

Université de Montréal

**CONTRIBUTION DE L'HYPOXIE À LA CICATRISATION
CUTANÉE ANORMALE CHEZ LE CHEVAL.
MÉTHODES PHYSIQUES D'ÉVALUATION.**

par

CHRISTOPHE CELESTE

**Département de biomédecine
Faculté de médecine vétérinaire**

**Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de
philosophiae doctor (Ph.D.)
en sciences vétérinaires**

Mars 2011

© Christophe Celeste, 2011

**Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire**

Cette thèse intitulée

**CONTRIBUTION DE L'HYPOXIE À LA CICATRISATION
CUTANÉE ANORMALE CHEZ LE CHEVAL.
MÉTHODES PHYSIQUES D'ÉVALUATION.**

Présentée par

CHRISTOPHE CELESTE

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

MONIQUE DORÉ, présidente – rapporteuse

CHRISTINE THEORET, directrice de recherche

DEREK BOERBOOM, codirecteur

MARIE-ÈVE NADEAU, membre du jury

CHARLES DOILLON, examinateur externe

MALCOLM GAINS, représentant du doyen

RÉSUMÉ / SUMMARY

MOTS CLÉS / KEY WORDS

RÉSUMÉ & MOTS CLÉS

La guérison des plaies cutanées appendiculaires chez le cheval, à la différence de celle des plaies corporelles, se complique régulièrement. Un retard de cicatrisation s'y observe et un tissu de granulation exubérant tend à s'y développer, le tout menant à une cicatrice pathologique hypertrophiée. La pathogénie exacte du tissu de granulation exubérant chez le cheval demeure inconnue à ce jour. Une hypoxie tissulaire pourrait favoriser son développement tout comme elle semble contribuer au développement de cicatrices cutanées pathologiques similaires observées chez l'Homme.

L'objectif de cette étude était d'évaluer la perfusion vasculaire et la disponibilité locale en oxygène de plaies cutanées appendiculaires et corporelles en cours de cicatrisation normale et pathologique chez le cheval, à l'aide de la thermographie infrarouge et de la spectroscopie par réflectance dans le proche infrarouge. Six juments âgées de 3 à 4 ans ont été utilisées. Trois plaies cutanées ont été créées à l'aspect dorso-latéral du canon des membres thoraciques (plaies appendiculaires), et sur la paroi costale de l'un des hémithorax (plaies corporelles). Chez chaque jument, un canon a été aléatoirement bandé dans le but d'induire la formation de tissu de granulation exubérant dans les plaies s'y trouvant, tel que rapporté. La perfusion vasculaire et la disponibilité locale en oxygène ont été évaluées séquentiellement par thermographie infrarouge et spectroscopie par réflectance dans le proche infrarouge pour chaque plaie de chaque site (thorax; membre bandé; membre non bandé) au cours du processus de cicatrisation cutanée.

Un modèle linéaire à doubles mesures répétées associé à une correction séquentielle de Bonferroni a révélé des différences significatives de perfusion vasculaire et de disponibilité locale en oxygène entre les plaies appendiculaires et corporelles. Ainsi la perfusion vasculaire et la disponibilité locale en oxygène étaient significativement plus élevées dans les plaies corporelles ($P < 0.05$) et la perfusion vasculaire était

significativement plus élevée dans les plaies appendiculaires non bandées que dans celles bandées ($P < 0.05$). Nous avons récemment rapporté une plus grande occlusion de la micro-vascularisation au niveau des plaies appendiculaires chez le cheval. Nous rapportons maintenant que la perfusion vasculaire et la disponibilité locale en oxygène sont significativement inférieures dans les plaies appendiculaires, en particulier lorsqu'un tissu de granulation exubérant s'y développe. Compilés, ces résultats sous-tendent l'hypothèse que les plaies appendiculaires souffrent d'une altération de la perfusion vasculaire à l'origine possible d'une hypoxie tissulaire qui pourrait favoriser une cicatrisation cutanée anormale, telle la formation d'un tissu de granulation exubérant.

Mots clés :

Cicatrisation cutanée, plaie, oxygène, perfusion, cheval, spectroscopie, thermographie, granulation exubérante

SUMMARY & KEY WORDS

Cutaneous wound healing in horse limbs is often perturbed by the development of exuberant granulation tissue while body wounds tend to repair uneventfully. A delay in healing is usually observed in horse limb wounds, which tend to develop exuberant granulation tissue and excessive scarring. The events leading to exuberant granulation tissue formation in horses are not fully elucidated. Tissue hypoxia has been proposed as a major contributing factor as it appears to contribute to the development of similar abnormal skin scarring in human.

The objective of this study was to investigate skin blood flow and tissue oxygen availability in normal / abnormal healing of full-thickness wounds created on the horse limb and body, using infrared thermography and near infrared reflectance spectroscopy. Six healthy, 3- to 4-year-old mares were used for the experiment. Three full-thickness cutaneous wounds were surgically created on the dorso-lateral surface of each metacarpal area (limb wounds) and on the lateral thoracic wall (body wounds). One randomly chosen distal forelimb was then left to heal by second intention without bandage, while the contralateral limb was bandaged postoperatively to induce the formation of exuberant granulation tissue and lead to excessive scarring. Thermal and spectroscopic data were collected from both anatomic sites (limb without bandage, bandaged limb, thoracic wall) at specific times following wounding.

Mean changes in skin blood flow and tissue oxygen availability at specific wound sites over time were compared by use of repeated measures ANOVA with anatomical location and wound management as within-subject factors. *A priori* contrasts, submitted to Bonferroni sequential correction, were then used to compare pre-selected individual means. The statistical analysis revealed that there were significant differences in skin blood flow and tissue oxygen availability within wounds. Skin blood flow and tissue oxygen availability were significantly increased within body

over limb wounds ($P < 0.05$). Skin blood flow was significantly increased within unbandaged limb over bandaged limb wounds ($P < 0.05$). We have recently reported a greater occlusion of microvessels in limb wounds in horses. We report here that skin blood flow and tissue oxygen availability are significantly inferior in limb wounds in horses, especially when exuberant granulation develops. Taken together, these results suggest that equine limb wounds may suffer from altered vascular perfusion and tissue hypoxia, which could favor abnormal skin healing and exuberant granulation tissue development.

Key words:

Skin healing, wound, oxygen, horse, spectroscopy, thermography, exuberant granulation tissue

TABLE DES MATIÈRES

JURY	-i
RÉSUMÉ / SUMMARY	-ii
Résumé / Mots clés	-iii
Summary / Key words	-v
TABLE DES MATIÈRES	-vii
LISTE DES TABLEAUX	-xv
LISTE DES FIGURES	-xvii
LISTE DES SIGLES & ABBRÉVIATIONS	-xxii
REMERCIEMENTS	-xxvii
INTRODUCTION	-30
RECENSION LITTÉRAIRE	-36
Section I – L’OXYGÈNE – PLUS QU’UN SIMPLE NUTRIMENT	-37
I / 1 – L’oxygène, qu’est-ce que c’est ?	-37
I / 1 / A – L’oxygène : un nutriment essentiel	-37
I / 1 / B – Le facteur inductible par l’hypoxie	-37
I / 1 / C – L’oxyde nitrique	-41
I / 1 / D – Les dérivés actifs de l’oxygène	-43
En résumé	-46
I / 2 – Le transport de l’oxygène : de l’atmosphère aux tissus	-48
I / 2 / A – L’oxygénation sanguine	-48
I / 2 / A / i – Notions de ventilation pulmonaire	-48
I / 2 / A / ii – L’oxygène au niveau alvéolaire	-48
I / 2 / A / iii – Le transport sanguin de l’oxygène du parenchyme pulmonaire aux tissus	-49

I / 2 / A / iv – La diffusion de l'oxygène de l'environnement vasculaire aux cellules	-51
I / 2 / B – La perfusion tissulaire	-51
I / 2 / B / i – La microcirculation tissulaire	-52
I / 2 / B / i / a – Les métartérioles	-52
I / 2 / B / i / b – Les capillaires	-52
I / 2 / B / i / c – Les sphincters précapillaires	-54
I / 2 / B / i / d – Les veinules post-capillaires	-54
I / 2 / B / i / e – Les shunts artério-veineux	-54
I / 2 / B / ii – Le contrôle de la perfusion tissulaire	-55
I / 2 / B / ii / a – Régulation de la perfusion tissulaire à court-terme	-56
I / 2 / B / ii / b – Régulation de la perfusion tissulaire à long-terme	-57
I / 2 / B / ii / c – Régulateurs humoraux de la perfusion tissulaire	-58
En résumé	-58
I / 3 – Méthodes d'évaluation de l'oxygénation tissulaire dans un contexte clinique	-59
I / 3 / a – Évaluation de la perfusion microvasculaire	-59
I / 3 / A / i – Utilisation de l'imagerie Doppler	-59
I / 3 / A / i / a – La vélocimétrie laser Doppler	-59
I / 3 / A / i / b – L'imagerie par perfusion laser Doppler	-60
I / 3 / A / ii – Utilisation de l'imagerie par chatoiement / tavelures laser	-60
I / 3 / A / iii – Utilisation de l'imagerie spectrale	-61
I / 3 / A / iii / a – L'imagerie spectrale par polarisation orthogonale	-61
I / 3 / A / iii / b – L'imagerie latérale en champ sombre	-61
I / 3 / A / iv – La thermographie infrarouge	-62
I / 3 / B – Évaluation de la disponibilité locale en oxygène	-62
I / 3 / B / i – Les oxymètres à sonde polarographique et autres senseurs optiques (optodes)	-62
I / 3 / B / i / a – Les électrodes de Clark	-63
I / 3 / B / i / b – Optodes	-63

I / 3 / B / ii – Méthodes d'évaluation spectroscopique par réflectance	-63
I / 3 / B / ii / a – La spectrophotométrie par réflectance	-63
I / 3 / B / ii / b – La spectroscopie dans le proche infrarouge	-64
I / 3 / C – Évaluation de la fonctionnalité du réseau microvasculaire	-65
En résumé	-66
Section II – LA CICATRISATION CUTANÉE NORMALE CHEZ LES MAMMIFÈRES ADULTES	-67
II / 1 – Notions d'histologie cutanée	-67
II / 1 / a – L'épiderme	-67
II / 1 / A / i – Les kératinocytes	-68
II / 1 / A / ii – Les mélanocytes	-69
II / 1 / A / iii – Les cellules de Langerhans	-69
II / 1 / A / iv – Les cellules de Merkel	-69
II / 1 / B – Le derme	-70
II / 1 / C – L'hypoderme	-71
II / 1 / D – Les annexes cutanées	-71
II / 1 / D / i – Les glandes sudoripares	-71
II / 1 / D / ii – Les follicules pilo-sébacés	-72
II / 1 / D / ii / a – Le poil	-72
II / 1 / D / ii / b – Le muscle arrecteur du poil	-73
II / 1 / D / ii / c – Les glandes sébacées	-73
II / 1 / E – La vascularisation cutanée	-74
II / 1 / E / i – Le réseau artériel	-74
II / 1 / E / ii – Les réseaux veineux et lymphatiques	-75
II / 1 / F – L'innervation cutanée	-76
En résumé	-76
II / 2 – La cicatrisation cutanée normale chez les mammifères adultes	-77
II / 2 / A – L'hémostase	-78
II / 2 / B – La phase inflammatoire	-80
II / 2 / B / i – Les granulocytes ou polymorphonucléaires neutrophiles	-81

II / 2 / B / ii – Les lymphocytes	-81
II / 2 / B / iii – Les monocytes activés en macrophages	-82
II / 2 / C – La phase proliférative (ou phase productive)	-83
II / 2 / C / i – Le tissu de granulation	-85
II / 2 / C / i / a – Fibroblastes et fibroplasie	-85
II / 2 / C / i / b – Myofibroblastes et contraction	-85
II / 2 / C / i / c – Cellules endothéliales et angiogenèse	-86
II / 2 / C / ii – La ré-épithélialisation et les kératinocytes	-87
II / 2 / D – La phase de remodelage	-89
En résumé	-91
SECTION III – LA CICATRISATION CUTANÉE PATHOLOGIQUE	-92
CHEZ LES MAMMIFÈRES ADULTES – UNE AFFAIRE D'OXYGÈNE ?	
III / 1 – Diversité de la cicatrisation cutanée pathologique chez les	-92
mammifères adultes: Homme <i>versus</i> cheval	
III / 1 / A – La cicatrisation cutanée pathologique chez l'Homme	-92
III / 1 / A / i – Les plaies chroniques	
III / 1 / A / i / a – Qu'est-ce qu'une plaie chronique ?	-92
III / 1 / A / i / b – Pathogénie simplifiée des plaies chroniques	-93
III / 1 / A / ii – Les chéloïdes	-95
III / 1 / A / ii / a – Qu'est-ce qu'une chéloïde ?	-95
III / 1 / A / ii / b – Pathogénie simplifiée des chéloïdes	-96
III / 1 / B – La cicatrisation cutanée pathologique chez le cheval	-98
III / 1 / B / i – Prédisposition génétique et autres types de prédisposition	-99
III / 1 / B / i / a – Spécificités raciales	-99
III / 1 / B / i / b – Développement privilégié dans des sites anatomiques particuliers	-100
III / 1 / B / ii – Pathogénie du tissu de granulation exubérant équin	-102
III / 1 / B / ii / a – Une perturbation de la phase inflammatoire ?	-102
III / 1 / B / ii / b – Une perturbation de la phase proliférative ?	-103
III / 1 / B / ii / c – Une perturbation de la phase de remodelage ?	-104

III / 3 / B / i – Les infections	-117
III / 3 / B / ii – Les soins locaux	-119
En résumé	-120
HYPOTHÈSES & OBJECTIFS	-121
Hypothèses	-122
Objectifs	-123
ARTICLES	-124
Article 1 : Regional differences in wound oxygenation during normal healing in an equine model of cutaneous fibroproliferative disorder	-125
Article 2 : Kinetics of blood flow and anatomical-site differences in tissue perfusion during wound healing in an equine model of cutaneous fibroproliferative disorder	-156
DISCUSSION GÉNÉRALE	-196
A – Discussion sur les études réalisées	-197
A / 1 – Discussion autour des résultats obtenus	-197
A / 2 – Limites des études réalisées	-199
B – Discussion sur de potentiels axes de recherche	-203
B / 1 – Fonctionnalité du réseau microvasculaire et variations anatomiques vasculaires et microvasculaires	-203
B / 2 – Variabilité du microbisme lésionnel	-203
B / 3 – Le myofibroblaste cutané équin	-205
B / 4 – Statut redox lésionnel et cicatrisation cutanée pathologique	-211
B / 5 – La voie du HIF dans la guérison cutanée du cheval	-212
B / 6 – La transition épithéliomésenchymateuse	-214
C – Discussion sur de potentielles approches thérapeutiques	-216
C / 1 – L'oxygénothérapie hyperbare	-216
C / 2 – La thérapie par pression négative	-217

CONCLUSION	-219
BIBLIOGRAPHIE	-222
APPENDICES & ANNEXES	-cclxxi
Annexe I – Les cellules inflammatoires : les facteurs de recrutement, les facteurs sécrétés, les fonctions principales	-cclxxii
Annexe II – Les facteurs activant la NADPH – oxydase	-cclxxiii
Annexe III – Cytokines & facteurs de croissance, leurs fonctions principales, les principales cellules productrices	-cclxxiv
Annexe IV – Évolution clinique des plaies étudiées	-cclxxvi
Annexe V – Comparaison de la multiplication des fibroblastes cutanés équins appendiculaires et corporels dans des conditions de normoxie et d'hypoxie	-cclxxvii

