159: 1255-1262, 2001.
36. Lévesque V, Fayad T, Ndiaye K, Nahé Diouf M, and Lussier JG. Size-selection of cDNA libraries for the cloning of cDNAs after suppression subtractive hybridization. *Biotechniques* 35: 72-78, 2003.

37. Li X, Mohan S, Gu W, and Baylink DJ. Analysis of gene expression in the wound repair/regeneration process. *Mamm Genome* 12: 52-59, 2001.
38. Lin Q, Lo CG, Cerione RA, and Yang W. The Cdc42 Target ACK2 interacts with sorting nexin 9 (SH3PX1) to regulate epidermal growth factor receptor degradation. *J Biol Chem* 277: 10134–10138, 2002.
39. Liu M, Warn JD, Fan Q, and Smith PG. Relationships between nerves and myofibroblasts during cutaneous wound healing in the developing rat. *Cell Tissue Res* 297: 423-33, 1999.
40. Madlener M, Parks WC, and Werner S. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. *Exp Cell Res* 242: 201-210, 1998.
41. Magdalena J, Millard TH, Etienne-Manneville S, Launay S, Waraick HK, and Machesky LM. Involvement of the Arp2/3 complex and Scar2 in golgi polarity in scratch wound models. *Mol Biol Cell* 14: 670-84, 2003.
42. Masur SK, Conors RJ Jr, Cheung JK, and Antohi S. Matrix adhesion characteristics of corneal myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 904-910, 1999.
43. Moller HJ, Peterslund NA, Graversen JH, and Moestrup SK. Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein plasma. *Blood* 99: 378-380, 2002.
44. Munz B, Gerke V, Gillitzer R, and Werner S. Differential expression of the calpactin I subunits annexin II and p11 cultured keratinocytes and during wound repair. *J Invest Dermatol* 108: 307-312, 1997.

45. Nakazawa T, Nakajima A, Seki N, Okawa A, Kato M, Moriya H, Amizuka N, Einhorn TA, and Yamazaki M. Gene expression of periostin in the early stage of fracture healing detected by cDNA microarray analysis. *J Orthop Res* 22: 520-525, 2004.
46. Natale JE, Ahmed F, Cernak I, Stoica B, and Faden AI. Gene expression profile changes are commonly modulated across models and species after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 20: 907-927, 2003.
47. Okada A, Tomasetto C, Lutz Y, Bellocq JP, Rio MC, and Basset P. Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing: evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A. *J Cell Biol* 137: 67-77, 1997.
48. Oono T, Specks U, Eckes B, Majewski S, Hunzelmann N, Timpl R, and Krieg T. Expression of type VI collagen mRNA during wound healing. *J Invest Dermatol* 100: 329-334, 1993.
49. Pedersen TX, Leethanakul C, Patel V, Mitola D, Lund LR, Dano K, Johnsen M, Gutkind S, and Bugge T. Laser capture microdissection-based *in vivo* genomic profiling of wound keratinocytes identifies similarities and differences to squamous cell carcinoma. *Oncogene* 22: 3964-3976, 2003.
50. Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO, and Landis RC. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: anti-inflammatory monocyte-macrophage responses *in vitro*, in resolving skin blisters *in vivo*, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res* 94: 119-126, 2003.
51. Pioli PA, Goonan KE, Wardell K, and Guyre PM. TGF-beta regulation of human scavenger receptor CD163 is Smad3-dependent. *J Leukoc Biol* 76: 500-508, 2004.

52. Qu J, Cheng T, Shi C, Lin Y, Yan G, Ran X. Reduced presence of tissue-repairing cells in wounds combined with whole-body irradiation injury is associated with both suppression of proliferation and increased apoptosis. *Med Sci Monit* 9: 370-377, 2003.
53. Reed MJ, Puolakkainen P, Lane TF, Dickerson D, Bornstein P, and Sage EH. Differential expression of SPARC and thrombospondin I in wound repair: immunolocalization and *in situ* hybridization. *J Histochem Cytochem* 41: 1467-1477, 1993.
54. Riewald M and Schleef RR. Molecular cloning of bomapin (protease inhibitor 10), a novel human serpin that is expressed specifically in the bone marrow. *J Biol Chem* 270: 26754-26757, 1995.
55. Rilla K, Lammi MJ, Sironen R, Torrone K, Luukkonen M, Hascall VC, Midura RJ, Hyttinen M, Pelkonen J, Tammi M, and Tammi R. Changed lamellipodial extension, adhesion plaques and migration in epidermal keratinocytes containing constitutively expressed sense and antisense hyaluronan synthase 2 (HAS2) genes. *J Cell Sci* 115: 3633-3643, 2002.
56. Russell SB, Trupin JS, Myers JC, Broquist AH, Smith JC, Myles MDE, and Russell JD. Differential glucocorticoid regulation of collagen mRNAs in human dermal fibroblasts. Keloid-derived and fetal fibroblasts are refractory to down-regulation. *J Biol Chem* 264: 13730-13735, 1989.
57. Saika S, Shiraishi A, Liu CY, Funderburgh JL, Kao CW, Converse RL, and Kao WW. Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing. *J Biol Chem* 275: 2607-2612, 2000.

58. Sambrook J and Russell DW. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (3rd ed) New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
59. Scharffetter K, Stolz W, Lankat-Buttgereit B, Mauch C, Kulozik M, and Krieg TH. *In situ* hybridization - a useful tool for studies on collagen expression in cell culture as well as in normal and altered tissue. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 56: 299-306, 1989.
60. Schlingemann RO. Role of growth factors and the wound healing response in aged-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242: 91-101, 2004.
61. Schwartz AJ, Wilson DA, Keegan KG, Ganjam VK, Sun Y, Weber KT, and 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* 63: 1564-1570, 2002.
62. Si Z, Bhardwaj R, Rosch R, Mertens PR, Klosterhalfen B, Klinge U, Rhanjit B, and Rene PM. Impaired balance of type I and type III procollagen mRNA in cultured fibroblasts of patients with incisional hernia. *Surgery* 131: 324-331, 2002.
63. Silaeva SA, Khatsernova BIa, Berchenko GN, Nikolaev AIa, Shekhter AB. Dynamics of nucleic acid synthesis in the granulation tissue of skin wounds in the rat. *Vopr Med Khim* 32: 126-131, 1986.
64. Simon M Jr, Juhasz I, Herlyn M, and Hunyadi J. Thrombospondin receptor (CD36) expression of human keratinocytes during wound healing in a SCID mouse/human skin repair model. *J Dermatol* 23: 305-309, 1996.

65. Soo C, Shaw W, Zhang X, Longaker M, Howard E, and Ting K. Differential expression of matrix metalloproteinase and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair. *Plast Reconstr Surg* 105: 638-647, 2000.
66. Soo C, Sayah DN, Zhang X, Beanes SR, Nishimura I, Dang C, Freymiller E, and Ting K. The identification of novel wound-healing genes through differential display. *Plast Reconstr Surg* 110: 787-797, 2002.
67. Spradling KD, McDaniel AE, Lohi J, and Pilcher BK. Epsin 3 is a novel extracellular matrix-induced transcript specific to wounded epithelia. *J Biol Chem* 276: 29257-29267, 2001.
68. Stitt AW, Graham D, and Gardiner TA. Ocular wounding prevents pre-retinal neovascularization and upregulates PEDF expression in the inner retina. *Mol Vis* 28: 432-438, 2004.
69. Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, and 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* 30: 269-277, 2001.
70. Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, and Gordon JR. Preliminary observations on expression of transforming growth factors β_1 and β_3 in equine full-thickness skin wounds healing normally or with exuberant granulation tissue. *Vet Surg* 31: 266-273, 2002.
71. Timmermann M, Buck F, Sorg C, and Hogger P. Interaction of soluble CD163 with activated T lymphocytes involves its association with non-muscle myosin heavy chain type A. *Immunol Cell Biol* 82: 479-487, 2004.

72. Trengrove NJ, Stacey MC, MacAuley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, Murphy G, and Schultz G. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Rep Reg* 7: 442-452, 1999.
73. van den Boom R, Wilmink JM, O'Kane S, Wood J, and Ferguson MW. Transforming growth factor-beta levels during second-intention healing are related to the different course of wound contraction in horses and ponies. *Wound Rep Reg* 10:188-194, 2002.
74. Wang JF, Olson ME, Reno CR, Kulyk W, Wright JB, and Hart DA. Molecular and cell biology of skin wound healing in a pig model. *Connect Tissue Res* 41: 195-211, 2000.
75. Wallace HM, Fraser AV, and Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem* 376: 1-14, 2003.
76. Werner S, Peters KG, Longaker MT, Fuller-Pace F, Banda MJ, and Williams LT. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6896-6900, 1992.
77. White JM. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol* 15: 598-606, 2003.
78. Wilmink JM, van Weeren PR, Stolk PW, van Mil FN, and Barneveld A. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. *Equine Vet J* 31: 61-67, 1999.

79. Wilmink JM, Veenman JN, van den Boom R, Rutten VP, Niewold TA, Broekhuisen-Davies JM, Lees R, Armstrong S, van Weeren PR, and Barneveld A. Differences in polymorphonucleocyte function and local inflammatory response between horses and ponies. *Equine Vet J* 35: 561-569, 2003.

80. Yvon AM, Walker JW, Danowski B, Fagerstrom C, Khodjakov A, and Wadsworth P. Centrosome reorientation in wound-edge cells is cell type specific. *Mol Biol Cell* 13: 1871-1880, 2002.

Discussion générale

La guérison tissulaire chez les mammifères est un processus complexe dont le contrôle temporel dépend de l'activation et de la désactivation de plusieurs gènes. Une perturbation de la transcription génique pourrait favoriser le développement de plaies chroniques ou de désordres fibroprolifératifs. Les blessures situées sur l'aspect distal du membre du cheval sont particulièrement prédisposées au désordre fibroprolifératif nommé « bouton de chair », qui implique une production exubérante de tissu de granulation. Ce dernier inhibe les phases subséquentes de la guérison et mène à la cicatrisation excessive. La caractérisation des gènes régulant la phase proliférative de la guérison fournirait des renseignements précieux sur les événements compris dans cette phase tel l'angiogénèse, la fibroplasie et la réépithélialisation. Bien que certains de ces gènes soient déjà connus, plusieurs autres demeurent à ce jour inconnus.