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Les cellules inflammatoires : les facteurs de recrutement, les facteurs sécrétés, les fonctions principales	-cclxxii
Tableau II	Les principaux facteurs activant la NAD(P)H – oxydase	-cclxxiii
Tableau III	Cytokines & facteurs de croissance : leurs fonctions principales, les principales cellules productrices	-cclxxiv

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Tissu de granulation exubérant chez un cheval	-33
Figure 2	Chéloïde humaine	-34
Figure 3	Schéma simplifié de la voie de signalisation du HIF	-39
Figure 4	Schéma simplifié de la voie de signalisation du NO	-42
Figure 5	Schéma simplifié des effets cellulaires des ROS	-46
Figure 6	Schéma simplifié de la régulation de l'activité des PHD	-47
Figure 7	Représentation schématique de la microcirculation tissulaire	-53
Figure 8	Représentation schématique simplifiée de la peau d'un mammifère	-67
Figure 9	Coupes histologiques d'un follicule pilo-sébacé	-72
Figure 10	Représentation schématique simplifiée de la vascularisation cutanée	-74
Figure 11	Représentation schématique simplifiée de la vascularisation particulière d'une papille du derme	-75
Figure 12	Représentation schématique simplifiée de la phase inflammatoire débutante de la guérison cutanée	-80
Figure 13	Représentation schématique simplifiée de la phase proliférative	-84

Figure 14	Représentation schématique simplifiée de la phase de remodelage	-89
Figure 15	Plaie cutanée pathologique humaine mixte	-93
Figure 16	Plaies cutanées épithélialisées pathologiques humaines	-95
Figure 17	Plaie cutanée pathologique chez le cheval	-98
Figure 18	Évolution de la désoxyhémoglobine (dHb) dans le temps pendant la cicatrisation cutanée – plaies appendiculaires & thoraciques – spectroscopie dans le proche infrarouge	-152
Figure 19	Évolution de l'oxyhémoglobine (HbO ₂) dans le temps pendant la cicatrisation cutanée – plaies appendiculaires & thoraciques – spectroscopie dans le proche infrarouge	-153
Figure 20	Évolution de l'hémoglobine totale (tHb) dans le temps pendant la cicatrisation cutanée – plaies appendiculaires & thoraciques – spectroscopie dans le proche infrarouge	-154
Figure 21	Évolution de la saturation en oxygène (StO ₂) dans le temps pendant la cicatrisation cutanée – plaies appendiculaires & thoraciques – spectroscopie dans le proche infrarouge	-155
Figure 22	Image thermographique prise au niveau de plaies corporelles	-187
Figure 23	Évolution de la température cutanée moyenne des plaies chirurgicales appendiculaires et thoraciques non bandées	-188

Figure 24	Évolution de la température cutanée moyenne des plaies chirurgicales appendiculaires bandées et non bandées	-189
Figure 25	Évolution de la température cutanée de la région périphérique des plaies chirurgicales appendiculaires et thoraciques non bandées	-190
Figure 26	Évolution de la température cutanée de la région périphérique des plaies chirurgicales appendiculaires bandées et non bandées	-191
Figure 27	Évolution de la température cutanée du site chirurgical complet des plaies chirurgicales thoraciques non bandées et des plaies appendiculaires bandées et non bandées	-192
Figure 28	Évaluation qualitative de l'angiogenèse par immunofluorescence sur coupe tissulaires au niveau des plaies corporelles, appendiculaires non bandées, appendiculaires bandées, à TO	-193
Figure 29	Évaluation qualitative de l'angiogenèse par immunofluorescence sur coupe tissulaires au niveau des plaies corporelles, appendiculaires non bandées, appendiculaires bandées, à 1 semaine	-194
Figure 30	Évaluation qualitative de l'angiogenèse par immunofluorescence sur coupe tissulaires au niveau des plaies corporelles, appendiculaires non bandées, appendiculaires bandées, à 4 semaines	-195
Figure 31	Évolution clinique des plaies étudiées pendant la réalisation des projets de recherche	-cclxxvi

Figure 32 Comparaison de la multiplication des fibroblastes cutanés -cclxxviii
équins appendiculaire (canon) et corporels (thorax) dans
des conditions de normoxie (20% O₂) et d'hypoxie (1% O₂)

LISTE DES SIGLES & DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
AV	Vascularisation cutanée de type artério-veineuse
Ca ²⁺	Ion calcium
CO	Monoxyde de carbone
CO ₂	Dioxyde de carbone
CS	Cellule souche
CSR	Réponse cellulaire adaptative dite de stress (<i>Cellular Stress Response</i>)
CTAD	Domaine de transactivation C-terminal (<i>C-Terminal Transactivation Domain</i>)
CTGF	Facteur de croissance du tissu conjonctif (<i>Connective Tissue Growth Factor</i>)
dHb	Désoxyhémoglobine
ECAD	E-cadhérine
EGF	Facteur de croissance épidermique (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
END-1	Endothéline 1
eNOS	Synthase de l'oxyde nitrique endothéliale (<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>)
Fe ²⁺	Ion ferreux
Fe ³⁺	Ion ferrique
FGF	Facteur de croissance fibroblastique (<i>Fibroblast Growth Factor</i>)
FIH	Asparaginyle hydroxylase
GAG	Glycosaminoglycane
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HA	Acide hyaluronique
Hb	Hémoglobine
HbO	Oxyhémoglobine
HBOT	Oxygénothérapie hyperbare (<i>HyperBaric Oxygen Therapy</i>)
H ⁺	Hydrogène
HCO ₃ ⁻	Ion carbonate
HIF	Facteur inductible par l'hypoxie (<i>Hypoxia Inducible Factor</i>)
HO ⁻	Ion hydroxyle
HO ₂ ⁻	Anion peroxyde
HRE	Éléments de réponse à l'hypoxie (<i>Hypoxia Response Elements</i>)

HTCM	Hypoxie tissulaire chronique moyenne
hTERT	Téломérase transcriptase inverse humaine (<i>humane TElomerase Reverse Transcriptase</i>)
ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire (<i>InterCellular Adhesion Molecule</i>)
IGF-1	Facteur de croissance de type insuline -1 (<i>Insuline-like Growth Factor 1</i>)
IL	Interleukine
INF γ	Interféron γ
iNOS	Synthase de l'oxyde nitrique inductible
KGF	Facteur de croissance des kératinocytes (<i>Keratinocyte Growth Factor</i>)
LDF	Vélocitométrie Doppler (<i>Laser Doppler Flowmetry</i>)
LDI	Imagerie par perfusion laser Doppler (<i>Laser Doppler Imaging</i>)
LEU	Leucocyte
LPS	Lipopolysaccharide bactérien
LSI	Imagerie par tavelures laser (<i>Laser Speckle Imaging</i>)
LYM	Lymphocyte
LYMB	Lymphocyte de type B
LYMT $\gamma\delta$	Lymphocyte T gamma-delta épidermique
LYMT	Lymphocyte de type T
MON/MAC	Macrophage dérivé de monocyte
MAS	Mastocyte
MEC	Matrice extracellulaire
MECp	Matrice extracellulaire provisoire
MMP	Métalloprotéinase
MON	Monocyte
MRI	Muscle respiratoire inspiratoire
NAD / NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NGF	Facteur de croissance nerveux (<i>Nerve Growth Factor</i>)
NIRS	Spectroscopie par réflectance dans le proche infrarouge (<i>Near Infrared Reflectance Spectroscopy</i>)
nNOS	Synthase de l'oxyde nitrique neurogénique (<i>neuronal Nitric Oxyde Synthase</i>)

NO	Monoxyde d'azote, oxyde nitrique (<i>Nitric Oxide</i>)
NOS	Synthase de l'oxyde nitrique (<i>Nitric Oxide Synthase</i>)
NUTR	Vascularisation cutanée de type nutritif
O ₂	Dioxygène
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
ObsCli	Observation clinique
ODD	Domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (<i>Oxygen Dependent Domain</i>)
OPSI	Imagerie spectrale par polarisation orthogonale (<i>Orthogonal Polarization Spectral Imaging</i>)
p21	Inhibiteur 1 de la cycline kinase dépendante
p26S	Protéasome 26S
PA	Activateur du plasminogène (<i>Plasminogen Activator</i>)
PaCO ₂	Pression artérielle en dioxyde de carbone
PAI	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène (<i>Plasminogen Activator Inhibitor</i>)
PaO ₂	Pression artérielle en dioxygène
P _A O ₂	Pression partielle alvéolaire en dioxygène
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes (<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>)
PG	Protéoglycane
PIGF	Facteur de croissance placentaire (<i>Placental Growth Factor</i>)
PHD	Prolyl hydroxylase dépendant de l'oxygène
PMN	Polymorphonucléaire neutrophile
POC	Plethysmographie par occlusion veineuse
P _T O ₂	Pression partielle tissulaire en dioxygène
pVHL	Protéine de Von Hippel Lindau
P _V O ₂	Pression partielle en dioxygène du sang veineux capillaire pulmonaire
RNOS	Dérivés actifs du monoxyde d'azote (<i>Reactive Nitric Oxide Species</i>)
ROS	Dérivés actifs de l'oxygène (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RS	Spectrophotométrie par réflectance (<i>Reflectance Spectroscopy</i>)
SDF	Facteur dérivé des cellules stromales (<i>Stromal cell Derived Factor</i>)

SDI	Imagerie latérale en champ sombre (<i>Sidestream Dark-filed Imaging</i>)
SLPI	Inhibiteur sécréteur de protéase de leucocyte (<i>Secretory Leucocyte Protease Inhibitor</i>)
StO ₂	Saturation en dioxygène
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGE	Tissu de granulation exubérant
TGF	Facteur de croissance transformant (<i>Transforming Growth Factor</i>)
TGFβR	Récepteur du facteur de croissance transformant β
tHb	Hémoglobine totale
ThIR	Thermographie infrarouge
TIMP	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases (<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>)
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale α (<i>Tumor Necrosis Factor α</i>)
TO	Oxygénothérapie tissulaire locale (<i>Topic Oxygen therapy</i>)
TPN	Thérapie par pression négative
VCAM	Molécule d'adhésion à l'endothélium vasculaire (<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>)
VEGF	Facteur de croissance des endothéliums vasculaires (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
αSMA	α actine musculaire lisse (<i>α Smooth Muscle Actin</i>)

REMERCIEMENTS

A Madame la Professeure Monique Doré, présidente du jury,

De la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Montréal,

qui nous a fait l'honneur de s'intéresser à notre travail et d'accepter la présidence de notre jury.

Hommages respectueux.

A Madame la Professeure Christine Theoret, directrice de recherche,

De la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Montréal,

qui a inspiré ce travail, votre bienveillance, votre confiance, vos connaissances, vos encouragements et votre disponibilité auront été de précieux atouts pour sa réalisation.

Puisse ce travail vous inspirer une quelconque satisfaction, nous vous l'adressons néanmoins en gage de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Derek Boerboom, codirecteur,

De la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Montréal,

qui a encadré ce travail, votre expertise et vos conseils judicieux auront été de précieux atouts pour sa réalisation. Puissiez-vous trouver dans ce travail le témoignage de notre sincère admiration.

A Madame la Professeure Marie-Ève Nadeau, membre du jury,

De la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Montréal,

qui nous a fait l'honneur de s'intéresser à notre travail et d'accepter de participer à notre jury.

A Monsieur le Professeur Charles Doillon, examinateur externe,

Du centre hospitalier de l'université Laval,

qui nous a fait l'honneur de s'intéresser à notre travail et d'accepter de participer à notre jury, à titre d'expert.

A Christine, ma directrice de recherche

Je t'adresse mes remerciements les plus sincères pour ton encadrement exceptionnel, ta grande disponibilité, ton intégrité, ton écoute attentive, tes précieux conseils, tant scientifiques, que professionnels ou sur la vie en général. Faire des choix s'avère parfois difficile, et se révèle souvent non dénué de conséquence. Merci de m'avoir fait confiance jusqu'au bout de ce projet.

A François, mon conjoint

Ce travail te doit beaucoup ... qu'il soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ces années de compréhension, de privations et d'efforts communs.

A Jacques, Sylviane et Carine, ma famille

Je vous dédie cette thèse. Votre soutien inébranlable et votre confiance durant toutes ces années d'étude resteront à jamais les plus beaux cadeaux que la vie m'ait faits. Rien n'aurait été possible sans vous. Je vous aime.

A Geneviève, Julie, Suzie et Tatiana, mes amies

Vous êtes à l'image des mousquetaires ... toujours fidèles et toujours prêtes ! Votre amitié m'est un bien précieux.

A Karine, ma collègue

Je te remercie pour ton soutien et ta bonne humeur constante, ainsi que pour les nombreuses discussions que nous avons eues, tant scientifiques, techniques que personnelles.

INTRODUCTION

La guérison tissulaire figure parmi les processus biologiques les plus complexes qui soient (Gurtner2008). On la divise en quatre phases (hémostase, inflammation, prolifération et remodelage) qui s'articulent, se succèdent les unes aux autres tout en se chevauchant partiellement (Guo2010). La guérison tissulaire apparaît donc comme une succession d'évènements biologiques déterminés finement coordonnés les uns aux autres, qui, de façon étonnante et remarquable (Gurtner2008), ont très peu évolué au fil du temps et dans la phylogénie (Ting2005), et se révèlent d'une similarité étonnante d'un tissu / organe à l'autre, qu'il s'agisse donc de peau, de foie, de poumon ou de cœur, et d'un stimulus destructeur à l'autre, que l'on ait à faire à une lacération, une contusion, une brûlure chimique ou physique (Gurtner2008).

La guérison tissulaire mène souvent à la formation d'un tissu fibreux de remplacement – on parle alors de **réparation tissulaire** –, mélange de fibroblastes et d'une matrice extracellulaire (MEC) faite principalement de collagène (Gurtner2008). Ce tissu fibreux de remplacement est communément appelé tissu fibreux cicatriciel ou cicatrice ; il s'avère généralement peu fonctionnel. Dans certains cas, la guérison tissulaire mène à la recréation des tissus lésés plutôt qu'à leur réparation – on parle alors de **régénération tissulaire** –, permettant à ces derniers de recouvrer leur fonctionnalité pleine et entière. La plupart des grands mammifères, à l'image du cheval, possèdent la machinerie moléculaire nécessaire à la régénération tissulaire. Pour preuve, ils sont capables de régénérer une grande partie de leurs tissus, s'ils sont lésés, pendant leur phase d'embryogenèse et au début de leur vie fœtale (< tiers de la gestation). Ils perdent malheureusement, par la suite, une grande partie de leurs capacités régénératrices (Colwell2008 ; Gurtner2007), conservées cependant à divers degrés (de complètes à très partielles) dans certains tissus particuliers (foie, tube digestif, rein, muscle, peau, système nerveux) (Bergmann2010). L'immaturation du système immunitaire (Mescher2005), mais aussi les différences environnementales (Herdrich2010 ; Chen2005 ; Schiller2004 ; Scheid2002 ; Liechty2000a ; Liechty2000b ; Liechty1998) ou d'expression génomique, et donc de transcriptome de protéome et de phénotype (Colwell2008 ; Moulin2001 ; Scheid2000) des cellules de la guérison, ainsi que la proportion effective de cellules indifférenciées ou peu différenciées dans les premiers stades du développement ou

dans certains tissus, pourraient expliquer tout ou partie des différences observées (*Gurtner2008*). La production rapide de tissu fibreux cicatriciel, qui caractérise la réparation tissulaire chez la plupart des grands mammifères, prévient la régénération tissulaire (*Klapka2006 ; Stichel1998*). Certes le tissu fibreux cicatriciel confère un avantage indéniable à la survie à court terme de l'individu affecté puisqu'il limite rapidement et l'invasion de l'organisme par les microorganismes infectieux et la distorsion des tissus lésés et avoisinants (*Gurtner2008*). Cependant, de par ses piètres qualités fonctionnelles, le tissu fibreux cicatriciel est souvent à l'origine de dysfonctionnement et/ou d'incapacité tissulaire et/ou organique permanent, parfois important, aux répercussions souvent significatives sur les aptitudes physiques, la qualité de vie et donc la survie à long terme des individus affectés.