Dans cette étude nous avons utilisé la technique de HSS afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés dans les tissus lors de la guérison normale, dans le but de clarifier le contrôle moléculaire de ce processus. Puisque l'interaction entre les différents types cellulaires est essentielle au bon déroulement de la guérison, nous avons jugé nécessaire d'étudier les échantillons de bord de plaie plutôt qu'un seul type cellulaire en culture, malgré que cela compliquait l'interprétation des données. De plus, comme plusieurs événements impliqués dans le contrôle génique de la guérison demeurent obscurs, nous avons préconisé l'utilisation du HSS plutôt que des techniques de biologie moléculaire plus conventionnelles qui ciblent des gènes connus et auxquelles échappent leurs homologues anonymes. En effet, le HSS permet la découverte de nouveaux gènes, et, comparativement aux méthodes traditionnelles comme l'hybridation Northern ou *in situ* qui favorisent le concept « un gène:une expérience », le HSS permet l'étude simultanée de nombreux gènes.

Parmi les techniques qui étudient un large éventail de gènes lors d'une seule expérience, les micro-réseaux d'ADNc sont très efficaces puisqu'ils permettent de déterminer l'expression concomitante de milliers de gènes. Cependant,

l'identification des gènes se limite à ceux présents sur le micro-réseau, ce qui écarte la possibilité d'en découvrir de nouveaux. De plus, lors du lancement de notre étude, les micro-réseaux spécifiques à l'espèce équine n'étaient pas commercialement disponibles (Gu et Bertone, 2004). Un autre avantage du HSS comparativement au micro-réseau d'ADNc est que l'amplification par PCR des pools d'ADNc avant l'étape d'hybridation diminue la quantité d'ARNm requise pour le HSS. Comme il est difficile d'extraire l'ARNm provenant de la peau de cheval, c'est un atout non-négligeable.

En plus d'identifier simultanément les gènes sur- (WM-IS) et sous-exprimés (IS-WM), le HSS présente d'autres avantages par rapport aux techniques alternatives. Par exemple, le HSS favorise la détection de gènes ayant une expression différentielle marquée (augmentée plus de 5 fois) entre les échantillons, puis, une étape d'hybridation normalise l'abondance des séquences durant le processus de soustraction, assurant une représentation égale des séquences rares. Malgré ses nombreux avantages le HSS possède aussi ses limites. En effet, certains gènes répertoriés comme ayant une expression différentielle lors de la guérison cutanée peuvent ne pas avoir été identifiés. Les raisons précises de ce phénomène sont méconnues, par contre plusieurs hypothèses existent. Pour un gène donné, ceci pourrait résulter de: 1) la faible différence d'expression entre la peau normale et la plaie; 2) un faible niveau d'expression; 3) les limites de détection du criblage différentiel; ou 4) le nombre limitant de clones sélectionnés. Lors de notre étude, nous avons porté un intérêt particulier aux deux dernières possibilités. Nous avons, en effet, sélectionné un nombre important de clones, soit 960, et nous avons développé deux films par macroréseaux, soit un exposé normalement et un deuxième sur-exposé afin de détecter les clones positifs ayant un signal d'une intensité plus faible.

Afin de confirmer le patron d'expression génique différentielle identifiée à l'aide du HSS, une analyse par RT-PCR a comparé l'expression de certains gènes dans les biopsies IS et WM. Ces gènes ont été sélectionnés selon la disponibilité de leur séquence équine, leur redondance d'expression, ainsi que leur implication lors du processus de guérison. Trois avaient déjà été impliqués lors de la guérison cutanée

[COL1A2 (Soo et coll., 2000; Schwartz et coll., 2002); DSPG2 (Bentley, 1967); MMP1 (Soo et coll., 2000; Wang et coll., 2000; Schwartz et coll., 2002)], tandis que les trois autres n'avaient pas de rôle connu dans ce processus (CD68, CD163, ADAM9). Les six gènes ainsi analysés ont démontré une augmentation statistiquement significative dans les bords de plaies comparativement à la peau non-lésée, validant de manière intrinsèque le modèle et les techniques d'analyses de cette étude. De plus, nous avons identifié neuf autres gènes dont la sur-expression avait préalablement été rapportée sept jours suivant un trauma cutané chez d'autres espèces: COL1A2 (Schwartz et coll., 2002); MMP1 (Schwartz et coll., 2002); TIMP2 (Soo et coll., 2000); COL6A3 (Oono et coll., 1993); secreted protein acidic cystein rich (SPARC) (Reed et coll., 1993); FGF-7 (Werner et coll., 1992); ANXA2 (Munz et coll., 1997); laminin receptor (LAMR)1 (Pedersen et coll., 2003); and beta-actin (ACTB) (Becker et coll., 1994). Ces gènes permettent de valider notre étude par rapport à différents modèles et techniques moléculaires utilisés auparavant.

Le gène COL1A2 code pour le pro-collagène type I pro- α 2. Le collagène type I est la protéine la plus abondante de la MEC chez les vertébrés. Cette dernière est essentielle à l'intégrité ainsi qu'à la force tensile des tissus, or une trop forte accumulation peut conduire à la fibrose. Pendant la guérison, le collagène type I régule l'activité cellulaire en se liant aux membranes cellulaires via les intégrines, participe à la contraction de plaie via sa polymérisation et contrôle l'activité des cytokines. Diverses molécules solubles, en particulier les cytokines et les facteurs de croissance, notamment TGF- β , peuvent stimuler la synthèse du collagène type I par les fibroblastes (Inagaki et coll., 1994). L'ARNm du COL1A2 est exprimé dans les plaies cutanées chez le cheval sept jours suite au trauma (Schwartz et coll., 2002). Il a également été démontré que la protéine s'accumule en plus grande quantité et de façon désordonnée dans les plaies du cheval qui sont sujettes à la cicatrisation excessive (Wilmink et coll., 1999b; Schwartz et coll., 2002). Dans l'étude actuelle, le criblage de notre librairie soustraite de WM-IS a identifié 14 fois le gène COL1A2.

Les protéoglycans dermatan sulfate jouent un rôle prépondérant dans le développement et l'assemblage des tissus, mais aussi dans la signalisation et la modulation directe et indirecte de la réponse cellulaire aux facteurs de croissance

(Fisher et coll., 2001). Ils interagissent avec la fibronectine et la laminine (Gallo et coll., 1996), et sont impliqués dans l'organisation des composants de la MEC et de la membrane basale aussi bien que dans l'architecture des fibrilles collagéniques (Gallo et coll., 1996). Spécifiquement, les DSPGs contribuent de façon considérable à la fibrillogénèse du collagène et par le fait même influencent la force et l'élasticité de la peau (Reed et coll., 2003). Il est intéressant de noter que les DSPGs semblent augmenter la liaison des facteurs de croissance, puis, la migration et la prolifération des fibroblastes régit par ces derniers (Denholm et coll., 2000; Clark et coll., 2004). Le DSPG2 a préalablement été identifié lors du processus de guérison cutanée, sept jours après le trauma (Bentley, 1967), et a été décelé deux fois dans l'étude actuelle. Comme le « bouton de chair » du cheval est caractérisé par une densité accrue de fibroblastes dermiques, il serait intéressant d'étudier l'implication de DSPG2 dans les plaies prédisposées à ce type de cicatrisation excessive.

La MMP1, à titre de collagénase pouvant dégrader le collagène interstitiel de types I, II et III, est essentielle au bon déroulement du processus de guérison. En effet, une diminution de son expression retarde des phénomènes importants tels la migration cellulaire, l'angiogénèse et le remodelage tissulaire. Une étude décrivant le profil moléculaire de la guérison dermique chez le porc a démontré qu'il n'y avait pas d'expression constitutive d'ARNm pour MMP1 dans la peau non-lésée, mais que 24 h suivant la création de plaies les niveaux d'expression étaient maximaux, puis, diminuaient progressivement jusqu'au jour 35 (Wang et coll., 2000). Le criblage de notre librairie soustraite (WM-IS) a identifié le gène pour MMP1, confirmant son expression dans des plaies de sept jours chez le cheval. Une dégradation collagénique déficiente est caractéristique des cicatrices hypertrophiques et des chéloïdes chez l'homme (Raghow, 1994), et un excès de TGF- β , qui inhibe le remodelage de la MEC en favorisant l'expression des TIMPs tout en amenuisant l'expression des MMPs, est soupçonné comme facteur causal. L'ARNm ainsi que la protéine de TGF- β persistent plus longtemps dans les plaies appendiculaires du cheval comparativement aux plaies corporelles (Schwartz et coll., 2002; Theoret et coll., 2001c). Or, chez cette même espèce il a été démontré que des quantités plus importantes d'ARNm de MMP1 existent dans la peau intacte du corps par rapport à

celle du membre, cette différence s'effaçant sept jours suite à la création d'une plaie (Schwartz et coll., 2002). Ces résultats sont inattendus, puisqu'il serait attendu que les plaies appendiculaires, sujettes à la fibroplasie excessive, affichent des niveaux de MMPs réduits lors de la phase proliférative de la guérison. Nous projetons de vérifier cette information en utilisant la technique du HSS pour comparer des biopsies de plaies thoraciques à celles en provenance du membre chez le cheval.

Alors que CD68, CD163 et ADAM9 n'ont pas été associés spécifiquement à la guérison cutanée, ces gènes contrôlent certaines réponses au trauma. Notamment, le CD68 humain et son homologue murin, la macrosialin, sont des protéines transmembranaires glycosilées retrouvées presque exclusivement sur les macrophages (Holness et coll., 1993b; Jiang et coll., 1998). Les deux protéines partagent une structure possédant un domaine semblable à la mucine et un domaine commun à la famille des Lysosome Associated Membrane Proteins (LAMPs) (Kostich et coll., 2000). Macrosialin et CD68 sont principalement des protéines endosomiques mais sont également retrouvées à la surface cellulaire où elles lient avec affinité les lipoprotéines de faible densité (Ramprasad et coll., 1996; Kurushima et coll., 2000). Malgré que la fonction exacte des protéines CD68/macrosialin demeure incertaine, l'usage de CD68 comme marqueur d'antigène de surface est préconisé pour évaluer l'importance des monocytes/macrophages dans les tissus (Holness and Simmons, 1993a). Une nouvelle étude a révélé que le gène CD68 était sur-exprimé dans les kératinocytes cornéens migratoires, proposant un rôle de protection semblable à celui du macrophage pour ces cellules (Chakravarti et coll., 2004). Nous rapportons une augmentation de l'expression de CD68 dans des biopsies de bord de plaie comparativement à la peau non-lésée, suggérant la présence de monocytes/macrophages dans les tissus à sept jours suivant le trauma, tel que confirmé histologiquement (Theoret et coll., 2001c). La guérison cutanée chez le cheval est caractérisée par une phase inflammatoire faible mais prolongée (Wilmink et coll., 1999b), qui pourrait engendrer un relâchement continu d'enzymes lysosomales, dommageables pour les tissus, aussi bien que de médiateurs comme TGF- β qui encourage la fibroplasie excessive (Cotran et coll., 1994) et inhibe la contraction de plaie. Il serait donc intéressant d'investiguer l'expression génique de

CD68 dans les plaies appendiculaires, prédisposées au développement du bouton de chair.

CD163 est une protéine membranaire appartenant à la famille des « scavenger receptor cysteine rich domain » exprimée exclusivement sur les monocytes sanguins et les macrophages tissulaires (Kristiansen et coll., 2001). La liaison du complexe haptoglobine-hémoglobine aux cellules affichant CD163 permet la dégradation lysosomale du ligand puis le métabolisme de l'hème, minimisant ainsi l'inflammation. Cela se produit soit par signalisation intracellulaire menant à la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles l'IL-10, soit par la remise d'hémoglobine aux macrophages qui restreignent les dommages oxydatifs induits par l'hémoglobine (Graversen et coll., 2002). De plus, le largage de CD163 en présence de stimulés inflammatoires génère des quantités plasmatiques importantes du récepteur sous forme soluble (Moller et coll., 2002). Cette dernière inhibe activement la prolifération lymphocytaire en s'associant à sa myosine et modulant ainsi sa réponse envers les stimulés inflammatoires (Timmermann et coll., 2004). Il a également été observé que TGF- β réduit remarquablement l'expression de CD163, via la régulation de sa transcription (Pioli et coll., 2004). L'effet anti-inflammatoire associé à CD163 pourrait avoir un intérêt dans la guérison. Notre étude démontre une amplification significative du gène pour CD163 dans les marges de plaie à sept jours comparativement à la peau intacte. Une augmentation a aussi été documentée lors de la résolution d'ampoules cutanées d'origine chimique, qui corrélait avec la différenciation de monocytes en macrophages (Philippidis et coll., 2004). Considérant l'inflammation prolongée (Wilmink et coll., 1999b) ainsi que l'expression persistente de TGF- β lors de la guérison de plaies de membres en comparaison avec la guérison de plaies corporelles chez le cheval (Schwartz et coll., 2002; Theoret et coll., 2001c), nous spéculons que l'expression génique de CD163 pourrait être relativement diminuée dans les plaies appendiculaires chez cette espèce.

Meltrin gamma (ADAM9) comprend un domaine de métalloprotéinase et un domaine de désintégrine. Le premier lui confère la capacité de cliver la fibronectine (Schwettmann et coll., 2001), l'impliquant ainsi dans la transition de la matrice provisoire en cicatrice collagénique. Le deuxième domaine, de pair avec le premier,

soutient l'adhésion cellulaire via la liaison à l'intégrine $\alpha\beta 1$, et pourrait donc jouer un rôle dans la migration et la prolifération cellulaires. Les protéines ADAMs facilitent de plus un largage protéolytique des ectodomaines de protéines de surface telles les cytokines et les facteurs de croissance, leurs récepteurs, ainsi que les molécules d'adhésion cellulaire, ce qui a un impact sur la signalisation extracellulaire (Kheradmand et coll., 2002). En conséquence, la capacité d'ADAM9 à interagir avec les intégrines et les protéines de la MEC, en plus de son important rôle dans la régulation de la signalisation extracellulaire, suggèrent qu'il pourrait moduler la guérison cutanée, un processus complexe où les interactions cellules-cellules et cellules-matrice sont cruciales (White, 2003). Les plaies appendiculaires chez le cheval risquent de rester captives de la phase proliférative, retardant les phases subséquentes de la guérison, soit la contraction et la réépithélialisation. Compte tenu des fonctions d'ADAM9, une déficience de ce dernier pourrait gêner le remplacement de la fibronectine par des protéoglycans et du collagène durant la deuxième semaine de guérison, maintenant un tissu de granulation immature à l'endroit d'une matrice plus résistante. Ceci est caractéristique des plaies chroniques, qui affichent aussi une migration épithéliale tardive, un autre effet potentiel d'une insuffisance en ADAM9. Inversement, un excès d'ADAM9 pourrait stimuler une prolifération fibroblastique trop importante, menant à l'hypergranulation caractéristique des plaies appendiculaires du cheval. Le largage cellulaire de certains facteurs de croissance, comme le bFGF pro-fibrotique, pourrait accentuer cet effet en exerçant un effet chimioattractant et mitogénique sur différents types cellulaires. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression spatio-temporelle d'ADAM9 au cours de la phase proliférative de la guérison dermique du cheval, en vue de ses rôles potentiels dans la guérison normal et problématique.

Parmi les 31 gènes identifiés par cette étude et dont la présence dans le processus de guérison cutanée fut révélée par des études antérieures, neuf ont été préalablement documentés comme étant exprimés spécifiquement sept jours suivant le trauma chez les mammifères (mentionnés précédemment) tandis que 22 ont été observés lors du processus de guérison dermique, mais pas nécessairement durant la phase proliférative, par des études soit *in vivo* (17) ou *in vitro* (5) (tableau IV).

Tableau IV Classification des 22 gènes observés lors du processus de guérison cutanée, mais pas nécessairement lors de la phase proliférative

EST #	Homology - Description	Model	References
<i>coding for cellular proteins</i>			
JLL11-H7	ACTA1 : OC alpha smooth muscle actin	<i>in vivo</i>	Schwartz et al, 2002 Liu et al, 1999 Darby et al, 1990
JLL13-E9	ACTA2 : HS actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	<i>in vivo</i>	Cole et al, 2001a
JLL13-G6	ARP1 : CF centractin	<i>in vivo</i>	Cole et al, 2001a
JLL8-E9	CDK4 : HS cyclin-dependent kinase 4	<i>in vivo</i>	Qu et al, 2003
JLL14-A8	SRP9 : CL signal recognition particle 9 protein	<i>in vivo</i>	Soo et al, 2002
JLL14-C11	MT : EC mitochondrial DNA	<i>in vivo</i>	Silaeva et al, 1986
JLL13-E6	ACTR2 : HS actin-related protein 2 homolog	<i>in vitro</i>	Magdalena et al, 2003
JLL5-C3	ARPC1A : HS actin related protein 2/3 complex, subunit 1A	<i>in vitro</i>	Magdalena et al, 2003
JLL15-A10	CLTC : HS clathrin, heavy polypeptide	<i>in vitro</i>	Spradling et al, 2001
JLL7-A2	DNCI2 : HS dynein, cytoplasmic, light intermediate polypeptide 2	<i>in vitro</i>	Dujardin et al, 2003 Yvon et al, 2002
JLL12-B5	VCL : SC vinculin	<i>in vitro</i>	Rilla et al, 2002 Boemi et al, 1999
<i>coding for membrane proteins</i>			
JLL15-G4	CD36 : BT CD 36 antigen	<i>in vivo</i>	Simon et al, 1996
JLL11-A12	PECAM : BPplatelet endothelial cell adhesion molecule-1	<i>in vivo</i>	Galeano et al, 2004
<i>coding for ECM proteins</i>			
JLL13-D6	COL3A1 : HS collagen, type III, alpha 1	<i>in vivo</i>	Scharffetter et al, 1989
JLL11-F2	PIIINP : BT pro-collagen type III	<i>in vivo</i>	Li et al, 2001 Kurkinen et al, 1980
JLL7-E8	COL5A2 : SC collagen type V alpha 2	<i>in vivo</i>	Betz et al, 1993
JLL12-G1	SEPP1 : HS selenoprotein P, plasma, 1	<i>in vivo</i>	Li et al, 2001
JLL15-C2	DSPGII : EC dermatan sulfate proteoglycan II	<i>in vivo</i>	Bently et al, 1967
JLL6-C5	THBS2 : HS thrombospondin 2	<i>in vivo</i>	Agah et al, 2004 Kyriakides et al, 2001 Kyriakides et al, 1999
<i>coding for cellular and membrane proteins</i>			
JLL7-C7	CTNNB : SC beta-catenin	<i>in vivo</i>	Cheon et al, 2002
<i>coding for serum proteins</i>			
JLL14-A10	TF : EC transferrin gene	<i>in vivo</i>	Jeschke et al, 2000
JLL15-H4	TXNDC : HS thioredoxin domain containing	<i>in vivo</i>	Abdiu et al, 2000

Notre étude a également permis l'identification de huit ADNc correspondants à des gènes ayant été démontrés dans la guérison soit *in vivo*: des os [cathepsin K

(CTSK) (Kawana et coll., 2001) et calumenin (CALU) (Nakazawa et coll., 2004)]; de la rétine [serine proteinase inhibitor, clade F, member 1 (SERPINF1) (Stitt et coll., 2004; Schlingemann et coll., 2004)]; de la cornée [lumican (LUM) (Saika et coll., 2000)]; du système nerveux central [prosaposin (PSAP) (Hiraiwa et coll., 2003), lipocortin-1 (LPC1), LUM et ferritin light chain (FTL) (Natale et coll., 2003)], soit *in vitro*: des yeux [cadherin (CDH)11 (Masur et coll., 1999)].