La guérison tissulaire se dérègle rarement (*Trent2003*), malgré son évidente complexité. Certaines perturbations surviennent cependant, parfois, qui mènent à une réparation tissulaire anormale, alors qualifiée de pathologique. On l'observe au niveau de la peau. Lorsque la cicatrisation cutanée se dérègle, la plaie cutanée se retrouve généralement piégée dans une des phases de la guérison tissulaire précédemment citées. Une cicatrice cutanée anormale, dite pathologique, se développe, de type atrophique ou hypertrophique (*Atiyeh2005 ; Tanaka2004*).

La cicatrisation cutanée pathologique est communément rencontrée chez l'Homme comme chez le cheval. Elle affecte des dizaines de millions de personnes dans le monde et se révèle d'un poids économique considérable, tant pour les grands systèmes de santé (*Guo2010 ; Sen2009a ; Aarabi2007 ; Klein2003*) (ex. Etats-Unis d'Amérique / trois milliards de dollars par année) (*Menke2007 ; Mathieu2006*) que pour l'industrie équine (*Perkins2005*). De nombreux chevaux sont exclus de carrières sportives lucratives parce qu'ils présentent une cicatrisation cutanée pathologique débilite.

Chez le cheval, la cicatrisation cutanée pathologique fait souvent suite au développement d'un tissu de granulation exubérant (TGE) (figure 1); elle est donc principalement hypertrophique.



Figure 1. Tissu de granulation exubérant s'étant développé dans une plaie cutanée située à l'aspect dorsal du jarret gauche. Cheval Quarter Horse de 6 ans. Blessure > 1 an. Crédit photo : Christophe Céleste.

Le TGE équin se comporte comme une tumeur bénigne et ressemble à la chéloïde de l'Homme (figure 2): la plaie qui en est atteinte voit ses fibroblastes dermiques proliférer et synthétiser une MEC à l'excès plutôt que se différencier en myofibroblastes ou être éliminés par apoptose après complétion de leur tâche. Un tissu fibreux cicatriciel surabondant se développe (Lepault2005 ; VandenBoom2002 ; Theoret2001 ; Wilmink1999b).



Figure 2. Chéloïde humaine s'étant développée suite à une blessure cutanée située au niveau du cou. Crédit photo : New Zealand Dermatological Society Incorporated.

Comme chez l'Homme (*Juckett2009 ; Butler2008 ; Aarabi2007 ; Berman2007 ; Atiyeh2005 ; Bayat2003 ; Brissett2001 ; Niessen1999*), une prédisposition génétique est suspectée dans la pathogénie de la cicatrisation cutanée pathologique hypertrophique chez le cheval puisque seuls certains individus (cheval *versus* poney) (*Wilmink2008 ; Wilmink2005 ; Wilmink2002 ; Wilmink1999a ; Bertone1985*) en sont affectés. Une (des) cause(s), autre(s) que génétique, est (sont) aussi suspectée(s) puisque le TGE ne se développe que dans certaines régions anatomiques bien spécifiques (membre *versus* corps) chez le cheval (*Lepault2005 ; Theoret2001 ; Wilmink1999a ; Jacobs 1984*).

Un certain nombre de facteurs, locaux et systémiques, affectent la cicatrisation cutanée chez l'Homme. Parmi ces facteurs figure l'oxygène (O_2) (*Guo2010*), clé de voute de la production énergétique au niveau cellulaire via l'ATP, facteur indispensable au bon fonctionnement leucocytaire via les dérivés actifs de l' O_2 (ROS), ou encore stimulant essentiel de la ré-épithélialisation des plaies cutanées (*Guo2010 ; Sen2009b ;*

Bishop2008 ; Rodriguez2008). Le manque d'O₂, encore appelé hypoxie, semble contribuer au dérèglement de la cicatrisation cutanée humaine (*Zhang2006 ; Fujiwara2005 ; Kischer1992*). Une plus grande occlusion des microvaisseaux peuplant les tissus de granulation des plaies appendiculaires du cheval (*Lepault2005*), prédisposées au développement d'un TGE (*Lepault2005 ; Theoret2001 ; Wilmink1999a ; Jacobs 1984*), a été rapportée, qui suggère une hypoxie tissulaire locale. Le travail qui suit se propose d'évaluer, par des méthodes physiques, la possible contribution d'une hypoxie tissulaire locale à la cicatrisation cutanée pathologique hypertrophique, donc au développement d'un TGE, chez le cheval.

RECENSION LITTÉRAIRE

SECTION I : L'oxygène, plus qu'un simple nutriment.

SECTION II : La cicatrisation cutanée normale chez les mammifères adultes.

SECTION III : La cicatrisation cutanée pathologique chez les mammifères adultes.

SECTION I : L'oxygène, plus qu'un simple nutriment !

I / 1 – L'OXYGÈNE, QU'EST-CE QUE C'EST ?

L'O₂ est à la fois un nutriment essentiel au maintien de la vie aérobie et, directement ou via ses nombreux dérivés, un messenger important, aux fonctions multiples, tant au niveau moléculaire, cellulaire que tissulaire. Les variations d'O₂, même infimes, ont donc d'importantes répercussions, à la fois métaboliques et de signalisation (*Guo2010*; *Schreml2010*; *Sen2009b*; *Brüne2007a*; *Brüne2007b*; *Hopf2007*; *Tandara2004*).

I / 1 / A – L'oxygène: un nutriment essentiel

L'adénosine triphosphate (ATP) est la molécule qui, dans l'ensemble du monde vivant, permet de stocker, de transporter et de fournir par hydrolyse l'énergie nécessaire au bon fonctionnement du métabolisme cellulaire. L'ATP est aussi un coenzyme de transfert de groupements phosphate associé de manière non covalente aux enzymes de la classe des kinases, et le précurseur d'un certain nombre de cofacteurs enzymatiques essentiels, comme le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD)⁺ ou le coenzyme A. L'O₂ est indispensable à la synthèse cytoplasmique et mitochondriale d'ATP par phosphorylation au niveau du substrat et phosphorylation oxydative, que ce soit via la glycolyse aérobie, le cycle de Krebs (cycle de l'acide citrique), la chaîne respiratoire mitochondriale ou l'hélice de Lynen (β-oxydation des acides gras) (*Schreml2010*; *Rodriguez2008*; *Tandara2004*; *Gordillo2003*). 90% de l'O₂ respiré est consacré à cette unique fin (*Sen2009a*). Les stocks cellulaires d'ATP ne dépassant pas quelques secondes de consommation, des apports constants et suffisants en O₂ sont requis (*Rodriguez2008*; *Tandara2007*; *Gordillo2003*; *Semenza2000*).

Le maintien de l'homéostasie en O₂ apparaît donc primordial.

I / 1 / B – Le facteur inductible par l'hypoxie

Un système de détection très fine des variations d'O₂ se retrouve au niveau cellulaire, qui comprend le facteur inductible par l'hypoxie (HIF), la protéine de von Hippel

Lindau (pVHL), et le protéasome 26S (p26S) (*Brüne2007b*). Il permet à l'organisme de détecter tout défaut d'oxygénation et de permettre aux cellules de s'y adapter.

Le HIF est un hétérodimère obligatoire composé d'une des trois sous-unités protéiques α (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) et de la sous-unité protéique HIF-1 β . Seules les sous-unités α sont sensibles aux variations d'O₂ ; la sous-unité β est exprimée de façon constitutive. Les structures des sous-unités HIF-1 α et HIF-2 α sont connues. Elles possèdent chacune deux domaines d'activation leur permettant d'initier la transcription de l'acide désoxyribonucléique (ADN) lorsqu'elles s'y lient. La structure et les propriétés de la sous-unité HIF-3 α sont incomplètement connues : certains de ses fragments semblent pouvoir prévenir la transcription de l'ADN induite par les sous-unités HIF-1 α et HIF-2 α (*Majmundar2010 ; Rosmorduc2010 ; Kaelin2008a*). La sous-unité HIF-1 α est ubiquitaire. Les sous-unités HIF-2 α et HIF-3 α ne sont exprimées que par certains types cellulaires particuliers, tels les cellules endothéliales, certains pneumocytes, les cellules rénales interstitielles ou encore les cellules de la lignée myéloïde (*Majmundar2010 ; Bertout2008*). L'hypoxie stabilise ou favorise l'expression des sous-unités -1 α et -2 α principalement, activant par là-même la voie du HIF (*Brüne2007b ; Fandray2006 ; Semenza2004 ; Huang2003 ; Pugh2003*) (figure 3). La stabilisation des sous-unités -1 α et -2 α diffère cependant dans le temps :

- le HIF-1 α est rapidement stabilisé (1 heure) mais sa stabilisation s'avère fugace (à peine quelques heures) ;
- le HIF-2 α est lentement stabilisé (3 heures) mais sa stabilisation s'avère plus longue (quelques heures, voire davantage).

Les sous-unités -1 α et -2 α semblent donc offrir une réponse complémentaire lors d'hypoxie (*Rosmorduc2010 ; Wiesener2003a ; Wiesener2003b*).

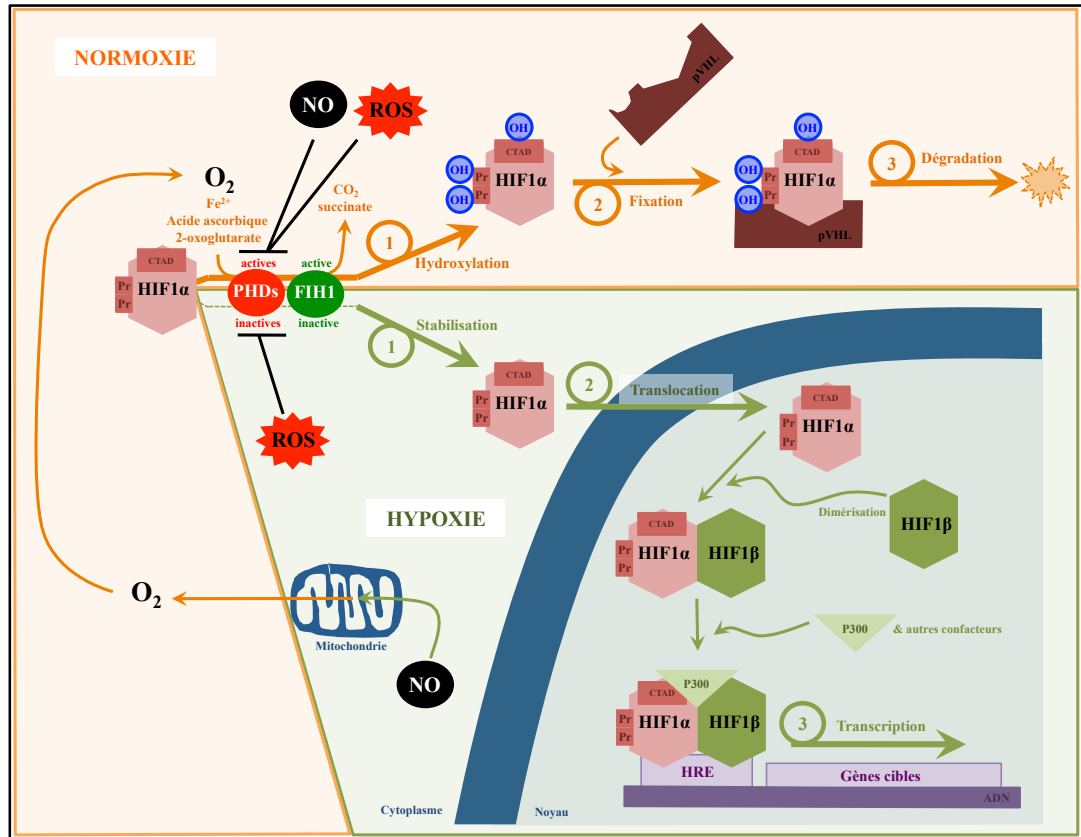


Figure 3. Schéma simplifié de la voie de signalisation du facteur inductible par l'hypoxie (HIF), dans des conditions de normoxie et d'hypoxie. Les effets du monoxyde d'azote (NO) et des dérivés actifs de l'O₂ (ROS) dans des conditions de normoxie et d'hypoxie sur la voie de signalisation du HIF sont représentés (se reporter aux chapitres I/1/C et I/1/D pour de plus amples détails). Pr : proline, P300 : protéine co-activatrice. Les autres abréviations utilisées sont détaillées dans le corps du texte. Se référer au corps du texte pour de plus amples explications. Adapté de Majmundar2010, Metzzen2004.

Dans des conditions normales d'oxygénation (normoxie), les sous-unités HIF-1α et HIF-2α sont rapidement dégradées (figure 3). Leur domaine de dégradation dépendant de l'O₂ (ODD) est hydroxylé par les prolyl-hydroxylases (PHD-1, -2, -3 et -4) (site actif Fe²⁺) ou une asparaginyl-hydroxylase (FIH1) en présence d'O₂. La PHD-2 hydroxyle directement les sous-unités HIF-1α et HIF-2α tandis que PHD-1 et PHD-3 épaulent la PHD-2 dans son action (Rosmorduc2010). HIF-1α et HIF-2α hydroxylés créent alors des ponts hydrogènes avec la pVHL, favorisant leur ubiquitinylation et donc leur dégradation par le p26S (Brüne2007b). L'hydroxylation du résidu asparagine du domaine de transactivation C-terminal (CTAD) du HIF-1α et du HIF-2α par FIH1 affecte la

liaison du HIF à l'ADN, et donc par là-même ses propriétés de transcription du génome (Lando2002 ; Kaelin2002). L'hypoxie atténue l'efficacité des PHD, dont l'activité est étroitement liée à la concentration cellulaire en O₂, permettant la dimérisation nucléaire des sous-unités α et β du HIF (figure 3). L'hétérodimère ainsi formé se fixe aux éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) des gènes cibles, provoquant leur transcription. Parce que leur activité est proportionnellement liée à la quantité d'O₂ disponible, les PHD sont qualifiés de senseurs d'O₂ ; ils relient la concentration cellulaire en O₂ à la voie de signalisation du HIF.

Les gènes cibles du HIF sont globalement ceux visant à faciliter l'adaptation de la cellule à son nouvel environnement hypoxique. Parmi eux figurent les gènes de l'érythropoïèse et du métabolisme du fer (érythropoïétine, transferrine), ceux du métabolisme énergétique (transporteurs de glucose), ceux de la prolifération / de la viabilité cellulaire, ou encore ceux de l'angiogenèse (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF, facteur de croissance dérivé des plaquettes PDGF, facteur de croissance placentaire PlGF, synthase de l'oxyde nitrique inductible iNOS) (Rodriguez2008 ; Brüne2007a ; Brüne2007b ; Wiesener2003a ; Semenza2000). La sous-unité HIF-2 α semble avoir, en plus de ceux précédemment cités, d'autres gènes cibles, en particulier ceux impliqués dans la cancérogenèse. Ainsi l'expression des gènes de l'angiogenèse préalablement cités, (VEGF, PDGF, PlGF), celle des gènes de la dégradation de la MEC (métalloprotéinases MMP), celle des gènes du processus de métastases (lysyl oxydase LOX, facteur dérivé des cellules stromales SDF1, et son récepteur de type 4 CXCR4), celle des gènes de la transition épithélio-mésenchymateuse (facteurs de transcription SNAIL, SIP, ZEB) et enfin celle des gènes de l'immortalisation (télomérase transcriptase inverse humaine hTERT) apparaissent principalement régulées par le HIF-2 α (Swami2010 ; Kim2009 ; Bertout2008 ; Semenza2003).