La majorité (68,8%) des ADNc identifiés par notre étape de criblage correspondent à des gènes ne s'ayant pas encore vu attribuer un rôle lors de la guérison. Parmi ces derniers, nous croyons que spermidine/spermine acétyltransférase (SSAT), serine proteinase inhibitor, clade B, member 10 (SERPINB10) et sorting nexin (SNX)9 en particulier, pourraient être des nouveaux gènes candidats potentiellement liés à la phase proliférative de la guérison dermique chez le cheval.

Le catabolisme des polyamines spermidine et spermine en putrescine est accompli grâce à la collaboration de deux enzymes différentes, soit SSAT et la polyamine oxydase (Janne et coll., 2004). Spermidine/spermine acétyltransférase est fortement induite par ses substrats, a une demi-vie très courte et est l'enzyme limitant la rapidité du catabolisme des polyamines (Casero et coll., 1993). La régulation de l'expression de SSAT semble se produire à plusieurs niveaux incluant une augmentation de la transcription et de la stabilisation des transcrits, une augmentation de la traduction d'ARNm et une stabilisation de la protéine (Janne et coll., 2004). Une sur-expression de SSAT altère sévèrement l'homéostasie des polyamines et génère un phénotype complexe affectant la peau, la déposition des graisses, la fertilité de la femelle, le pancréas, le foie, et le système nerveux central (Janne et coll., 2004). Les fonctions cellulaires de la putrescine, de la spermidine et de la spermine demeurent à ce jour méconnues, cependant les protéines seraient cruciales à la croissance et à la prolifération cellulaires chez les mammifères et ce, par l'entremise de diverses voies de signalisation cellulaire contrôlant la synthèse et la méthylation de l'ADN, la progression du cycle cellulaire et/ou l'activation de facteurs de transcription et l'apoptose (Rodriguez-Sallaberry et coll., 2001). En effet, les polyamines auraient un double rôle en stimulant la croissance cellulaire ou en induisant l'apoptose, au besoin (Wallace et coll., 2003), tandis que l'activation de leur

catabolisme, via SSAT, serait liée à une action anti-proliférative (Janne et coll., 2004). Il a récemment été démontré que la sur-expression de SSAT augmente la migration cellulaire modulée par l'intégrine $\alpha 9\beta 1$, particulièrement pour les leucocytes, les kératinocytes et les cellules endothéliales, via une interaction directe avec le domaine cytoplasmique de l'intégrine (Chen et coll., 2004). Ainsi, malgré que le rôle précis de SSAT demeure incertain, il est probable que ce dernier soit impliqué dans la migration cellulaire et/ou l'apoptose, deux phénomènes cruciaux lors de la guérison et de la régénération tissulaire. Spécifiquement, il serait intéressant d'investiguer le rôle de SSAT durant l'angiogénèse et la réépithélialisation, autant que pendant l'inflammation chronique, lorsque la migration des leucocytes vers l'espace extravasculaire est excessive et persistante.

Les serpins (serine protéinase inhibitors) sont une superfamille de protéines faisant usage d'un mécanisme d'inhibition de type « suicidaire ». Ce dernier a comme but de piéger de manière covalente les substrats-cibles alors que les serpins subissent un réarrangement irréversible de leur conformation afin d'offrir une protection cellulaire contre les effets néfastes des protéinases endogènes ou exogènes. Cette superfamille est divisée en 16 catégories, de A à P, qui contiennent de trois à 77 membres chacune. La classification est basée sur la relation phylogénique entre serpins (Irving et coll., 2000) plutôt que leur activité, leur structure génique, leur localisation chromosomique ou encore leur distribution tissulaire (Silvermann et coll., 2001). SERPINB10, aussi nommée protéinase inhibitor 10 (PI10) ou Bomapin, appartient à la catégorie serpin clade B, et est un inhibiteur compétitif de la thrombine et de la trypsine. Elle possède 45% d'homologie avec l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 2, l'inhibiteur de l'élastase des leucocytes, et l'antiprotéinase cytoplasmique (Riewald et coll., 1995), ce qui permet de lui attribuer un rôle dans la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaires, dans l'angiogénèse ainsi que dans la mobilité et la capacité d'invasion des cellules tumorales. Il est donc possible que SERPINB10 soit impliquée dans les phases inflammatoire et proliférative de la guérison dermique, où elle pourrait moduler la formation du caillot via son effet sur la thrombine et/ou altérer la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans le tissu de granulation.

Sorting nexin 9 appartient à un important groupe de protéines caractérisées par la présence d'une sous-classe du domaine phox phosphoinositide-binding, et qui semblent posséder un rôle dans le triage intracellulaire. Plusieurs membres de cette famille sont localisés dans les endosomes, et certains des SNX interagissent directement avec les récepteurs transmembranaires afin d'en contrôler leur tri dans les voies endosomiques. À l'origine, SNX9 a été identifié comme une molécule qui interagit avec le domaine riche en proline de certaines ADAMs (Howard et coll., 1999) malgré que l'implication de cette interaction demeure inconnue. De plus, SNX9 coopère avec la tyrosine kinase se liant à la clathrine, la kinase-activated Cdc42-associated kinase-2 (Ack2), par l'entremise d'une interaction entre le domaine riche en proline d'Ack2 et le domaine Src homology 3 domain (SH3) de SNX9. Chez les mammifères, Ack2 interagit avec le récepteur de EGF (EGF-R), interaction qui est stabilisée par SNX9. Après avoir été stimulé par EGF, SNX9 devient phosphorylé et il lui est alloué un rôle, en collaboration avec Ack2, dans la dégradation et le recyclage de EGF-R, qui mène à une réduction du niveau cellulaire de EGF-R (Lin et coll., 2002). Puisque EGF module plusieurs activités lors du processus de guérison, une diminution de son récepteur par l'intermédiaire de SNX9 doit être bien contrôlé afin d'éviter des aberrations lors de la guérison, tel un délai de réépithélialisation.

Le HSS assure la production de matériel diagnostic pour des expériences ultérieures visant à approfondir nos connaissances sur un processus particulier. Lors de cette étude nous avons identifié des gènes sous-exprimés lors du criblage différentiel, or le séquençage et l'analyse d'homologie de ces derniers n'ont pas été effectués. Il serait cependant fort intéressant de connaître l'identité de ces gènes afin de compléter la caractérisation de la guérison cutanée normale du cheval. Il serait également pertinent d'utiliser la technique du HSS pour connaître le profil d'expression génique lors de la guérison exubérante chez le cheval. Les informations générées par ces études permettraient de mieux cerner la problématique et permettraient une comparaison directe avec le profil d'expression de la guérison normale chez le cheval. Par la suite, les gènes ayant des rôles méconnus dans la guérison cutanée ainsi que ceux ayant un rôle connu mais nécessitant des

investigations supplémentaires seraient ciblés par des études ultérieures. Le matériel généré par HSS permet d'analyser rapidement l'expression temporelle à l'aide de Northern virtuel ainsi que de cloner les ADNc complets. Pour compléter ces études à caractère génique, une analyse de l'expression spatio-temporelle des protéines pourrait être effectuée lorsque les anticorps voulus sont disponibles. Le HSS est donc une première étape nous permettant d'approfondir nos connaissances au sujet d'un processus biologique tel la guérison cutanée.

Conclusion

En conclusion, nous avons réussi en utilisant la technique du HSS, à produire une esquisse partielle du profil d'expression génique lors de la phase proliférative de la guérison dermique normale chez le cheval. Cette étude, comme d'autres, souligne que de nombreux gènes participent activement à la réponse transcriptionnelle normale suivant un trauma cutané. Malgré que certaines séquences identifiées par le HSS peuvent ne pas avoir de signification immédiate, nous en avons identifié plusieurs autres qui sont fortement exprimées et qui pourraient avoir un rôle méconnu dans la régulation de la phase proliférative de la guérison de plaie. Cette première étape sert de précurseur pour élucider les réponses géniques anormales et pour éventuellement prédire quelles plaies sont prédisposées à une inflammation chronique ou à une fibroplasie excessive menant à la cicatrisation pathologique. De plus, les informations générées par cette étude permettent de formuler des hypothèses pour des études ultérieures qui décriront la fonction de gènes clés dans le processus de guérison. Spécifiquement, les expériences futures devront corrélérer les changements de niveaux d'ARNm pour des molécules choisies avec l'étude de l'expression spatio-temporelle de leurs protéines.

Bibliographie

Abdiu A, Nakamura H, Sahaf B, Yodoi J, Holmgren A, Rosen A. Thioredoxin blood level increases after severe burn injury. *Antioxidants & Redox Signaling* 2000; 2: 707-716

Agah A, Kyriakides TR, Letrondo N, Bjorkblom B, Bornstein P. Thrombospondin 2 levels are increased in aged mice: consequences for cutaneous wound healing and angiogenesis. *Matrix Biol* 2004; 22: 539-547

Ahlen K, Rubin K. Platelet-derived growth factor-BB stimulates synthesis of the integrin $\alpha 2$ -subunit in human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res* 1994; 215: 347-353

Albelda SM, Buck CA. Integrins and others cell adhesion molecules. *FASEB J* 1990; 4: 2868-2880

Bacon-Miller C, Wilson DA, Keegan KG, Kreeger JM, Adelstein EH, Ganjam VK. Growth characteristics of fibroblasts isolated from the trunk and distal aspect of the limb of horses and ponies. *Vet Surg* 2000; 29: 1-7

Barber SM. Second intention wound healing in the horse: the effect of bandages and topical corticosteroids. *Proceedings of the Am Assoc Equine Pract* 1990; 35: 107

Basson CT, Kocher O, Basson MD, Asis A, Madri JA. Differential modulation of vascular cell integrin and extracellular matrix expression *in vitro* by TGF- $\beta 1$ correlates with reciprocal effects on cell migration. *J Cell Physiol* 1992; 153: 118-128

Becker JC, Gillitzer R, Brocker EB. A member of the melanoma antigen-encoding gene (MAGE) family is expressed in human skin during wound healing. *Int J Cancer* 1994; 58: 346-348