Le système de détection des variations d'O₂ via la voie du HIF est virtuellement présent dans toutes les cellules eucaryotes évoluées et semble participer à bon nombre des processus physiologiques (ex. développement) et pathologiques (ex. cancérogenèse) fondamentaux (Huang2003 ; Semenza2000). On a longtemps pensé que seule

l'hypoxie *stricto sensu* pouvait signaler la voie du HIF. Or, il apparaît que certaines hormones, certaines cytokines, des facteurs de croissance, mais aussi l'oxyde nitrique (NO) et ses dérivés réactifs (RNOS), ainsi que les dérivés actifs de l'O₂ (ROS) sont en mesure d'activer / moduler cette voie de signalisation privilégiée (Brüne2007a).

I / 1 / C – L'oxyde nitrique

Le NO est un messager cellulaire de premier plan. Trois différentes synthases (NOS) catalysent la formation de NO à partir du L-arginine, d'O₂ et de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NAD(P)H oxydase) (figure 4) (Brüne2007a ; Brüne2007b). Deux synthases du NO sont constitutives (synthase endothéliale du NO eNOS ; synthase neuronale du NO nNOS) ; elles induisent la production d'une faible quantité de NO sur une base continue. L'activité de la troisième synthase, l'iNOS, est induite par certaines cytokines (interleukine (IL)-1, interféron (INF)- γ , facteur de nécrose tumorale (TNF)- α), certains facteurs de croissance (VEGF) et certains stimuli inflammatoires (lipopolysaccharides bactériens LPS) (Isenberg2005 ; Rizk2004). L'iNOS permet la production instantanée de grande quantité de NO, lorsque la quantité d'O₂ disponible est suffisante pour supporter cette réaction de synthèse accrue (Sen2009b). La réaction catalysée par les NOS ne s'arrête généralement pas à la formation de NO, un composé de première réaction ; des formes réduites ou oxydées réactives sont aussi produites (RNOS), tel le peroxy-nitrite (Brüne2007a ; Brüne2007b).

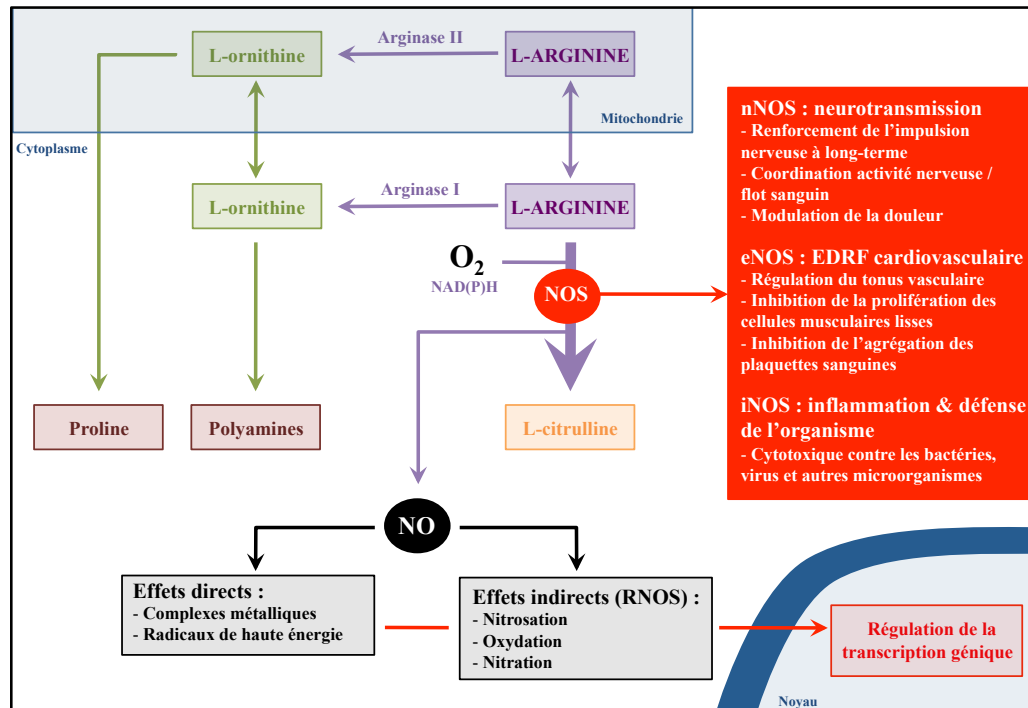


Figure 4. Schéma simplifié du métabolisme de l'arginine dans les plaies et de la voie de signalisation du monoxyde d'azote (NO). Les effets spécifiques associés aux synthèses spécifiques du NO (NOS) sont précisés. EDRF : facteur de relaxation dérivé de l'endothélium. Les autres abréviations utilisées sont détaillées dans le corps du texte. Se référer au corps du texte pour de plus amples explications.

Adapté de *Leiper2011 ; Brüne2007a ; Brüne2007b ; Isenberg2005 ; Rizk2004.*

Le NO et les RNOS ont de multiples effets, directs et indirects. Le NO a généralement un effet direct sur la régulation de gènes cibles ou des molécules / protéines cibles qu'est, par exemple, la guanylate cyclase, menant à la formation de guanosine monophosphate cyclique, un médiateur des échanges ioniques, de la glycogénolyse, de la multiplication et/ou de l'apoptose cellulaire, mais aussi de la relaxation des muscles lisses péri vasculaires à l'origine d'une vasodilatation et d'une meilleure perfusion sanguine (*Isenberg2005 ; Rizk2004*). Les RNOS ont des effets plus indirects. Ils s'associent souvent aux ROS et forment soit des composés réactifs intermédiaires capables d'oxyder, de nitrater et de nitroser nombre de molécules cibles, soit des composés inactifs. A ce titre, le NO et ses dérivés figurent parmi les meilleurs antioxydants (*Schreml2010 ; Soneja2005*). Les effets du NO et des RNOS sont cependant variables : ils dépendent de la quantité produite (effet concentration

dépendant), du moment de production (effet temps dépendant), du site de production (effet site dépendant), de l'oxygénation cellulaire et/ou tissulaire (effet statut redox dépendant), de la présence concomitante d'autres dérivés actifs tels ceux de l'O₂ (ROS). Le NO est donc un messager certes multifonctionnel, mais plutôt versatile, qui peut (dé)stabiliser la voie du HIF selon que le milieu est normoxique ou hypoxique (*Brüne2007a ; Brüne2007b*).

Lors d'hypoxie, le NO, à faible concentration, interagit avec le cytochrome C oxydase et entre en compétition réversible avec l'O₂, qu'il déloge, bloquant ainsi la respiration mitochondriale. En résulte une hypoxie mitochondriale qui réoriente alors le peu d'O₂ disponible au niveau cellulaire vers des systèmes dépendant de l'O₂ pour leur bon fonctionnement, telles les PHD (figures 3 & 6). Activées par l'O₂, les PHD catalysent l'hydroxylation du HIF-1 α et déstabilisent la voie du HIF (*Weljie2010 ; Berchner-Pfannschmidt2007*). Conséquence : une cellule stimulée par le NO dans un environnement hypoxique n'enregistre pas l'hypoxie ambiante et ne s'y adapte donc pas (*Sen2009b ; Brüne2007a ; Brüne2007b*). Inversement, en normoxie, le NO, à forte concentration, interagit avec le site actif Fe²⁺ des PHD, bloquant leur activité de façon réversible (figures 3 & 6). Il en résulte une stabilisation du HIF-1 α et un renforcement de la voie du HIF en normoxie (*Sen2009b ; Brüne2007a ; Brüne2007b*).

Il apparaît donc que la stabilisation de la voie du HIF n'est pas le seul apanage de l'hypoxie et que certains composés, tel le NO, mais aussi les ROS, tel qu'il sera décrit, participent activement, et généralement à contre courant, à la (dé)stabilisation de cette voie.

I / 1 / D – Les dérivés actifs de l'oxygène

Une soudaine perturbation de l'environnement extra- ou intra- cellulaire provoque un stress cellulaire, à l'origine d'une réponse adaptative dite de stress (CSR) visant à atténuer les dommages engendrés, à maintenir ou rétablir l'homéostasie (*Jiang2011 ; Sen2010 ; Simmons2009*). La CSR est un mécanisme qui a été, de façon étonnante et remarquable, très bien conservé au cours de l'évolution, et se révèle très similaire tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes (*Kültz2005 ; Welch1992*). La CSR se caractérise

par une batterie de réactions de transcription et de traduction menant à l'accumulation d'un certain nombre de protéines (≈ 300) très bien conservées dans la phylogénie, principalement protectrices, permettant de contrecarrer les dommages engendrés et/ou de favoriser l'adaptation transitoire à l'environnement perturbé, ou, conduisant à l'apoptose des cellules trop sévèrement affectées (Kültz2005 ; Welch1987). 40% d'entre elles participent à la régulation du statut redox intracellulaire (Jiang2011 ; Kültz2005) démontrant l'importance de ce dernier.

La synthèse des ROS apparaît comme un trait caractéristique de la CRS, quelque soit la ou les cellules impliquées et quelque soit le stress initial. La synthèse des ROS est loin d'être l'apanage des seules cellules inflammatoires (Sen2009a). Toutes les cellules disposent de l'arsenal d'organites (mitochondries, réticulum endoplasmique, peroxyosomes) et/ou d'enzymes nécessaires à leur production. L'O₂ est la pierre angulaire de cette synthèse privilégiée, qui n'hésitera pas à spolier tout l'O₂ disponible pour se réaliser. La production de ROS, lorsqu'importante, peut donc créer une hypoxie, ou l'accentuer, même au sein d'un tissu pourtant bien oxygéné, et ainsi perturber le métabolisme cellulaire (Schreml2010 ; Hopf2007 ; Silver1984).

Chez les cellules eucaryotes évoluées, de nombreuses enzymes oxydoréductases peuvent catalyser la production de ROS à partir de l'O₂ : citons les cyclo-oxygénases, les lipo-oxygénases, les enzymes du cytochrome P450, l'oxyde nitrique synthase (aussi à l'origine du NO), la xanthine oxydase, la NAD ubiquinone oxydoréductase mitochondriale, et la NAD(P)H – oxydase (aussi cofacteur de la formation de NO) (Jiang2011 ; Kültz2005 ; Berry2004 ; Lambert2004 ; Griendling2000 ; Puntarulo1998 ; Roy1994 ; Pou1992 ; Kukreja1986). Seule la NAD(P)H – oxydase apparaît comme une enzyme majeure dans la production de ROS, car elle seule utilise l'O₂ comme substrat spécifique premier. Toutes les autres enzymes précédemment citées ont un substrat spécifique autre ; elles ne réduisent l'O₂ et donc ne produisent des ROS qu'en de rares occasions (Lambert2004). La NAD(P)H – oxydase est une enzyme membranaire (figure 5), rencontrée dans de nombreux types cellulaires. Sa concentration apparaît cependant largement supérieure dans les membranes des vacuoles / granules des cellules inflammatoires.

Lorsqu'activée, la NAD(P)H – oxydase catalyse la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à partir d' O_2 . Le clivage subséquent de l' H_2O_2 par des peroxydases libère des anions peroxydes (HO_2^-), des ions hydroxyles (HO^\cdot) et des anions super oxydes (O_2^- , O^{2-}). Tous ces composés actifs sont regroupés sous l'appellation ROS. La NAD(P)H – oxydase activée et les ROS apparaissent comme des molécules incontournables à l'adaptabilité de la machinerie cellulaire (Jiang2011 ; Sen2009a) (Annexe II :facteurs activant la NAD(P)H-oxydase).

A faible concentration, les ROS sont des messagers cellulaires essentiels (figure 5), favorisant l'adaptation des cellules à leur environnement (Jiang2011 ; Kültz2005). L' H_2O_2 stimule ainsi la migration et la prolifération des cellules inflammatoires (Schreml2010 ; Niethammer2009, Martin2009) et mésenchymateuses (Schreml2010 ; Chan2009 ; Rodriguez2008 ; Ushio-Fukai2006 ; Sen2002 ; O'Toole1997 ; O'Toole1996) au sein d'une plaie, se révélant un facteur important au bon déroulement et au bon enchaînement des phases et évènements clés de la guérison tissulaire. A plus forte concentration, les ROS dévoilent tout leur potentiel oxydatif, d'un intérêt majeur dans la lutte contre les microorganismes pathogènes, mais d'un intérêt plus mitigé pour les cellules et tissus sains qui y sont exposés (figure 5) (Guo2010 ; Schreml2010 ; Sen2010 ; Sen2003 ; Allen1997).

Les ROS, l' H_2O_2 et l' O^{2-} en particulier, tout comme le NO, régulent la voie du HIF. Alors que le rôle du NO est versatile, celui des ROS est clair : les ROS désactivent les PHD par oxydation de leur site actif Fe^{2+} en site inactif Fe^{3+} . Ils bloquent ainsi la dégradation du HIF-1 α et stabilisent donc la voie du HIF (Brüme2007a ; Kohl2006 ; Görlach2001 ; Chandel2000). Les choses se compliquent quelque peu lorsque ROS et RNOS sont produits en parallèle, l'un stabilisant et l'autre déstabilisant la voie du HIF. Leur proportion relative et la formation de composés mixtes déterminent la voie dominante (figure 6).

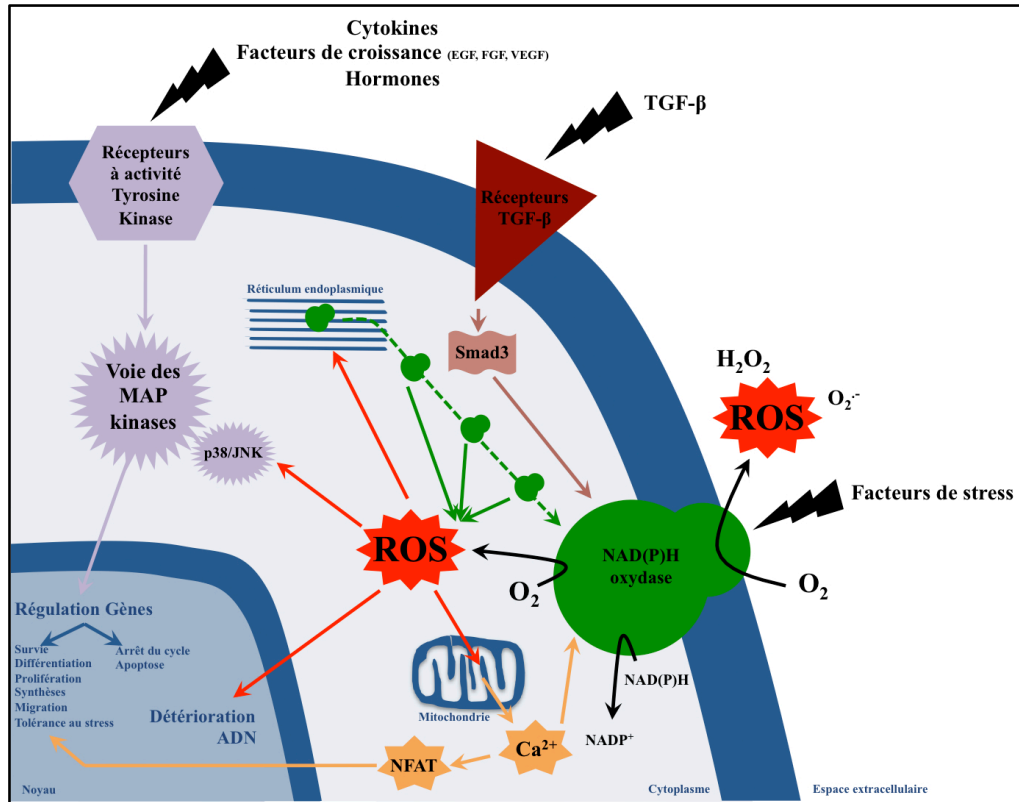


Figure 5. Schéma simplifié des principaux effets cellulaires des dérivés actifs de l' O₂ (ROS). NFAT : facteur nucléaire des cellules T activées. Les autres abréviations utilisées sont détaillées dans le corps du texte. Adapté de *Barnes2011, Jang2011*.