Bell L, Madri JA. Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration in vitro. *Am J Pathol* 1990; 137: 7-12

Bell L, Luthringer DJ, Madri JA, Warren SL. Autocrine angiotensin system regulation of endothelial cell behavior involves modulation of pp60^{c-src} expression. *J Clin Invest* 1992; 89: 315-320

Bently JP. Rate of chondroitin sulphate formation in wound healing. *Ann Surg* 1967; 165: 186-191

Berry DB 2nd, Sullins KE. 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* 2003; 64: 88-92

Betchel MJ, Reinartz J, Rox JM. Upregulation of cell-surface associated plasminogen activator in cultured keratinocytes by IL-1 β and TNF- α . *Exp Cell Res* 1996; 223: 395-404

Bettinger DA, Yager DR, Diegelmann RF, Cohen IK. The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis. *Plast Reconstr Surg* 1996; 98: 827-833

Betz P, Nerlich A, Wilske J, Tubel J, Penning R, Eisenmenger W. Analysis of the immunohistochemical localization of collagen type III and V for the time-estimation of human skin wounds. *Int J Legal Med* 1993; 105: 329-332

Boemi L, Allison GM, Graham WP, Krummel TM, Ehrlich HP. Differences between scar and dermal cultured fibroblasts derived from a patient with recurrent abdominal incision wound herniation. *Plast Reconstr Surg* 1999; 104: 1397-1405

Booth LC. Second-intention healing and delayed closure. In Auer JA. *Equine Surgery*. Philadelphia, Saunders, 1992, chap 21 pp.131

Borel JP, Maquart FX. Mécanismes moléculaires de la cicatrisation des blessures. *Ann Biol Clin* 1998; 56: 11-19

Boudreau N, Andrews C, Srebow A, Ravanpay A, Cheresch DA. Induction of the angiogenic phenotype by Hox D3. *J Cell Biol* 1997; 139: 257-264

Brauchle M, Angermeyer K, Hubner G, Werner S. Large induction of keratinocyte growth factor expression by serum growth factor and pro-inflammatory cytokines in cultured fibroblasts. *Oncogene* 1994; 9: 3199-3204

Brostoff J, Hall T. Hypersensibilité type I. In: Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunologie*. ed 4, Bruxelles, DeBoeck Université, 1997, chap 22 pp.295-297

Brûlé S, Rahabi F, Faure R, Beckers J-F, Silversides DW, Lussier JG. Vacuolar system-associated protein-60: A protein characterized from bovine granulosa and luteal cells that is associated with intracellular vesicles and related to human 80 K-H and murine β -glucosidase II. *Biol Reprod* 2000; 62: 642-654

Campbell EJ, Cury JD, Lazarus CJ, Wegus HG. Monocyte procollagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases. Identification, characterization, and regulation of secretion. *J Biol. Chem* 1987; 262: 15862-15868

Canalis E. Interleukine-1 has independent effects on DNA and collagen synthesis in cultures of rat calvariae. *Endocrinology* 1986; 118: 74-81

Cao W, Epstein C, Liu H, DeLoughery C, Ge N, Lin J, Diao R, Cao H, Long F, Zhang X, Chen Y, Wright PS, Busch S, Wenck M, Wong K, Saltzman AG, Tang Z, Liu L, Zilbert A. Comparing gene discovery from Affymetrix GeneChip microarrays and Clontech PCR-select cDNA subtraction: a case study. *BMC Genomics* 2004; 5: 26-36

Casero RA, Pegg AE. Spermidine/spermine N¹-acetyltransferase – the turning point in polyamine metabolism. *FASEB J* 1993; 7: 653-661

Chakravarti S, Wu F, Vij N, Roberts L, Joyce S. Microarray studies reveal macrophage-like function of stromal keratocytes in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 3475-3484

Chen N, Chen CC, Lau LF. Adhesion of human skin fibroblasts to Cyr61 is mediated through integrin alpha 6 beta 1 and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 2000; 275: 24953-24961

Chen CC, Chen N, Lau LF. The angiogenic factor Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 2001a; 276: 10443-10452

Chen CC, Mo FE, Lau LF. The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 2001b; 276: 47329-47337

Chen C, Young BA, Coleman CS, Pegg AE, Sheppard D. Spermidine/spermine N1-acetyltransferase specifically binds to the integrin alpha9 subunit cytoplasmic domain and enhances cell migration. *J Cell Biol* 2004; 167:161-170

Cheon SS, Cheah AYL, Turley S, Nadesan P, Poon R, Clevers H, Alman BA. β -Catenin stabilization dysregulates mesenchymal cell proliferation, motility, and invasiveness and causes aggressive fibromatosis and hyperplastic cutaneous wounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6973-6978

Chedid M, Rubin JS, Csaky KG, Aaronson SA. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1. *J Biol Chem* 1994; 269: 10753-10757

Chomzynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159

Chvapil M, Pfister T, Escalada S, Ludwig J, Peacock EE Jr. Dynamics of the healing of skin wounds in the horse as compared with the rat. *Exp Mol Pathol* 1979; 30: 349-359

Clark RAF, Lanigan JM, DellaPelle P, Manseau E, Dvorak HF, Colvin RB. Fibronectin and fibrin provide provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* 1982; 70: 264-269

Clark RAF, Folkvord JM, Nielsen LD. Either exogenous or endogenous fibronectin can promote adherence of human endothelial cells. *J Cell Sci* 1986; 82: 263-280

Clark RAF, Nielsen LD, Welch MP, McPherson JM. Collagen matrices attenuate the collagen synthetic response of cultured fibroblasts to TGF- β . *J. Cell Sci* 1995; 108: 1251-1261

Clark RAF. Wound repair: overview and general considerations. In: Clark RAF (ed). *The molecular and cellular biology of wound repair*. ed 2. New York, Plenum Publishers, 1996, chap. 1 pp.3-50

Clark RA, Lin F, Greiling D, An J, Couchman JR. Fibroblast invasive migration into fibronectin/fibrin gels requires a previously uncharacterized dermatan sulfate-CD44 proteoglycan. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 266-277

Clore JN, Cohen IK, Biegelman RF. Quantitation of collagen type I and III during wound healing in rat skin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979; 161: 337-340

Cochrane CA. Models in vivo of wound healing in the horse and the role of growth factors. *Vet Dermatol* 1997; 8: 259-272

Cole J, Tsou R, Wallace K, Gibran N, Isik F. Early gene expression profile of human skin to injury using high density cDNA microarrays. *Wound Rep Regen* 2001a; 9: 360-370

Cole J, Tsou R, Wallace K, Gibran N, Isik F. Comparison of normal human skin gene expression using cDNA microarrays. *Wound Rep Regen* 2001b; 9: 77-85

Cook H, Davies KJ, Harding KG, Thomas DW. Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-1, TIMP-2, and MMP-2 activity. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 225-233

Cotran SC, Kumar V, Robbins SL. Cellular growth and differentiation: normal regulation and adaptations; Inflammation and repair. In: Schoen FJ, (ed). *Robins pathologic basis of disease*. ed 5 (vol 1). Philadelphia: PA Saunders, 1994, pp. 35-92

Darby IA, Bisucci T, Hewiston TD, MacLellan DG. Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 191-200

Darby I, Skalli O, Gabbiani G. α -Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 1990; 63: 21-29

Dart AJ, Cries L, Jeffcott LB, Hodgson DR, Rose RJ. Effects of 25% propylene glycol hydrogel (Solugel) on second intention wound healing in horses. *Vet Surg* 2002a; 13: 309-313

Dart AJ, Cries L, Jeffcott LB, Hodson DR, Rose RJ. The effect of equine recombinant growth hormone on second intention wound healing in horses. *Vet Surg* 2002b; 31: 314-319

Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1985; 162: 2163-2167

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: 70-76

Denholm EM, Cauchon E, Poulin C, Silver PJ. Inhibition of human dermal fibroblast proliferation by removal of dermatan sulfate. *Eur J Pharmacol* 2000; 400: 145-153

Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122: 103-111

Desmoulière A, Rubbia-Brandt L, Abdiu A, Walz T, Macieira-Coelho A, Gabbiani G. α -Smooth muscle actin is expressed in a subpopulation of cultured and cloned fibroblasts and is modulated by γ -interferon. *Exp Cell Res* 1992a; 201: 64-73

Desmoulière A, Rubbia-Brandt L, Grau G, Gabbiani G. Heparin induces α -smooth muscle actin expression in cultured fibroblasts and in granulation tissue myofibroblasts. *Lab Invest* 1992b; 67: 716-726

Diatchenko L, Lau Y-F C, Campbell AP, Chenchik A, Moqudam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization : A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6025-6030

Diatchenko L, Lukyanov S, Lau Y-F C, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: A versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 1999; 303: 349-379

Dinareello CA. Interleukin-1: A proinflammatory cytokine. In Gallin JI, Snyderman R (eds): *Inflammation : Basic Principles and Clinical Correlates*. ed 3. New York, Lippincott, Williams & Wilkins, 1999, pp 443-461

Dujardin DL, Barnhart LE, Stehman SA, Gomes ER, Gundersen GG, Valle RB. A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *J Cell Biol* 2003; 163: 1205-1211

Endege WO, Steinmann KE, Boardman LA, Thibodeau SN, Schlegel R. Representative cDNA libraries and their utility in gene expression profiling. *Biotechniques* 1999; 26: 542-550

Falanga V, Julien JM. Observations in the potential role of TGF- β in cutaneous fibrosis: Systemic sclerosis. *Ann NY Acad Sci* 1990; 593:161-171

Fischer JW, Kinsella MG, Levkau B, Clowes AW, Wight TN. Retroviral overexpression of decorin differentially affects the response of arterial smooth muscle cells to growth factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 777-784

Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, de Chastonay C, Vanderkerckhove J, Weber K, Franke WW. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: Predominance of vimentin filaments and a specific α -type actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 298-302

Gailit J, Pierschbacher M, Clark RAF. Expression of functional α 4 integrin by human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 323-328

Gailit J, Bueller H, Clark RAF. Platelet-derived growth factor and inflammatory cytokines have differential effects on the expression of integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ by human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* 1996; 169: 281-289

Galeano M, Altavilla D, Cucinotta D, Russo GT, Calo M, Bitto A, Marini H, Marini R, Adamo EB, Seminara P, Minutoli L, Torre V, Squadrito F. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 2004; 53: 2509-2517

Gallo RL, Bernfield M. Proteoglycans and their role in wound repair. In: Clark RAF (ed). *The molecular and cellular biology of wound repair*. ed 2. New York, Plenum Publishers, 1996, chap. 15 pp.475-492

Gomez JH, Schumacher J, Lauten SD, Sartin EA, Hathcock TL, Swaim SF. Effects of 3 biologic dressings on healing of cutaneous wounds on the limbs of horses. *Can J Vet Res* 2004; 68: 49-55

Grant GA, Eisen AZ, Marmer BL, Roswit WT, Goldberg GI. The activation of human skin fibroblast procollagenase. Sequence identification of the major conversion products. *J Biol Chem* 1987; 262: 5886-5889

Gratzinger D, Canosa S, Engelhardt B, Madri JA. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 modulates endothelial cell motility through the small G-protein Rho. *FASEB J* 2003; 17: 1458-1469

Graversen JH, Madsen M, Moestrup SK. CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 309-314

Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 1019-1030

Gu W, Bertone AL. Generation and performance of an equine-specific large-scale gene expression microarray. *Am J Vet Res* 2004; 65: 1664-1673

Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD, Khaspekov GL, Lukyanov KA, Vagner LL, Ermolaeva OD, Lukyanov SA, Sverdlov ED. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction : Cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem* 1996; 240: 990-997

Grzeszkiewicz TM, Kirschling DJ, Chen N, Lau LF. CYR61 stimulates human skin fibroblast migration through integrin alpha v beta 5 and enhances mitogenesis through integrin alpha v beta 3 independent of its carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem* 2001; 276: 21943-21950

Haisa M, Okochi H, Grotendorst GR. Elevated levels of PDGF alpha receptors in keloid fibroblasts contribute to an enhanced response to PDGF. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 560-563

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: 1767-1778

Harrop AR, Ghahary A, Scott PG, Forsyth N, Uji-Friendland A, Tredget EE. Regulation of collagen synthesis and mRNA expression in normal and hypertrophic scar fibroblasts in vitro by interferon gamma. *J Surg Res* 1995; 58: 471-477

Haslett C, Henson P. Resolution of Inflammation. In: Clark RAF (ed). *The molecular and cellular biology of wound repair*. ed 2. New York, Plenum Publishers, 1996, chap. 4 pp.142-170

Hasty KA, Pourmotabbed TF, Goldberg GI, Thompson JP, Spinella DG, Stevens RM, Mainardi CL. Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1990; 265: 11421-11424

He CS, Wilhelm SM, Pentland AP, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Goldberg GI. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2632-2636

Heino J, Ignatz RA, Hemler ME, Crouse C, Massague J. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor- β . Concomitant regulation of integrins that share a common β 1 subunit. *J Biol Chem* 1989; 264: 380-388

Hiraiwa M, Liu J, Lu AG, Wang CY, Misasi R, Yamauchi T, Hozumi I, Inuzuka T, O'Brien JS. Regulation of gene expression in response to brain injury: enhanced expression and alternative splicing of rat prosaposin (SGP-1) mRNA in injured brain. *J Neurotrauma* 2003; 20: 755-765

Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 1993a; 81: 1607-1613

Holness CL, da Silva RP, Fawcett J, Gordon S, Simmons DL. Macrosialin, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/lgp family. *J Biol Chem* 1993b; 268: 9661-9666

Howard L, Nelson KK, Maciewicz RA, Blobel CP. 1999. Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 containing proteins, endophilin I and SH3PX1. *J Biol Chem* 1999; 274: 31693-31699

Ingham KC, Landwehr R, Engel J. Interaction of fibronectin with C1q and collagen. Effects of ionic strength and denaturation of the collagenous component. *Eur J Biochem* 1985; 148: 219-224

Irving JA, Pike RN, Lesk AM, Whisstock JC. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res* 2000;10:1845-1864

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

Janne J, Alhonen L, Pietila M, Keinanen TA. Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. *Eur J Biochem* 2004; 271: 877-894

Jeschke MG, Herndon DN, Wolf SE, DebRoy MA, Rai J, Thompson JC, Barrow RE. Hepatocyte growth factor modulates the hepatic acute-phase response in thermally injured rats. *Crit Care Med* 2000; 28: 504-510

Jiang Z, Shih DM, Xia YR, Lusic AJ, de Beer FC, de Villiers WJ, van der Westhuyzen DR, de Beer MC. Structure, organization, and chromosomal mapping of

the gene encoding macrosialin, a macrophage-restricted protein. *Genomics* 1998; 50: 199-205

JMP. Software for statistical visualisation on the Apple McIntosh. Version 2. SAS Institute Inc. Cary, NC; 1989

Kawana F, Sawae Y, Sahara T, Tanaka S, Debari K, Shimizu M, Sasaki T. Porcine enamel matrix derivative enhances trabecular bone regeneration during wound healing of injured rat femur. *Anat Rec* 2001; 264: 438-446

Kerkhoff C, Klempt M, Sorg C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). *Biochim Biophys Acta* 1998; 1448: 200-211

Kheradmand F, Werb Z. Shedding light on sheddases: role in growth and development. *Bioessays* 2002; 24: 8-12

Kim J, Hajjar KA. Annexin II: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor. *Front Biosci* 2002; 7: 341-348

Kischer CW, Thies AC, Chvapil M. Perivascular myofibroblasts and microvascular occlusion in hypertrophic scars and keloids. *Hum Pathol* 1982; 13: 819-824

Klein CE, Dressel D, Steinmayer T, Mauh C, Eckes B, Krieg T, Bankert RB, Weber L. Integrin $\alpha 2 \beta 1$ is up-regulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen 1 fibrils. *J Cell Biol* 1991; 115: 1427-1436

Knottenbelt DC (ed). *Handbook of equine wound management*. London, Saunders, 2003, chap 4 pp.95-128

Kostich M, Fire A, Fambrough DM. Identification and molecular-genetic characterization of a LAMP/CD68-like protein from *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci* 2000; 113: 2595-2606

Krawczyk WS. A pattern of epidermal cell migration during wound healing. *J Cell Biol* 1971; 49: 247-263

Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SKA and Moestrup SK. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001; 409: 198-201

Kunkel SL, Standiford T, Kasahara, Strieter RM. Stimulus specific induction of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) gene expression. *Adv Exp Med Biol* 1991; 305: 65-71

Kurkinen M, Vaheri A, Roberts PJ, Stenman S. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab Invest* 1980; 43: 47-51

Kurushima H, Ramprasad M, Kondratenko N, Foster DM, Quehenberger O, Steinberg D. Surface expression and rapid internalization of macrosialin (mouse CD68) on elicited mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 104-108

Kyriakides TR, Zhu YH, Yang Z, Huynh G, Bornstein P. Altered extracellular matrix remodelling and angiogenesis in sponge granulomas of thrombospondin 2-null mice. *Am J Pathol* 2001; 159: 1255-1262

Kyriakides TR, Tam JW, Bornstein P. Accelerated wound healing in mice with a disruption of the thrombospondin 2 gene. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 782-787

Ladin DA, Hou Z, Patel D, Mcphail M, Olson JC, Saed GM, Fivenson DP. p53 and apoptosis alterations in keloids and keloid fibroblasts. *Wound Rep and Reg* 1998; 6: 28-37

Li X, Mohan S, Gu W, Baylink DJ. Analysis of gene expression in the wound repair/regeneration process. *Mamm Genome* 2001; 12: 52-59

Liang P. A decade of differential display. *Biotechniques* 2002; 33 : 338-346

Lin Q, Lo CG, Cerione RA, Yang W. The Cdc42 Target ACK2 interacts with sorting nexin 9 (SH3PX1) to regulate epidermal growth factor receptor degradation. *J Biol Chem* 2002; 277: 10134–10138

Liu M, Warn JD, Fan Q, Smith PG. Relationships between nerves and myofibroblasts during cutaneous wound healing in the developing rat. *Cell Tissue Res* 1999; 297: 423-33

Luo S, Benathan M, Raffould W, Panizzon RG, Egloff DV. Abnormal balance between proliferation and apoptotic cell death in fibroblasts derived from keloid lesions. *Plast Reconstr Surg* 2001; 107: 87-96

Lydyard P, Grossi C. Cellules impliqués dans la réponse immunitaire. In: Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunologie*, ed 4, Bruxelles, DeBoeck Université, 1997, chap 2 pp.28

Madlener M, Parks WC, Werner S. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. *Exp Cell Res* 1998; 242: 201-210

Madri JA, Pratt BM, Tucker AM. Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor- β depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1988; 106: 1375-1384

Madri JA, Bell L, Merwin JR. Modulation of vascular cell behavior by transforming growth factors beta. *Mol Reprod Dev* 1992; 32: 121-126

Madri JA, Sankar S, Romanic AM. Angiogenesis. In: Clark RAF (ed). *The molecular and cellular biology of wound repair*. ed 2. New York, Plenum Publishers, 1996, chap. 11 pp.355-390

Magdalena J, Millard TH, Etienne-Manneville S, Launay S, Waraick HK, and Machesky LM. Involvement of the Arp2/3 complex and Scar2 in golgi polarity in scratch wound models. *Mol Biol Cell* 14: 670-84, 2003

Male D, Roitt I. Introduction au système immunitaire. In: Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunologie*, ed 4, Bruxelles, DeBoeck Université, 1997a, chap 1 pp.5

Male D. Migration cellulaire et inflammation. In: Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunologie*, ed 4, Bruxelles, DeBoeck Université, 1997b, chap 14 pp.190

Marx M, Perlmutter R, Madri JA. Modulation of PDGF-receptor expression in microvascular endothelial cells during *in vitro* angiogenesis. *J Clin Invest* 1994; 93: 131-139