En résumé :

L' O₂ est donc à la fois un nutriment et une molécule signalétique essentiels au bon fonctionnement et à l'adaptabilité des cellules, des tissus, des organes, bref de l'organisme à son environnement. Le système de détection et de signalisation des variations d'O₂ dans l'organisme qu'est la voie du HIF, apparaît (1) importante et (2) sous le contrôle global de l'hypoxie. Certains dérivés actifs directs (ROS) et/ou indirects (RNOS) de l'O₂, tels le NO et l'O₂⁻, qui peuvent être synthétisés en grande quantité pendant certaines phases de la guérison cutanée, en liaison ou non avec l'hypoxie, apparaissent cependant en mesure de perturber la voie du HIF. Le NO a un rôle versatile de stabilisation / déstabilisation du HIF-1α selon qu'on se situe en normoxie ou en hypoxie. L'O₂⁻ a un rôle clair de stabilisation du HIF-1α. Il

antagonise cependant, tout ou partiellement, les effets du NO lorsqu'il s'y lie, rendant son rôle moins tranché qu'il n'y paraît au premier abord puisque c'est la proportion relative des deux composés qui finalement décidera de la (dé)stabilisation de la voie du HIF (figure 6).

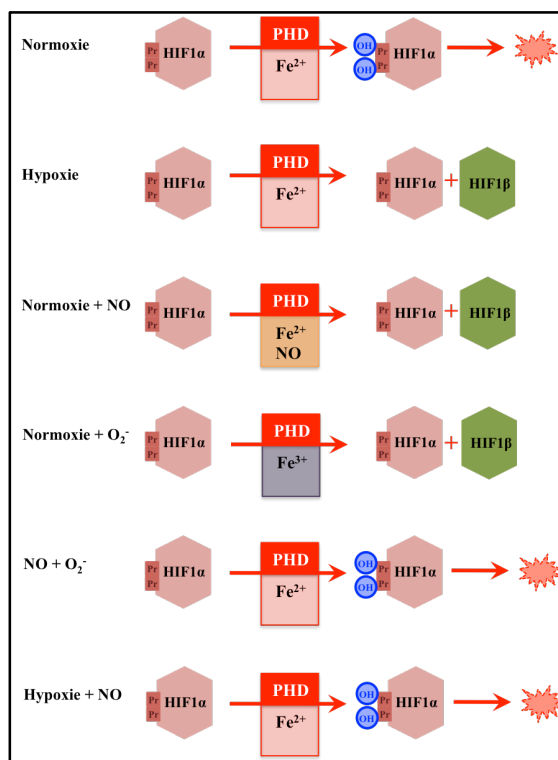


Figure 6. Schéma simplifié de la régulation de l'activité de la prolyl hydroxylase (PHD) par l'hypoxie, le monoxyde d'azote (NO) et les dérivés actifs de l'O₂ (ROS – ion superoxyde O₂⁻). Les abréviations utilisées sont détaillées dans le corps du texte ou les figures précédentes. Se référer au corps du texte pour de plus amples explications. Adapté de Brünes2007a, Brüne2007b.

La juxtaposition hypoxie / ROS (O₂⁻) / RNOS (NO) dans le contrôle de la voie du HIF rend cette dernière plus complexe qu'il n'y paraît, lui permettant probablement de plus finement réguler les problèmes d'oxygénation tissulaire rencontrés.

I / 2 – LE TRANSPORT DE L'OXYGÈNE : DE L'ATMOSPHÈRE AUX TISSUS

Le transport et la délivrance de l'O₂ aux tissus dépendent de nombreux facteurs, dont trois principaux, qui sont (1) l'oxygénation sanguine, (2) la distance de diffusion requise entre le sang (ou l'air atmosphérique) et le tissu cible et, (3) la perfusion tissulaire (*Rodriguez2008 ; Gottrup2004 ; Jonsson1991*).

I / 2 / A – L'oxygénation sanguine

I / 2 / A / i – Notions de ventilation pulmonaire

Les mammifères ont une respiration pulmonaire. Leurs poumons assurent l'échange des gaz respiratoires que sont l'O₂ et le dioxyde de carbone (CO₂), entre l'air atmosphérique ambiant et le sang, leur principal véhicule ; on parle de ventilation pulmonaire. La ventilation pulmonaire permet le maintien de l'homéostasie gazeuse (PaO₂, PaCO₂, pH sanguin), quels que soient les besoins métaboliques (exercice, guérison ...etc) et la disponibilité atmosphérique des gaz respiratoires (altitude, supplémentation gazeuse ...etc). Elle s'effectue grâce à la contraction / décontraction rythmique des muscles respiratoires inspiratoires (MRI) qui permettent l'expansion / la contraction du parenchyme pulmonaire (cycle respiratoire). La contraction des MRI est active ; elle s'effectue à la suite d'une impulsion nerveuse effectrice en provenance des centres respiratoires localisés dans le bulbe rachidien et renseignés par des mécanorécepteurs, principalement périphériques (larynx, trachée, bronches, alvéoles, paroi thoracique) et des chémorécepteurs, périphériques et centraux (surface ventrale du bulbe rachidien) (*Baud2003*).

I / 2 / A / ii – L'oxygène au niveau alvéolaire

L'O₂ diffuse continuellement de l'alvéole pulmonaire vers le sang ; la respiration alimente régulièrement l'alvéole pulmonaire en O₂. Le CO₂ suit le chemin inverse. Par conséquent, la concentration alvéolaire en O₂, et donc sa pression partielle alvéolaire (P_AO₂), dépendent et du taux de prise en charge de l'O₂ par le sang, et du renouvellement de l'air alvéolaire par la ventilation pulmonaire, qui n'est que partiel

en règle générale (15%). De multiples cycles sont donc nécessaires au renouvellement complet de l'air alvéolaire. Ce renouvellement lent de l'air alvéolaire est d'une importance fondamentale : il permet de prévenir toute augmentation ou diminution drastique et brutale de l'oxygénation tissulaire, de la teneur tissulaire en CO_2 , et donc du pH tissulaire quand la respiration est momentanément arrêtée ou qu'une supplémentation gazeuse hyperbare est instaurée (oxygénothérapie hyperbare HBOT). La valeur normale de PA_{O_2} avoisine les 100 mm Hg. Elle ne peut excéder 150 mm Hg chez les mammifères respirant un air atmosphérique à pression normale, la pression partielle en O_2 de l'air atmosphérique humidifié à pression normale étant au maximum de 150 mm Hg. Si les gaz respirés ont des pressions partielles en O_2 supérieures (HBOT), la PA_{O_2} peut augmenter si la ventilation pulmonaire augmente.

Certaines maladies pulmonaires peuvent limiter la diffusion des gaz respiratoires. Ainsi, un épaississement de la paroi alvéolaire (œdème, fibrose), une diminution de la surface d'échanges gazeux (emphysème, lobectomie), ou une altération du coefficient de diffusion ou de la différence de pressions partielles sanguine et alvéolaire des gaz respiratoires peuvent drastiquement perturber les échanges gazeux respiratoires et limiter les apports en O_2 et l'élimination du CO_2 de l'organisme, dont le métabolisme énergétique dépend étroitement de l' O_2 (Guyton2000a).

I / 2 / A / iii – Le transport sanguin de l'oxygène du parenchyme pulmonaire aux tissus

Suite à sa diffusion du compartiment alvéolaire (PA_{O_2} de l'ordre de 100 mm Hg) vers le compartiment vasculaire pulmonaire (PV_{O_2} du sang veineux capillaire pulmonaire de l'ordre de 40 mm Hg), 97% de l' O_2 est pris en charge par les globules rouges du sang et combiné à l'hémoglobine (Hb), son transporteur principal. L'Hb fixe généralement quatre molécules d' O_2 , se transformant en oxyhémoglobine (HbO). Le 3% restant est dissout dans le plasma sanguin. Il représente une quantité infime (sauf lors d'HBOT) mais non négligeable d' O_2 pour l'organisme. Directement disponible, cet O_2 s'avère très facilement, et rapidement, utilisable par les cellules. La pression artérielle en O_2 du sang quittant les poumons (Pa_{O_2}) est de l'ordre de 95 mm Hg.

L'affinité de l'Hb pour l'O₂, et donc sa saturation en O₂, est variable et dépend des conditions environnementales. Plus l'environnement est riche en O₂, plus l'O₂ tend à s'attacher à l'hémoglobine, et inversement plus l'environnement est dépourvu d'O₂, plus l'hémoglobine tend à libérer l'O₂. Le taux de fixation de l'O₂ à l'Hb est évalué à 97 – 98% au niveau pulmonaire ; il tombe à 30% et moins au niveau musculaire. D'autres facteurs, telles l'acidité du milieu ou la teneur tissulaire en CO₂ influent sur la liaison Hb – O₂. Ainsi, l'affinité de l'Hb pour l'O₂ décroît en présence de CO₂, à pH faible, ou lorsque la température augmente, permettant une meilleure libération d'O₂ dans les tissus métaboliquement actifs.

La pression partielle en O₂ des fluides interstitiels qui baignent les cellules (P_{IF_{O2}}) est en moyenne de l'ordre de 40 mm Hg. Une différence importante de pression, et donc de concentration, en O₂ entre le sang capillaire artériel (PaO₂ 95 mm Hg) et les fluides interstitiels péri cellulaires (P_{IF_{O2}} 40 mm Hg) existe donc ; l'O₂ diffuse rapidement du sang vers les tissus, à l'origine d'une chute drastique de la pression en O₂ dans le réseau capillaire local. Le sang veineux quittant les tissus via le réseau capillaire veineux a une pression en O₂ de l'ordre de 40 mm Hg (Guyton2000b).

Le manque d'Hb (anémie) (Sen2009a) ou certains composés réduisant l'affinité de l'Hb pour l'O₂, peuvent perturber le transport et la délivrance de l'O₂ aux tissus. L'Hb forme un composé stable avec le monoxyde de carbone (CO), à l'origine de carboxyhémoglobine. L'affinité de l'Hb pour le CO est supérieure à celle de l'Hb pour l'O₂. Il y a donc concurrence en faveur du CO lors de l'oxydation pulmonaire de l'Hb, défaut de transport de l'O₂ et risque potentiel d'hypoxie tissulaire et cellulaire lors d'intoxication au CO. L'HBOT est utilisée pour contrecarrer les effets du CO sur l'Hb. Certains agents oxydants, tels les nitrates, peuvent oxyder le Fe²⁺ de l'hème en Fe³⁺ le rendant ainsi incapable de fixer l'O₂. L'Hb devient alors de la méthémoglobine. L'ion cyanure CN⁻, mais aussi le sulfure d'hydrogène H₂S, apparaissent comme des inhibiteurs de l'oxydation pulmonaire de l'hémoglobine et donc du transport de l'O₂.

I / 2 / A / iv – La diffusion de l'oxygène de l'environnement vasculaire aux cellules

Les cellules métaboliquement actives de l'organisme utilisent l'O₂ sur une base permanente. Par conséquent, la pression intracellulaire en O₂, dans les tissus cibles, (PCE_{O₂} de l'ordre de 5 à 40 mm de Hg) est généralement inférieure à celle du sang (PaO₂ 95 mm Hg) qui les irrigue, et à celle des fluides interstitiels péri cellulaires (PFI_{O₂}) dans lesquels elles baignent, permettant la diffusion passive de l'O₂ depuis le compartiment intravasculaire vers le compartiment intracellulaire. Il existe parfois une grande distance, à l'échelle cellulaire, entre les cellules et le réseau vasculaire le plus proche. En temps normal, cette distance reste cependant raisonnable et permet à l'organisme de couvrir les besoins en pression d'O₂ de la cellule, de l'ordre de 1 à 3 mm Hg en règle générale. Lorsqu'une blessure survient, qui rend non opérationnel tout ou partie du réseau vasculaire, ou qu'un œdème tissulaire se développe, la distance séparant les cellules du réseau vasculaire le plus proche (Mustoe2006 ; Tandara2004 ; Sheffield1988), mais aussi la pression sur le réseau vasculaire (Broughton2006a), peuvent s'accroître de façon drastique et ainsi entraver l'apport d'O₂, créant un environnement hypoxique.

La distribution de l'O₂ de l'alvéole pulmonaire à la cellule est donc un phénomène globalement passif, qui repose principalement sur des différences de pression, des gradients de concentration en O₂. L'Hb, qui véhicule l'O₂, se doit cependant de voyager dans l'organisme pour entretenir ces gradients de concentration et pourvoir en O₂ l'ensemble des tissus.

I / 2 / B – La perfusion tissulaire

La perfusion tissulaire permet l'approvisionnement des tissus en nutriments, tels l'O₂, le glucose, les acides aminés ou les acides gras, l'élimination des déchets métaboliques, tels le CO₂ et l'H⁺, le maintien des concentrations ioniques requises au bon fonctionnement cellulaire, ainsi que l'exposition aux divers messagers de l'organisme voyageant via la circulation sanguine. La perfusion tissulaire de certains organes joue un rôle particulier pour l'organisme. Citons la peau, dont la perfusion

tissulaire détermine la perte corporelle de chaleur, aidant par là-même l'organisme à contrôler sa température (Guyton2000c).

Chaque tissu a des besoins qui lui sont propres, étroitement reliés aux fonctions, à la position qu'il occupe dans l'organisme. Les besoins d'un muscle au repos ne sont pas les mêmes que ceux d'un muscle en pleine activité, ou que ceux d'un cerveau. Afin de subvenir à ses propres besoins à partir d'un élément commun, le sang, chaque tissu s'avère capable de finement contrôler sa perfusion afin qu'elle réponde exactement à ses besoins propres. Ainsi la perfusion d'un muscle strié varie de 4 ml / min / 100 gr lorsqu'il est au repos à 80 ml / min / 100 gr lorsqu'il est en pleine activité (Guyton2000c). Cette adaptabilité repose sur deux caractéristiques majeures :

- une anatomie vasculaire particulière ;
- des mécanismes efficaces de contrôle.

I / 2 / B / i – La microcirculation tissulaire

La microcirculation tissulaire (figure 7) est la partie du système circulatoire principalement concernée par les échanges gazeux : elle est donc l'épicentre de l'appareil cardiovasculaire.

I / 2 / B / i / a – Les métartérioles

Les métartérioles sont des branches des artérioles terminales (figure 7), qui possèdent plusieurs couches de cellules musculaires lisses autorisant une fonction de régulation sphinctérienne placée sous la dépendance du système nerveux autonome et d'hormones circulantes. Elles débouchent soit sur le lit capillaire (présence de sphincters pré-capillaires réglant le débit d'entrée), soit directement sur les veinules post-capillaires (shunt artério-veineux).

I / 2 / B / i / b – Les capillaires

Les capillaires naissent des métartérioles (figure 7), parfois des artérioles directement. Ils forment un réseau fortement anastomosé, véritable lieu des échanges gazeux. Leur abondance dépend des besoins fonctionnels des tissus.