Masur SK, Conors RJ Jr, Cheung JK, Antohi S. Matrix adhesion characteristics of corneal myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 904-910

Mauviel A. Cytokines regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem* 1993; 53: 288-295

McCauley RL, Chopra V, Li Y, Herndon DN and Robson MC. Altered cytokine production in black patients with keloids. *J Clin Immunol* 1992; 12: 300-308

Mignatti P, Rifkin DB, Welgus HG, Parks WC. Proteinases and tissue remodeling. In: Clark RAF (ed). *The molecular and cellular biology of wound repair*. ed 2. New York, Plenum Publishers, 1996, chap. 14 pp.427-476

Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1993; 73: 161-195

Mignatti P, Mazzieri R, Rifkin DB. Expression of the urokinase receptor in vascular endothelial cells is stimulated by basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 1991; 113: 1193-1201

Mignatti P, Robbins E, Rifkin DB. Tumor invasion through the human amniotic membrane: Requirement for a proteinase cascade. *Cell* 1986; 47: 487-498

Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E, Rifkin DB. *In vitro* angiogenesis on the human amniotic membrane: Requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. *J Cell Biol* 1989; 108: 671-682

Moller HJ, Peterslund NA, Graversen JH and Moestrup SK. Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein plasma. *Blood* 2002; 99: 378-80

Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 7297-7301

Montesano R, Pepper MS, Mohle-Steinlen U, Risau W, Wagner EF, Orci L. Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenic behaviour of endothelial cells expressing middle T oncogene. *Cell* 1990; 62: 435-445

Moscatelli D, Presta M, Rifkin DB. Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis and migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2091-2095

Moulin V, Garrel D, Auger FA, O'Connor-McCourt M, Castilloux G, Germain L. What's new in human wound-healing myofibroblasts? In Desmoulière A, Tuchweber B (eds) *Current topics in pathology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1999, volume 93, pp.123-133

Munz B, Gerke V, Gillitzer R and Werner S. Differential Expression of the calpactin I subunits annexin II and p11 cultured keratinocytes and during wound repair. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 307-312

Murphy G, Cockett MI, Ward RV, Docherty AJ. Matrix metalloproteinase degradation of elastin, types IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 75 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem J* 1991; 277: 277-279

Nakazawa T, Nakajima A, Seki N, Okawa A, Kato M, Moriya H, Amizuka N, Einhorn TA, Yamazaki M. Gene expression of periostin in the early stage of fracture healing detected by cDNA microarray analysis. *J Orthop Res* 2004; 22: 520-525

Nanney LB, King LE. Epidermal growth factor and transforming growth factor- α . In Clark RAF (ed). *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. ed 2. New York, Plenum Publishers, 1996, Chap. 5 pp171-194

Natale JE, Ahmed F, Cernak I, Stoica B, Faden AI. Gene expression profile changes are commonly modulated across models and species after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2003; 20: 907-927

Okada A, Tomasetto C, Lutz Y, Bellocq JP, Rio MC, Basset P. Expression of matrix metalloproteinase during rat skin wound healing : evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A. *J Cell Biol* 1997; 137: 67-77

Oono T, Specks U, Eckes B, Majewski S, Hunzelmann N, Timpl R, Krieg T. Expression of type VI collagen mRNA during wound healing. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 329-334

Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72kDA gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* 1991; 266: 14064-14071

Pepper MS, Montesano R. Proteolytic balance and capillary morphogenesis. *Cell Differ Dev* 1990; 32: 319-328

Pedersen TX, Leethanakul C, Patel V, Mitola D, Lund LR, Dano K, Johnsen M, Gutkind S, Bugge T. Laser capture microdissection-based in vivo genomic profiling of wound keratinocytes identifies similarities and differences to squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 3964-3976

Petersen SL, Botes C, Olivier A, Guthrie AJ. The effect of low level laser therapy (LLLT) on wound healing in horses. *Equine Vet J* 1999; 3: 228-231

Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO and Landis RC. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses *in vitro*, in resolving skin blisters *in vivo*, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res* 2004; 94: 119-126

Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RM, Deuel TF. Platelet derived growth factor and transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol* 1989; 109: 429-440

Pittet B, Rubbia-Brandt L, Desmoulière A, Sappino AP, Roggero P, Guerret S, Grimand JA, Montandon D, Gabbiani G. Effect of γ -interferon on the clinical and biologic evolution of hypertrophic scars and Dupuytren's disease: An open pilot study. *Plast Reconstr Surg* 1994; 93: 1224-1235

Pioli PA, Goonan KE, Wardwell K, Guyre PM. TGF-beta regulation of human macrophage scavenger receptor CD163 is Smad3-dependent. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 500-508

Polo M, Ko F, Busillo F, Cruse CW, Krizek TJ and Robson MC. Cytokine production patients with hypertrophic burn scars. *J Burn Care Rehabil* 1997; 18: 477-482

Qu J, Cheng T, Shi C, Lin Y, Yan G, Ran X. Reduced presence of tissue-repairing cells in wounds combined with whole-body irradiation injury is associated with both suppression of proliferation and increased apoptosis. *Med Sci Monit* 2003; 9: 370-377

Raghow R. The role of extracellular matrix in post inflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB J* 1994; 8: 823-831

Ramprasad MP, Terpstra V, Kondratenko N, Quehenberger O, Steinberg D. Cell surface expression as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14833-14838

Reed CC, Iozzo RV. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj J* 2003; 19: 249-255

Reed MJ, Puolakkainen P, Lane TF, Dickerson D, Bornstein P and Sage EH. Differential expression of SPARC and thrombospondin I in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization. *J Histo Cytoc* 1993; 41: 1467-1477

Riches DW. Macrophage involvement in wound repair, remodeling, and fibrosis. In: Clark RAF (ed). *The molecular and cellular biology of wound repair*. ed 2. New York, Plenum Publishers, 1996, chap. 3 pp.95-142

Riewald M, Schleef RR. Molecular cloning of bomapin (protease inhibitor 10), a novel human serpin that is expressed specifically in the bone marrow. *J Biol Chem* 1995; 270: 26754-26757

Rilla K, Lammi MJ, Sironen R, Torrone K, Luukkonen M, Hascall VC, Midura RJ, Hyttinen M, Pelkonen J, Tammi M, Tammi R. Changed lamellipodial extension, adhesion plaques and migration in epidermal keratinocytes containing constitutively expressed sense and antisense hyaluronan synthase 2 (HAS2) genes. *J Cell Sci* 2002; 115: 3633-3643

Rodriguez-Sallaberry C, Simmen FA, Simmen RCM. Polyamine and insulin-like growth factor-I-mediated proliferation of porcine uterine endometrial cells: A potential role for spermidine/spermine N1-acetyltransferase during peri-implantation. *Biol Reprod* 2001; 65: 587-594

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RF, Smith JM, Roche MS, Heine UF, Liotta L, Falanga V, Kehrl JH, Fauci AS. Transforming growth factor beta: Rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4167-4171

Rosenfeldt H, Lee DJ, Grinnell F. Increased c-fos mRNA expression by human fibroblasts contracting stressed collagen matrices. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 2659-2667

Rubbia-Brandt L, Sappino AP, Gabbiani G. Locally applied GM-CSF induces the accumulation of α -smooth muscle actin containing myofibroblasts. *Virchows Arch [B] Cell Pathol* 1991; 60: 73-82

Saarialho-Kere UK, Kovacs SO, Pentland AP, Parks WC, Welgus HG. Distinct populations of keratinocytes express stromelysin-1 and -2 in chronic wounds. *J Clin Invest* 1994; 94: 79-88

Saika S, Shiraishi A, Liu CY, Funderburgh JL, Kao CW, Converse RL, Kao WW. Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing. *J Biol Chem* 2000; 275: 2607-2612

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning ; A laboratory manual* ed 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2001

Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 1994; 370: 61-65

Sato N, Beitz JG, Kato J, Yamamoto M, Clark JW, Calabresi P, Raymond A, Frackelton AR Jr. Platelet-derived growth factor indirectly stimulates angiogenesis *in vitro*. *Am J Pathol* 1993; 142: 1119-1130

Sauder DN, Kilian PL, McLane JA, Quick TW, Jakubovic H, Davis SC, Eaglstein WH, Mertz PM. Interleukin-1 enhances epidermal wound healing. *Lymphokine Res* 1990; 9: 465-473

Sayah DN, Soo C, Shaw WW, Watson J, Messadi D, Longaker MT, Zhang X, Ting K. Downregulation of apoptosis-related genes in keloid tissues. *J Surg Res* 1999; 87: 209-216

Scharffetter K, Stolz W, Lankat-Buttgereit B, Mauch C, Kulozik M, Krieg Th. *In situ* hybridization - a useful tool for studies on collagen expression in cell culture as well as in normal and altered tissue. *Virchows Arch [B] Cell Pathol* 1989; 56: 299-306

Schimmenti YHC, Madri JA, Albelda S. Cell adhesion molecule PECAM-1 modulates cell migration. *J Cell Physiol* 1992; 153: 417-428

Schiro JA, Chan BM, Roswit WR, Kassner PD, Pentland AP, Helmer ME, Eisen AZ, Kupper TS. 1991. Integrin $\alpha 2\beta 1$ (VLA-2) mediates reorganization and contraction of collagen matrices by human cells. *Cell* 1991; 67: 403-410

Schlingemann RO. Role of growth factors and the wound healing response in aged-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004; 242: 91-101

Schmid P, Itin P, Cherry G, Bi C, Cox DA. Enhanced expression of transforming growth factor- β type I and II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. *Am J Pathol* 1998; 152: 485-493

Schreiber M, Baumann B, Cotton M, Angel P, Wanger EF. Fos is an essential component of the mammalian UV response. *Embo J* 1995; 14: 5338-5349.