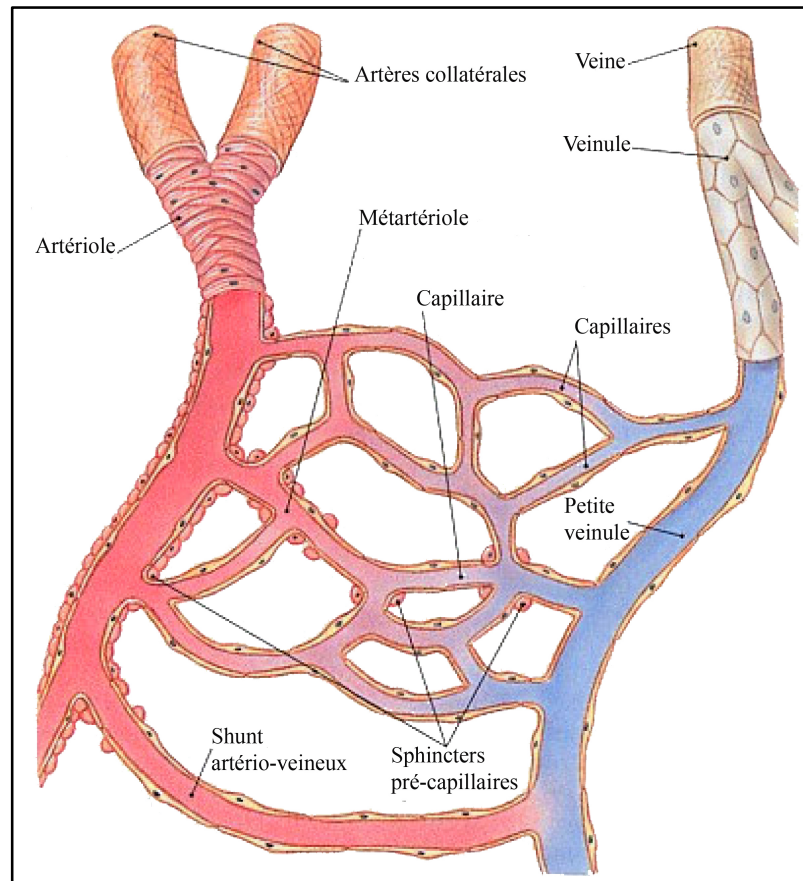


Figure 7. Représentation schématique de la microcirculation tissulaire. Crédit schéma : Daniel Balvay.

On en reconnaît trois types principaux de capillaires :

- les capillaires continus, dont les cellules endothéliales, jointives, reposent sur une lame basale continue (muscles, tube digestif, poumons). Ils sont parfois entourés de péricytes. Les péricytes sont des cellules relativement indifférenciées, principalement localisées sur la membrane basale des endothéliums vasculaires, qu'elles entourent de leurs longs prolongements cytoplasmiques. Les péricytes ont des propriétés contractiles (filaments d'actine / myosine), ils participent au besoin à la régulation du débit sanguin. Les péricytes peuvent aussi se différencier en macrophages, fibroblastes ou myofibroblastes et prendre ainsi part à l'ensemble des phases de la guérison tissulaire. Ce sont des acteurs importants dans l'angiogenèse.

- les capillaires fenêtrés, dont la paroi endothéliale présente de nombreuses fenestrations (pores de 70 nm), permettent le passage rapide des macromolécules (tube digestif, rein, plexus choroïdes, glandes endocrines).
- les capillaires discontinus ou sinusoides. De grand diamètre, irréguliers, ces capillaires possèdent de véritables orifices trans cytoplasmiques (de 1 à 3 µm de diamètre) et une membrane basale discontinue voire absente, autorisant le passage facile d'éléments figurés du sang, dont ils tendent à ralentir le flot (rate, foie, moelle osseuse).

I / 2 / B / i / c – Les sphincters précapillaires

A l'entrée du lit capillaire résident des sphincters pré-capillaires qui régulent l'entrée du sang artériel dans le réseau capillaire (figure 7). Ces sphincters s'ouvrent et se ferment périodiquement, tout comme les métartéioles se contractent ou se relaxent de façon cyclique. Le nombre de sphincters ouverts / fermés par unité de temps dépend des besoins en nutriment, et principalement en O₂, des tissus. Plus les besoins sont importants, plus le nombre de sphincters ouverts est grand.

I / 2 / B / i / d – Les veinules post-capillaires

Formées de la réunion de plusieurs capillaires, les veinules post-capillaires disposent d'une paroi encore mince permettant encore la réalisation d'échanges gazeux. Elles possèdent des péricytes, en règle générale, et se jettent dans les veinules collectrices.

I / 2 / B / i / e – Les shunts artério-veineux

Lorsque les artères ne communiquent pas avec les veines par l'intermédiaire d'un réseau capillaire (majorité des cas), des anastomoses ou shunts artério-veineux (figure 7) (dit de jonction) permettent un « court-circuit ». Ces shunts sont fréquemment rencontrés dans la microcirculation, particulièrement celle de la peau. Dans cette dernière, ils apparaissent spécifiques de régions : on les rencontre ainsi plus fréquemment au niveau de la tête et des extrémités. La vasoconstriction de ces shunts dirige le sang vers les lits capillaires, provoquant une vasodilatation locale.

Le rôle des shunts artério-veineux dans le contrôle de la circulation sanguine locale apparaît primordial. En effet, ils participent à la thermorégulation (peau des membres et de la tête) et à la régulation de la pression sanguine locale (menstruation, érection).

Artéριοles et veinules ne participent pas aux échanges gazeux à proprement parler. Cependant une particularité anatomique apparaît ici importante à signaler. Chez les mammifères, artéριοles et veinules cutanées sont principalement de type nutritif (type NUTR), i.e. de petit diamètre. Certaines régions anatomiques particulières, tel le visage / la tête et les extrémités (*Rendell2002 ; Rendell1992 ; Zweifach1987 ; Hales1985 ; Rowell1959 ; Popoff1934*), ont une densité plus importante d'artéριοles et de veinules cutanées de plus grand diamètre, de plus faible résistance et à plus grand débit sanguin (type AV pour artério-veineux). La réponse aux stimuli diffère entre les régions de type AV et celles de type NUTR (*Evans1993 ; Rendell1992*). C'est dans ces mêmes régions qu'est observée une plus grande abondance des shunts artério-veineux. Il semble donc exister des spécificités anatomiques locales dans la vascularisation / micro-vascularisation cutanée chez les mammifères.

I / 2 / B / ii – Le contrôle de la perfusion tissulaire

La perfusion tissulaire est contrôlée, localement, par des mécanismes étroitement liés les uns aux autres qui permettent une régulation fine et pointue de la perfusion tissulaire en regard des événements survenant au niveau tissulaire et donc des apports nutritionnels. On reconnaît deux types de régulation :

- une régulation à court terme, qui s'ébranle dans les secondes qui suivent les modifications / altérations de l'environnement tissulaire, et vise à restaurer rapidement les apports nutritionnels ;
- une régulation à long terme, qui s'installe progressivement dans les heures, les jours, les mois qui suivent les modifications / altérations de l'environnement tissulaire, et tend à adapter le tissu à son nouvel environnement, au prix de changements anatomiques parfois importants, telle une modification de la circulation / microcirculation tissulaire.

I / 2 / B / ii / a – Régulation de la perfusion tissulaire à court terme

L'hypoxie tissulaire apparaît comme le facteur déclencheur principal des mécanismes de régulation à court terme de la perfusion tissulaire. Un défaut d'apport d'autres nutriments, tels le glucose, les acides aminés, les acides gras par exemple, ou des déficiences en certains cofacteurs d'importance, comme les vitamines du groupe B (phosphorylation oxydative / production d'ATP), peuvent aussi déclencher ces mécanismes. Prenons l'exemple d'une blessure cutanée altérant le réseau vasculaire local :

- (1) les cellules endothéliales endommagées ou stressées par le trauma libèrent de l'endothéline (principalement de type 1, END1), un neuropeptide ayant de puissants effets vasoconstricteurs locaux par action directe sur la musculature lisse péri-vasculaire ;
- (2) une vasoconstriction s'installe, à l'origine d'une chute de perfusion tissulaire et d'une diminution importante des apports nutritionnels ;
- (3) une hypoxie tissulaire aiguë se développe ;
- (4a) théorie du manque d'O₂ : l'O₂ étant nécessaire à la contraction musculaire, son manque provoque un relâchement de la musculature lisse péri-vasculaire à l'origine d'une vasodilatation locale. La perfusion tissulaire augmente alors ;
- (4b) théorie des déchets tissulaires : le manque d'O₂ provoque la formation et la libération par les tissus de nombreux composés, tels les composés de l'adénosine phosphate, du CO₂, de l'acide lactique, de l'histamine, du potassium, des ions H⁺ ...etc. L'adénosine, l'acide lactique, l'histamine, entre autres composés, ont des propriétés vasodilatatrices permettant une augmentation de la perfusion tissulaire locale.

Ces deux théories, présentées distinctement, se rejoignent, l'une et l'autre ; elles aboutissent à une vasodilatation, une augmentation de la perfusion tissulaire, un rétablissement des apports nutritionnels et la résolution, tout du moins partielle, de l'hypoxie tissulaire.

La vasodilatation locale entraîne un rétablissement total ou partiel du flot sanguin dans la microcirculation tissulaire. Ce rétablissement peut provoquer un stress endothélial, les endothéliums ayant été transitoirement soumis à un flot sanguin diminué, voire inexistant. Ce stress provoque la libération de NO, un puissant agent vasodilatateur, qui agit localement mais aussi en amont du lit capillaire, sur les métartérioles, les artérioles et éventuellement les artères, permettant à l'organisme de supporter l'accroissement soudain de perfusion tissulaire au niveau du lit capillaire local par un accroissement plus global de la perfusion tissulaire locale.

I / 2 / B / ii / b – Régulation de la perfusion tissulaire à long terme

Les mécanismes locaux de régulation de la perfusion tissulaire permettent l'adaptation temporaire du tissu à ses nouvelles conditions environnementales, généralement défavorables. Il est effectivement inusuel d'observer une amélioration notable des conditions environnementales à l'origine d'apports nutritionnels exagérés (exceptions : HBOT, nouveaux nés prématurés), les apports étant généralement adaptés aux besoins de l'organisme. Lorsque les conditions environnementales s'améliorent au point de surcharger l'organisme en apports nutritionnels (ex. : O₂ lors d'HBOT), l'importance et/ou la perfusion du réseau vasculaire diminue généralement. Inversement, si une diminution à long terme de la perfusion tissulaire s'installe, à l'origine d'apports nutritionnels chroniquement déficitaires, une redistribution / un enrichissement du réseau vasculaire s'observe habituellement, afin de maintenir les apports nutritionnels aux cellules métaboliquement actives de l'organisme.

Deux mécanismes sont mis en œuvre :

- la construction d'un nouveau réseau vasculaire / la reconstruction du réseau vasculaire altéré, encore appelée angiogenèse, qu'accompagne fréquemment un remodelage vasculaire par intussusception (*Kurz2003*) ;
- l'activation de la circulation collatérale. De nombreuses boucles vasculaires reliant diverses régions tissulaires au sein d'un même organe existent, qui sont

inutilisées en temps normal par l'organisme. Suite à la chute de la perfusion sanguine dans une région tissulaire donnée, la circulation sanguine dans ces boucles vasculaires est activée via la relaxation, d'origine neurogénique et/ou métabolique, des muscles lisses péri vasculaires qui les maintenaient occluses. Une vasodilatation progressive s'installe, permettant le rétablissement progressif de la perfusion tissulaire et donc des apports nutritionnels aux cellules, via une voie détournée.

I / 2 / B / ii / c – Régulateurs humoraux de la perfusion tissulaire

Il existe un certain nombre de molécules vasomotrices ; elles tendent à avoir une action plus systémique que locale. Citons, à titre d'exemple, la norépinephrine (et l'épinéphrine), l'angiotensine ou la vasopressine, qui sont de puissants vasoconstricteurs, et la bradykinine, l'histamine, aux propriétés principalement vasodilatatrices.

En résumé :

La distribution de l'O₂ au sein de l'organisme est donc un phénomène globalement passif, reposant principalement sur des différences de pression, des gradients de concentration en O₂. L'Hb, qui véhicule l'O₂, voyage dans l'organisme pour entretenir ces gradients de concentration et pourvoir en O₂ l'ensemble des tissus. Ce voyage est finement contrôlé, systémiquement mais aussi et surtout localement, par une architecture vasculaire particulière et des mécanismes de contrôle de la perfusion tissulaire étroitement liés les uns aux autres. Ils permettent une régulation fine et pointue de la distribution de l'O₂ aux cellules en regard des événements survenant au niveau tissulaire.

I / 3 – MÉTHODES PHYSIQUES D'ÉVALUATION DE L'OXYGÉNATION TISSULAIRE DANS UN CONTEXTE CLINIQUE

Il existe de nombreuses méthodes physiques d'évaluation de l'oxygénation tissulaire. Toutes ne s'appliquent cependant pas à un contexte clinique ou à l'évaluation précise de la microcirculation tissulaire, partie du système circulatoire principalement concernée par les échanges gazeux et généralement la plus affectée par les traumatismes cutanés.

Une bonne évaluation de la microcirculation cutanée comprend l'évaluation de trois paramètres distincts, (1) la perfusion microvasculaire, (2) la disponibilité de l'O₂ au niveau microvasculaire et (3) la fonctionnalité du réseau microvasculaire. Diverses méthodes ont été développées pour évaluer chacun de ces paramètres. Seules quelques techniques parmi les plus utilisées pour l'évaluation de l'oxygénation cutanée seront décrites.

I / 3 / A – Évaluation de la perfusion microvasculaire

L'évaluation directe de la perfusion microvasculaire par des méthodes non invasives est recommandée. Elle fait appel, le plus souvent, à des techniques complexes d'imagerie médicale. Certaines méthodes indirectes d'évaluation de la perfusion microvasculaire existent, telles la mesure de la lactatémie locale ou la capnométrie régionale ; elles ne sont que de peu d'utilité pour évaluer la perfusion microvasculaire cutanée et ne sont donc que citées.

I / 3 / A / i – Utilisation de l'imagerie Doppler

I / 3 / A / i / a – La vélocimétrie laser Doppler

La vélocimétrie laser Doppler (Laser Doppler Flowmetry LDF) utilise le shift Doppler pour évaluer la vitesse de déplacement des globules rouges dans le sang (flux sanguin), et donc la perfusion microvasculaire dans le tissu étudié (*Chris2002*). Il n'existe aucune calibration permettant d'obtenir des valeurs absolues de flux sanguin avec cette méthode, même si de bonnes corrélations ont été établies entre la LDF et d'autres méthodes de mesure telles les microsphères radioactives, la clairance au

Xénon, l'échographie de flux, les méthodes électromagnétiques d'imagerie et l'observation directe du déplacement des érythrocytes dans la microcirculation sanguine (Sakr2010). La LDF est par conséquent exprimée en unité de perfusion arbitraire.

La LDF a certaines limites d'utilisation :

- (1) sa profondeur d'évaluation n'est que de quelques millimètres, ce qui limite son utilisation aux tissus les plus superficiels, telle la peau ;
- (2) la LDF s'effectue à l'aide d'une sonde placée au contact tissulaire. Elle ne permet donc de mesurer les variations temporelles de perfusion microvasculaire que sur une surface tissulaire restreinte (quelques mm²). Tout mouvement ou tout changement de pression dans l'application de la sonde peut modifier les résultats obtenus ;
- (3) tout changement dans l'hématocrite, toute hétérogénéité du flux sanguin, certains changements environnementaux (température cutanée) peuvent affecter l'évaluation de la perfusion microvasculaire (Sakr2010 ; Stucker2001).

I / 3 / A / i / b – L'imagerie par perfusion laser Doppler

L'imagerie par perfusion laser Doppler (Laser Doppler Imaging LDI) est une technique apparentée à la LDF. La sonde du LDF est remplacée par un faisceau laser de balayage permettant le scan complet d'une région tissulaire donnée sans qu'il y ait contact tissulaire. Une image de perfusion microvasculaire est alors créée qui permet d'évaluer, sur le plan temporel mais aussi spatial, les changements de perfusion microvasculaire (Sakr2010 ; Christ2002 ; Boyle1999 ; Essex1991).

I / 3 / A / ii – Utilisation de l'imagerie par chatoiement / tavelures laser

L'imagerie par chatoiement ou tavelures laser (Laser Speckle Imaging LSI) est une autre technique optique d'évaluation de la perfusion microvasculaire. Les tavelures, ou chatoiements, sont l'ensemble des petites tâches rapidement fluctuantes qui apparaissent dans la texture instantanée d'une image et qui lui donnent un aspect granuleux. Elles sont soit consécutives à la diffusion des ondes d'un faisceau de lumière spatialement cohérent (ex. laser) par un tissu cible présentant des irrégularités

de longueur d'onde (ex. les érythrocytes), soit consécutives à la propagation d'un faisceau de lumière spatialement cohérent dans un environnement présentant des variations aléatoires d'indice de réfraction (ex. atmosphère) (*Sakr2010*). La LSI permet de répertorier et de quantifier les tavelures émises par les érythrocytes. Leur vitesse peut ainsi être déterminée. Cette technologie est utilisée avec succès dans l'évaluation de la perfusion microvasculaire de la peau normale ou de plaies en voie de cicatrisation, (*Zaman2009*), mais aussi de la rétine (*Liang2010* ; *Chou2005*) ou du cerveau (*Zakharov2009* ; *Murari2007*).

I / 3 / A / iii – Utilisation de l'imagerie spectrale

I / 3 / A / iii / a – L'imagerie spectrale par polarisation orthogonale

L'imagerie spectrale par polarisation orthogonale (Orthogonal Polarization Spectral Imaging OPSI) peut se définir comme suit : un faisceau de lumière polarisée de longueur d'onde définie (550 nm / point isobestique de l'hémoglobine) est projeté sur le tissu à évaluer. Le faisceau réfléchi de lumière polarisée perpendiculaire au faisceau de lumière initialement émis est récupéré et analysé. L'angle de récupération du faisceau réfléchi de lumière permet d'éviter l'altération de l'image spectrale obtenue par la réflexion directe du faisceau de lumière émise par le tissu évalué (*Sakr2010*). L'OPSI permet de visualiser les microvaisseaux sanguins, les érythrocytes et les leucocytes (*Sakr2007* ; *DeBacker2006* ; *Sakr2004* ; *DeBacker2002* ; *Groner1999*). Plusieurs études rapportent son utilisation dans l'évaluation de la perfusion microvasculaire cérébrale (*Mathura2001*), de la peau normale mais aussi traumatisée (brûlures) (*Langer2001a* ; *Langer2001b*).

I / 3 / A / iii / b – L'imagerie latérale en champ sombre

L'imagerie latérale en champ sombre (Sidestream Dark-field Imaging SDI) est une technique similaire à l'OPSI (*Sakr2010*). Leur principale différence réside dans le fait que la diode émettrice du faisceau de lumière polarisée de l'OPSI se situe sur le pourtour du canal collecteur du faisceau de lumière polarisée récupéré, plutôt qu'à distance et à un angle de 90°. La réflexion lumineuse directe est ainsi évitée. Cette

technique est actuellement en développement (*Debacker2007*) et n'a été utilisée avec succès que dans l'évaluation de la perfusion microvasculaire sublinguale (*Balestra2010*).

I / 3 / A / iv – La thermographie infrarouge

Tous les êtres vivants émettent des ondes électromagnétiques dans le domaine de l'infrarouge (8 à 10 μm). L'émission de ces radiations est proportionnelle à la température corporelle : plus la température corporelle sera élevée, plus les radiations émises seront importantes. La thermographie infrarouge (0.8 μm à 1.0 mm) (ThIR) permet de collecter ces radiations et de les convertir en données thermiques interprétables via l'utilisation d'algorithmes préétablis.

La température tissulaire locale est le produit du métabolisme cellulaire et de la perfusion tissulaire. Or, la participation du métabolisme cellulaire à la genèse de la température locale d'un tissu est considérée comme étant négligeable (*Head2001*) ; la température tissulaire locale apparaît ainsi comme le reflet de la perfusion tissulaire locale. La quantification des variations de température permet donc d'évaluer qualitativement les variations de perfusion tissulaire (*Xu2010* ; *Schlager2010* ; *Manley2007* ; *Merla2007* ; *Pascoe2006*). La ThIR est une méthode maintenant bien établie (*Murray2009* ; *Zaproudina2008*) et dont les résultats sont étroitement corrélés à ceux obtenus par d'autres méthodes d'évaluation de la perfusion tissulaire, telle l'imagerie laser Doppler (*Schlager2010*).

Cette méthode d'évaluation de la perfusion microvasculaire n'est cependant pas dénuée de limites. La température cutanée peut être affectée par de nombreux paramètres, telles les conditions environnementales (humidité, température), le rythme circadien, l'activité physique, l'état de vigilance / de stress ou encore certaines drogues ou médicaments. Tous ces paramètres doivent être normalisés avant que ne soient collectées des données thermiques.

I / 3 / B – Évaluation de la disponibilité locale en oxygène

I / 3 / B / i – Les oxymètres à sonde polarographique et autres senseurs optiques (optodes)

La disponibilité locale en O₂ peut être évaluée à l'aide d'électrodes à O₂ dites de Clark (oxymètres à sonde polarographique) directement insérées au sein du tissu, ainsi par des senseurs optiques, encore appelés optodes, posés à sa surface (*Siegemund1999*). La surface ainsi que la profondeur d'évaluation tissulaire de ces outils sont restreintes (15 à 20 mm de profondeur) (*Ince1999*).

I / 3 / B / i / a – Les électrodes de Clark

L'électrode de Clark est formée d'une cathode de platine et d'une anode d'argent entre lesquelles est maintenue une différence de potentiel électrique. L' O₂ dissous est ionisé en hydroxyle au contact de la cathode. De cette réaction résulte un courant très faible, proportionnel à la concentration en O₂ dissous du milieu dans lequel baigne l'électrode, qui est amplifié et mesuré. Comme l'électrode consomme un peu d'O₂, ce qui peut légèrement fausser les résultats obtenus, la concentration en O₂ mesurée dépend de la vitesse de renouvellement, de la concentration et de la vitesse de diffusion de l'O₂ dans le tissu évalué, paramètres sur lesquels peut influencer la température. Ces électrodes sont principalement utilisées en oncologie, pour mesurer la pression partielle en des tumeurs afin de planifier les traitements de radiothérapie (*Sakr2010 ; Nordmark1996 ; Siegemund1999*).

I / 3 / B / i / b – Les optodes

Les senseurs optiques, ou optodes, utilisent la fluorescence ou l'absorbance de composés complexés aux ions H⁺ ou au CO₂ pour révéler la disponibilité locale en . Elles sont plus faciles d'utilisation, plus stables et donnent des résultats plus fiables que les électrodes de Clark (*Menzel2003 ; Zollinger1997 ; Hopf1994*).

I / 3 / B / ii – Méthodes d'évaluation spectroscopique par réflectance

I / 3 / B / ii / a – La spectrophotométrie par réflectance

La spectrophotométrie par réflectance (RS) permet de mesurer la réflexion d'un faisceau de lumière polarisée de longueur(s) d'onde(s) prédéterminée(s), généralement dans le domaine visible (380 nm à 780 nm) (points isobestiques de

l'HbO et de l'Hb à 590 nm et 800 nm) (*Christ2002*). Le spectre réfléchi obtenu est comparé aux spectres connus des molécules étudiées (ex. HbO, Hb) afin d'en déterminer leur concentration relative et celles de leurs éventuels produits dérivés (tHb = HbO + Hb).

La pénétration tissulaire des faisceaux de lumière visible étant faible à très faible, cette technologie ne permet de mesurer la saturation de l'Hb en O₂ que dans la portion très superficielle des tissus, telle la peau et les muqueuses (*Rolfe2000 ; Temmesfeld-Wollbruck1998*),

La RS a certaines limites :

- (1) une faible pénétration tissulaire ;
- (2) les pigments, et en particulier la mélanine de la peau, créent des interférences de lecture rendant les spectres obtenus difficiles voire impossibles à interpréter lorsqu'une peau pigmentée à très pigmentée est évaluée, réservant l'usage de cette technologie aux peaux non pigmentées et aux muqueuses ;
- (3) l'importante réflectance du sang rend la collecte de données interprétables difficile lors de saignement actif ;
- (4) les sondes de RS s'utilisent au contact tissulaire direct et ne donnent qu'une information limitée à la zone de contact ;
- (5) la RS évalue principalement la microcirculation tissulaire superficielle. Toute application musclée de la sonde sur le tissu évalué risque de perturber le flot sanguin dans la région étudiée, et d'ainsi compromettre la validité des résultats d'oxygénation et de volume sanguin locaux obtenus.

I / 3 / B / ii / b – La spectroscopie dans le proche infrarouge

La spectroscopie par réflectance dans le proche infrarouge (NIRS) est une technique optique non invasive d'évaluation de la disponibilité tissulaire locale en très similaire à la RS. Un faisceau de lumière polarisée de longueur(s) d'onde(s) prédéterminée(s) dans le domaine infrarouge (780 nm à 1400 nm) est utilisé. Ce faisceau pénètre plus profondément dans les tissus que ne le fait le faisceau de lumière visible utilisé en spectrophotométrie, permettant une évaluation plus précise de l'épiderme et du

derme, voire des tissus immédiatement sous-jacents, lors d'analyse cutanée. De plus, l'absorption lumineuse par les pigments cutanés, telle la mélanine, est plus faible dans le domaine infrarouge que dans le domaine visible ; la qualité et la validité des spectres obtenus n'en sont donc que meilleures (*Attas2001*). Cette technologie est très largement utilisée pour évaluer l'oxygénation tissulaire de la peau (*Attas2001*) des plaies cutanées en voie de guérison (*Cross2009*) ou des plaies cutanées chroniques (*Weingarten2010* ; *Weingarten2008* ; *Ives2007*).

Des colorants vitaux, tels le vert indocyanine qui se lie fortement aux protéines sanguines et dont la demi-vie est brève, peuvent être utilisés en NIRS pour mesurer le flot sanguin dans la région étudiée. Selon la vitesse d'injection du colorant vital, ses vitesse d'accumulation et de clairance tissulaires, une évaluation de la perfusion microvasculaire peut être réalisée (*Sakr2010* ; *Hongo1995* ; *Edwards1988* ; *Colacino1981*).

Comme la RS, la NIRS a certaines limites, similaires :

- (1) les pigments interfèrent, dans une moindre mesure, à l'établissement des spectres de réflexion ;
- (2) l'importante réflectance du sang rend la collecte de données interprétables difficiles lors de saignement actif ;
- (3) les sondes de NIRS s'utilisent au contact tissulaire direct, avec tous les inconvénients que cela représente (mouvements, force d'application, précision de contact).

I / 3 / C – Évaluation de la fonctionnalité du réseau microvasculaire

La plethysmographie par occlusion veineuse (POC) permet d'évaluer les changements volumétriques d'une région tissulaire donnée, après obstruction veineuse simple (absence d'obstruction artérielle). Les changements volumétriques tissulaires observés apparaissent comme le reflet de la perfusion et de la diffusion microvasculaires des fluides, depuis la microcirculation vers le compartiment extravasculaire. Cette méthode permet d'évaluer la filtration capillaire et d'estimer indirectement la fonctionnalité des endothéliums microvasculaires (*Jaap1993*).

La POC n'est pas dénuée de limites :

- (1) elle ne peut s'effectuer que sur les extrémités appendiculaires ;
- (2) c'est une technique qui peut se révéler douloureuse pour l'individu qui la subit ;
- (3) les individus qui ont une pression sanguine diastolique basse (ou une pression veineuse iso volumétrique élevée) ne sont pas de bons candidats car la filtration capillaire forcée par l'obstruction veineuse ne s'observe qu'à des pressions d'obstruction veineuse proches de la pression sanguine diastolique (*Sakr2010 ; Knotzer2007*).

En résumé :

De nombreuses méthodes physiques d'évaluation de l'oxygénation tissulaire dans un contexte clinique existent donc. Aucune méthode ne permet à ce jour d'évaluer à la fois la perfusion microvasculaire, la disponibilité de l'O₂ au niveau microvasculaire, et la fonctionnalité du réseau microvasculaire. L'utilisation de ces méthodes doit donc être combinée si l'on souhaite obtenir une mesure appropriée de l'oxygénation tissulaire.

SECTION II : La cicatrisation cutanée normale chez les mammifères adultes

II / 1 – NOTIONS D'HISTOLOGIE CUTANÉE

La peau des mammifères adultes est une structure complexe constituée de trois couches principales superposées qui sont, de la surface cutanée vers la profondeur de la peau, l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Catala2008). L'épiderme et le derme sont séparés par la jonction dermo-épidermique.

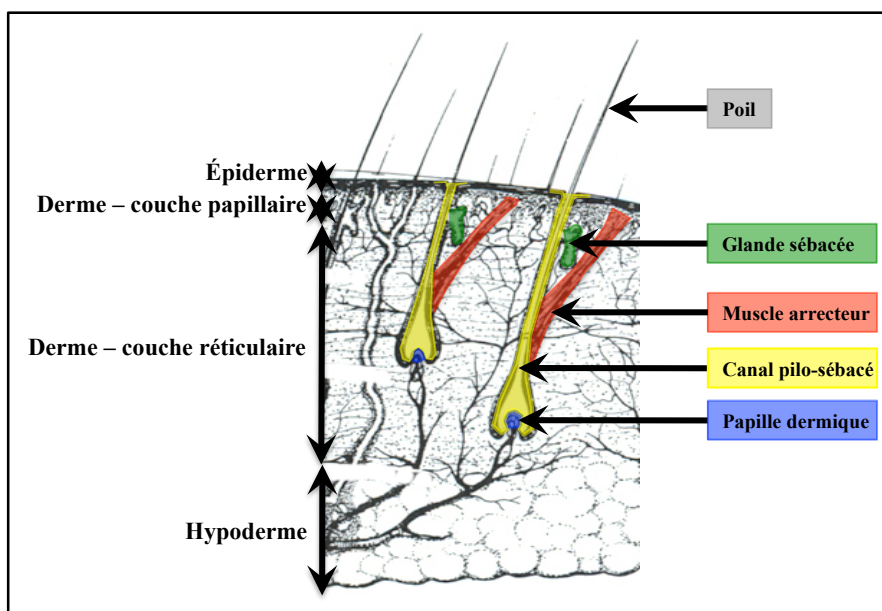


Figure 8. Représentation schématique simplifiée de la peau d'un mammifère.

II / 1 / A – L'épiderme

L'épiderme, couche la plus superficielle de la peau (figure 8), est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé dans la constitution duquel entrent quatre populations cellulaires distinctes : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel. L'épiderme ne contient aucun vaisseau sanguin ni lymphatique. Les cellules qui le composent sont alimentées par diffusion depuis le derme sous-jacent. L'épiderme contient, par contre, de nombreuses terminaisons nerveuses. Il est séparé du derme par la membrane basale.

II / 1 / A / i – Les kératinocytes

Les kératinocytes sont le principal type cellulaire rencontré dans l'épiderme (80% des cellules épidermiques) (Crickx2005). Les kératinocytes possèdent des filaments intermédiaires de kératine (encore appelées cytokératines ou alpha-kératines) intracytoplasmiques qui s'ancrent aux desmosomes et hémidesmosomes. Ainsi, les filaments intermédiaires des cellules adjacentes sont en contact les uns avec les autres via les desmosomes. Cette disposition particulière confère aux kératinocytes une communication et une cohésion intercellulaires importantes.