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 the horses. *Am J Vet Res* 2002; 63: 1564-1570

Schwettmann L and Tschesche H. Cloning and expression in *Pichia pastoris* of metalloprotease domain of ADAM9 catalytically active against fibronectin. *Protein Expr Purif* 2001; 21: 65-70

Sempowski GD, Borrello MA, Blieden TM, Barth RK, Phipps RP. Fibroblast heterogeneity in the healing wound. *Wound Rep Regen* 1995; 3: 102-131

Senet P, Verola O, Dubertret L. Cicatrisation normale et pathologique. *Physiopathol et anatomopathol* 1997; 47: 671-674

Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem* 1993; 268: 23824-23829

Shi GP, Chapman HA, Bhairi SM, DeLeeuw C, Reddy VY, Weiss S J. Molecular cloning of human cathepsin O, a novel endoproteinase and homologue of rabbit OC2. *FEBS Lett* 1995; 357: 129-134

Silaeva SA, Khatsernova BIa, Berchenko GN, Nikolaev AIa, Shekhter AB. Dynamics of nucleic acid synthesis in the granulation tissue of skin wounds in the rat. *Voprosy Meditsinskoi Khimii* 1986; 32: 126-131

Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PGW, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Remold-O'Donnell E, Salvesen GS, Travis J, Whistock JC. 2001. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. *J Biol Chem* 2001; 276: 33293-33296

Simon MJr, Jushasz I, Herlyn M, Hunyadi J. Thrombospondin receptor (CD36) expression of human keratinocytes during wound healing in a SCID mouse/human skin repair model. *J Dermatol* 1996; 23: 305-309

Simpson DM, Ross R. The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. *J Clin Invest* 1972; 5: 2009-2023

Singer II. The fibronexus: A transmembrane association of fibronectin-containing fibers and bundles of 5 nm microfilaments in hamster and human fibroblasts. *Cell* 1979; 16: 675-685

Singer II, Kawka DW, Kazazis DM, Clark RAF. *In vivo* codistribution of fibronectin and actin fibers in granulation tissue: Immunofluorescence and electron microscope studies of the fibronexus at the myofibroblast surface. *J Cell Biol* 1984; 98: 2091-2106

Sires UI, Griffin GL, Broekelmann TJ, Mecham RP, Murphy G, Chung AE, Welgus HG, Senior RM. Degradation of entactin by matrix metalloproteinases. Susceptibility to matrilysin and identification of cleavage sites. *J Biol Chem* 1993; 268: 2069-2074

Soo C, Sayah DN, Zhang X, Beanes SR, Nishimura I, Dang C, Freymiller E, Ting K. The identification of novel wound-healing genes through differential display. *Plast Reconstr Surg* 2002; 110: 787-797

Soo C, Shaw WW, Zhang X, Longaker MT, Howard EW, Ting K. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105: 638-647

Soo C, Shaw WW, Freymiller E, Longaker MT, Bertolami CN, Chiu R, Tieu A, Ting K. Cutaneous rat wounds express c49a, a novel gene with homology to the human melanoma differentiation associated gene, mda-7. *J Cell Biochem* 1999; 74:1-10

Spradling KD, McDaniel AE, Lohi J, Pilcher BK. Epsin 3 is a novel extracellular matrix-induced transcript specific to wounded epithelia. *J Biol Chem* 2001; 276: 29257-29267

Stahle-Bäckdahl M, Parks WC. 92 kDa gelatinase is actively expressed by eosinophils and secreted by neutrophils in invasive squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 142: 995-1000

Stahle-Bäckdahl M, Inoue M, Giudice GJ, Parks WC. 92 kDa gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of the 180 kDa bullous pemphigoid autoantigen (type XVII collagen). *J Clin Invest* 1994; 93: 2202-2230

Steel CM, Robertson ID, Thomas J, Yovich JV. Effect of topical rh-TGF- β 1 on second intention wound healing in horses. *Aust Vet J* 1999; 77: 734-737

Stelnicki EJ, Arbeit J, Cass DL, Saner C, Harrison M, Largman C. Modulation of the human homeobox genes PRX-2 and HOXB13 in scarless fetal wounds. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 57-63

Stitt AW, Graham D, Gardiner TA. Ocular wounding prevents pre-retinal neovascularization and upregulates PEDF expression in the inner retina. *Mol Vis* 2004; 28: 432-438

Streuli CH, Schmidhauser C, Kobrin M, Bissell MJ, Derynck R. Extracellular matrix regulates expression of the TGF- β 1 gene. *J Cell Biol* 1993; 120: 253-260

Theoret CL. Growth factors in cutaneous wound repair. *Compendium* 2001a; 23: 383-389

Theoret CL. Growth factors in pathologic wound repair in horses. *Compendium* 2001b; 23: 479-485

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* 2001c; 30: 269-277

Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, Gordon JR. Preliminary observations on expression of transforming growth factors β ₁ and β ₃ in equine full-thickness skin wounds healing normally or with exuberant granulation tissue. *Vet Surg* 2002a; 31: 266-273

Theoret CL, Barber SM, Gordon JR. Temporal localization of immunoreactive transforming growth factor β ₁ in normal equine skin and in full-thickness dermal wounds. *Vet Surg* 2002b; 31: 274-280

Thomas DW, Hopkinson I, Harding KG and Shepherd JP. The pathogenesis of hypertrophic/keloid scarring. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1994; 23: 232-236

Timmermann M, Buck F, Sorg C, Hogger P. Interaction of soluble CD163 with activated T lymphocytes involves its association with non-muscle myosin heavy chain type A. *Immunol Cell Biol* 2004; 82: 479-487

Tonnesen MG, Anderson DC, Springer TA, Knelder A, Avdi N, Henson PM. Adherence of neutrophils to cultured human microvascular endothelial cells. Stimulation by chemotactic peptides and lipid mediators and dependence upon the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family. *J Clin Invest* 1989; 83: 637-646

Tredget EE, Nedelec B, Scott PG, Ghahary A. Hypertrophic scars, keloids, and contractures. *Wound Healing* 1997; 77: 701-730

Tsou R, Cole JK, Nathens AB, Isik FF, Heimbach DM, Engrav Lh, Gibran NS. Analysis of hypertrophic and normal scar gene expression with cDNA microarrays. *J Burn Care Rehabil* 2000; 21: 541-550

Tuan TL, Nichter LS. The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation. *Mol Med Today* 1998; 4: 19-24

Unemori EN, Eshani N, Wang M, Lee S, McGuire J, Amento EP. Interleukine-1 and transforming growth factor-alpha: synergistic stimulation of metalloproteinases, PGE₂, and proliferation in human fibroblasts. *Exp Cell Res* 1994; 210: 166-171

Uyeno LA, Newman-Keagle JA, Cheung I, Hunt TK, Young DM, Boudreau N. Hox D3 expression in normal and impaired wound healing. *J Surg Res* 2001; 100: 46-56

van den Boom R, Wilmink JM, O'Kane S, Wood J, Ferguson MW. Transforming growth factor- β levels during second-intention healing are related to the different course of wound contraction in horses and ponies. *Wound Rep Regen* 2002; 10: 188-194

Villalva C, Touriol C, Seurat P, Tremat P, Delsol G, Brousset P. Increased yield of PCR products by addition of T4 gene 32 protein to the SMARTTM PCR cDNA synthesis system. *Biotechniques* 2001; 31: 81-86

Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem* 2003; 376: 1-14

Wang JF, Olson M, Reno C, Kulyk W, Wright JB, Hart DA. Molecular and cell biology of skin wound healing in a pig model. *Connect Tissue Res* 2000; 4: 195-211

Wenczak BA, Lynch JB, Nanney LB. Epidermal growth factor receptor distribution in burn wounds: Implication for growth factor-mediated repair. *J Clin Invest* 1992; 90: 2392-2401

Werb Z, Banda MJ, Jones PA. Degradation of connective tissue matrices by macrophages. I. Proteolysis of elastin, glycoproteins and collagen by proteinases isolated from macrophages. *J Exp Med* 1980; 152: 1340-1357

Werner S, Peters KG, Longaker MT, Fuller-Pace F, Banda MJ, Williams LT. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6896-6900

Werner S, Smola H, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, Williams LT. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science* 1994; 266: 819-822

White JM. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 598-606

Wilhelm SM, Collier IE, Kronberger A, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Bauer EA, Goldberg GI. Human skin fibroblast stromelysin: Structure, glycosylation, substrate specificity, and differential expression in normal and tumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6725-6729

Wilmink JM, Stolk PW TH, Van Weeren PR, Barneveld A. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopic aspects. *Equine Vet J* 1999a; 31: 53-60

Wilmink JM, Van Weeren PR, Stolk PW TH, Van Mil FN, Barneveld A. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. *Equine Vet J* 1999b; 31: 61-67

Wilmink JM, Nederbragt H, Van Weeren PR, Stolk PW TH, Barneveld A. Differences in wound contraction between horses and ponies: the *in vitro* contraction capacity of fibroblasts. *Equine Vet J* 2001; 33: 499-505

Wilson DA, Adelstein EH, Keegan KG, Barrett BA, Kutz RR. *In vitro* and *in vivo* effects of activated macrophage supernatant on distal limb wounds of ponies. *Am J Vet Res* 1996; 57: 1220-1224

Winter GD. Epidermal regeneration studied in the domestic pig. In Maibach HI, Rovee DT, (eds). *Epidermal Wound Healing*. Chicago, Yearbook Medical Publishing, 1972, pp.71-112

Yamagata M, Saga S, Kato M, Bernfield M, Kimata K. Selective distributions of proteoglycans and their ligands in pericellular matrix of cultured fibroblasts. Implications for their roles in cell-substratum adhesion. *J Cell Sci* 1993; 106: 55-65

Yvon AM, Walker JW, Danowski B, Fagerstrom C, Khodjakov A, Wadsworth P. Centrosome reorientation in wound-edge cells is cell type specific. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 1871-1880

Yvorchuk-St Jean K, Gaughan E, St Jean G, Frank R. Evaluation of a porous bovine collagen membrane bandage for management of wounds in horses. *Am J Vet Res* 1995; 56: 1663-1667

Zhang HY, Phan SH. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor β_1 . *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21: 658-665

Zhang B, Liu DW, Wang ZG, Zhu PF, Zhou JH, Jiang JX. Construction of the subtractive cDNA library of injured adult and fetal rabbit skins. *Chin J Traumatol* 2004; 7: 13-17