Les kératinocytes sont des cellules dynamiques, à l'évolution morphologique constante, qui subissent un processus de kératinisation progressive, conférant à l'épiderme ses propriétés protectrices (mécanique et chimique). Cette évolution se fait de la profondeur vers la surface cutanée et permet de distinguer quatre couches :

- la **couche germinative**, ou **basale**, profonde. Cette couche assure, par ses mitoses, le renouvellement de l'épiderme. Ses cellules, cubiques ou prismatiques, contiennent de nombreux grains de mélanine phagocytés qui permettent à l'épiderme d'assurer son rôle de protection de la lumière et sous-tendent le rôle régulateur qu'ont les kératinocytes sur la pigmentation cutanée.
- la **couche spiculée**. Les kératinocytes commencent à s'aplatir, mais le noyau et les organites cytoplasmiques sont intacts, les filaments intermédiaires de kératine sont regroupés en faisceaux denses, les desmosomes sont normaux.
- la **couche granuleuse**. Les kératinocytes sont plus aplatis, le noyau commence à dégénérer, des grains de kératohyaline apparaissent au sein des trousseaux de filaments intermédiaires de kératine, ainsi que des kératinosomes. Les kératinosomes sont de petits organites ovalaires à l'origine du ciment intercellulaire, substance déversée par exocytose dans les espaces intercellulaires de la couche cornée.
- la **couche cornée**, superficielle. Le kératinocyte, qui prend ici le nom de cornéocyte, est complètement aplati, le noyau et les organites cytoplasmiques ont totalement disparu, ne persistent que les trousseaux de filaments intermédiaires

de kératine et les grains de kératohyalines. Les desmosomes, appelés cornéodesmosomes sont profondément modifiés. La lyse du ciment intercellulaire et des cornéosomes permet la desquamation.

II / 1 / A / ii – Les mélanocytes

Les mélanocytes (10 à 12% des cellules épidermiques) sont principalement situés dans la couche basale de l'épiderme (*Crickx2005*). Ils ont un aspect étoilé, leurs prolongements cytoplasmiques s'insinuent entre les kératinocytes. Ils sont dépourvus de jonction intercellulaire avec les cellules voisines. Les mélanocytes contiennent des organites cytoplasmiques appelés mélanosomes, au sein desquels est produite la mélanine, pigment en grande partie responsable de la couleur de la peau et des phanères. A noter : les mélanocytes synthétisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-6, TNF- α).

II / 1 / A / iii – Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans (3 à 8% des cellules épidermiques) font partie du groupe des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T (LYMT) (*Crickx2005*). Elles dérivent des cellules souches hématopoïétiques situées dans la moelle osseuse ; elles sont présentes dans tous les épithéliums pavimenteux stratifiés des mammifères. Les cellules de Langerhans sont généralement dispersées entre les kératinocytes de la couche spiculée auxquels elles adhèrent via l'E-cadhérine (E-CAD). Les cellules de Langerhans initient et propagent les réponses immunitaires dirigées contre les antigènes appliqués sur la peau. Elles peuvent ingérer des particules étrangères, incluant des micro-organismes. Après captation de l'antigène, les cellules de Langerhans quittent l'épiderme et gagnent les ganglions lymphatiques satellites, où elles les présentent aux LYMT.

II / 1 / A / iv – Les cellules de Merkel

Situées, de façon dispersée, dans la couche germinative, entre les kératinocytes basaux, au contact d'une terminaison nerveuse libre, les cellules de Merkel (1 à 3%

des cellules épidermiques) sont des cellules neuro-endocrines mécanoréceptrices, qui pourraient aussi avoir des fonctions inductives et trophiques sur les terminaisons nerveuses de l'épiderme et sur les annexes cutanées (Crickx2005).

II / 1 / B – Le derme

Le derme (figure 8) est un tissu conjonctif généralement lâche en superficie et plus dense (fibreux) en profondeur. Il est principalement constitué d'une matrice extracellulaire faite de glycosaminoglycanes (GAG), de collagène, d'élastine et de fibronectine (conférant à la peau souplesse, élasticité et assise), et peuplée de fibrocytes, de fibroblastes et de cellules du système immunitaire (lymphocytes, mastocytes, macrophages tissulaires). Le derme contient de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, des nerfs, des terminaisons nerveuses sensibles libres et corpusculaires, du tissu musculaire lisse et strié, ainsi que diverses annexes cutanées dérivées de l'épiderme qui plongent en son sein (Crickx2005).

Spécificité du derme du cheval :

On distingue généralement trois couches dans le derme du cheval, alors que deux sont généralement rencontrées chez les autres mammifères :

- la couche papillaire (figure 8). Cette couche, fine, superficielle, s'entremêle avec la couche germinative, ou basale, de l'épiderme. Sa MEC est fine et riche en fibres élastiques organisées aléatoirement. S'y rencontrent les glandes sudoripares et les follicules pilo-sébacés (Wakuri1995).
- la couche réticulaire (figure 8). Cette couche épaisse du derme est faite d'un tissu conjonctif pauvre en fibres élastiques, riche en faisceaux de collagènes orientés selon les lignes de tension de la peau. Seuls des follicules pileux et des glandes sudoripares s'y trouvent (Wakuri1995 ; Tagaki 1959).
- la couche « cuir de Cordoue », encore appelée troisième couche du derme, est spécifique au cheval (Wakuri1995 ; Mosimann1990 ; Talukdar1972), et parfois subdivisée en une couche principale superficielle et une couche accessoire plus profonde. La couche principale, épaisse, est principalement constituée de gros faisceaux de fibres de collagène étroitement entrelacées et de quelques rares fibres élastiques.

Sa présence et son épaisseur varient selon la région anatomique ; on la rencontre au niveau de l'encolure, des épaules, du dos et de l'arrière main du cheval, région dans laquelle cette couche principale est particulièrement épaisse. La couche accessoire, fine, est constituée de faisceaux parallèles de fibres de collagène, entremêlées de fibres élastiques et réticulaires. On la rencontre uniquement sur l'arrière main du cheval et à l'aspect distal des membres, tant thoraciques que pelviens (*Wakuri1995*). Les follicules pilo-sébacés ne descendent jamais dans la troisième couche du derme chez le cheval (*Wakuri1995*).

La peau du cheval est considérée épaisse en regard de celles des autres mammifères, domestiques en particulier. La couche « cuir de Cordoue » tendrait à expliquer cette différence. L'épaisseur moyenne de la peau chez le cheval est de 3.6 à 3.8 mm (de 1.2 mm à la face médiale du carpe à 7.0 mm à la face latérale du paturon pelvien) (*Wakuri1995 ; Talukdar1972*).

II / 1 / C – L'hypoderme

L'hypoderme (*figure 8*), situé sous le derme, est la couche profonde de la peau. C'est un tissu conjonctif de constitution similaire au derme (MEC / cellules), richement vascularisé, qui, selon les conditions de nutrition et les régions de la peau, contient plus ou moins de tissu adipeux. L'hypoderme sert d'interface entre le derme et les structures mobiles plus profondes que sont les muscles et les tendons. Il protège l'organisme des chocs physiques et des variations de température.

II / 1 / D – Les annexes cutanées

II / 1 / D / i – Les glandes sudoripares

Ces glandes exocrines, tubuleuses simples pelotonnées, secrètent la sueur. Leur portion sécrétrice (épithélium cubique simple) entourée de cellules myo-épithéliales, siège dans le derme. Leur canal excréteur (épithélium cubique bistratifié) gagne la surface de l'épiderme par un trajet hélicoïdal. L'innervation des glandes sudoripares est sympathique, segmentaire.

II / 1 / D / ii – Les follicules pilo-sébacés

Les follicules pilo-sébacés comportent : le poil et ses gaines, la ou les glandes sébacées et le muscle arrecteur du poil (*arrector pili*) (figures 8 & 9).

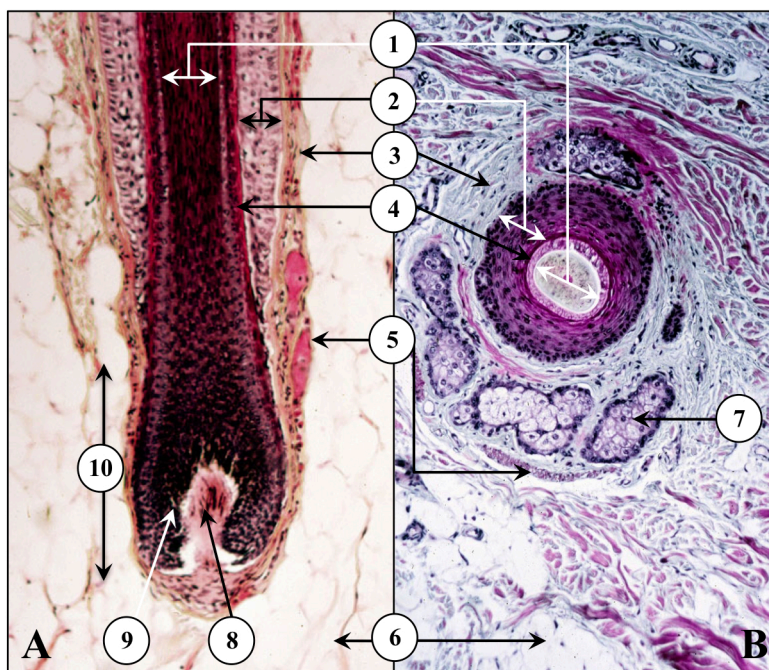


Figure 9. Coupes histologiques d'un follicule pilo-sébacé. Section A : coupe longitudinale. Section B : coupe transversale. 1 : cortex du poil ; 2 : gaine épithéliale externe ; 3 : gaine fibreuse ; 4 : gaine épithéliale interne ; 5 : muscle arrecteur ; 6 : tissu adipeux ; 7 : glande sébacée ; 8 : papille dermique ; 9 : matrice / cellules matricielles ; 10 : bulbe pileux. Crédit photos : A Véronique Aladjajian – B Agnès Choiset / Université Paris Descartes

II / 1 / D / ii / a – Le poil

Chaque poil dérive d'une invagination tubulaire de l'épiderme qui s'étend profondément dans le derme, voire l'hypoderme (figures 8 & 9). Cette invagination épidermique délimite un canal, appelé pilo-sébacé, dans lequel se développe le poil et se déverse(nt) la (les) glande(s) sébacée(s). L'invagination épidermique forme la paroi de l'infundibulum puis la gaine épithéliale externe du poil. Au fur et à mesure qu'on s'éloigne de la surface cutanée, la paroi de l'infundibulum et la gaine

épithéliale externe du poil s'amincissent progressivement, par la disparition successive de la couche cornée, de la couche granuleuse et de la couche spinieuse de l'épiderme. Ne finit par rester, en profondeur, qu'une fine gaine épithéliale externe alors réduite à une seule assise de kératinocytes. L'invagination épidermique se renfle à son extrémité profonde pour former le bulbe pileux, constitué d'un amas de cellules matricielles peu différenciées, à l'origine du poil. Le bulbe pileux et la fine gaine épithéliale externe, qui forment les centres germinaux du poil et de l'épiderme, coiffent une papille de tissu conjonctif très vascularisé dépendant du derme, plus connu sous le nom de papille dermique. Les cellules des centres germinatifs, lorsqu'elles persistent après une blessure cutanée ou une brûlure superficielle, permettent la régénération complète de l'épiderme.

II / 1 / D / ii / b – Le muscle arrecteur du poil

Le muscle arrecteur du poil (*arrector pili*) est un muscle lisse oblique qui longe la face externe de la glande sébacée (figures 8 & 9). Il s'insère, dans sa partie inférieure, sur la lame basale du follicule pileux, proximale au bulbe pileux, et, dans sa partie supérieure, sur la lame basale de la jonction dermo-épidermique. La contraction du poil provoque une saillie du poil qui se verticalise, phénomène connu sous le nom d'horripilation (Crickx2005).

II / 1 / D / ii / c – Les glandes sébacées

Les glandes sébacées, exocrines, alvéolaires simples, holocrines et sécrétant un produit lipidique le sébum, sont annexées aux poils en règle générale (figures 8 & 9). Leur taille est habituellement inversement proportionnelle à celle du poil qu'elles accompagnent (Crickx2005). Leur portion sécrétrice est formée d'un ou de plusieurs alvéoles (deux alvéoles en règle générale chez le cheval) (Wakuri1995) dilatés en sacs dont la paroi est faite d'une couche de cellules cubiques. A l'intérieur se trouvent des cellules polyédriques, plus volumineuses, progressivement chargées de gouttelettes lipidiques, dont le noyau se pycnose et finit par disparaître. La cellule est entièrement

éliminée avec son contenu lipidique. Le canal excréteur, unique et très court, débouche dans le canal pilo-sébacé.

II / 1 / e – La vascularisation cutanée

L'épiderme n'est pas vascularisé, à la différence du derme et de l'hypoderme, richement vascularisés par un réseau vasculaire très systématisé (figures 7 & 10).

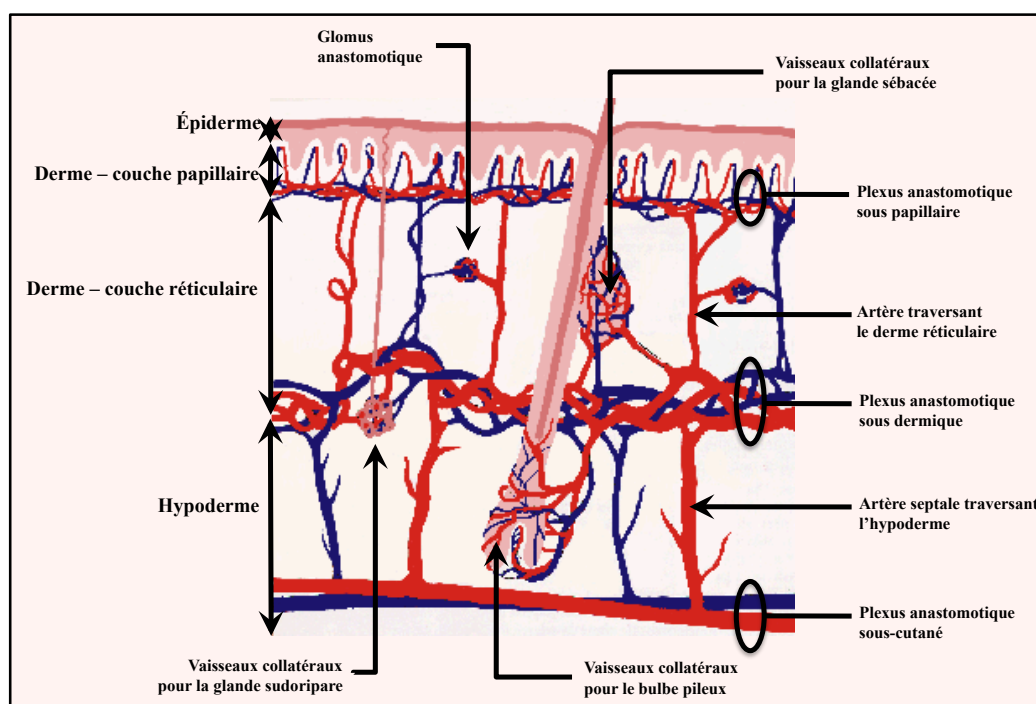


Figure 10. Représentation schématique simplifiée de la vascularisation cutanée. Adapté de *Crickx2005*.

II / 1 / E / i – Le réseau artériel

Le réseau artériel aborde la peau dans la partie profonde de l'hypoderme (figure 10) où les artères sous-cutanées forment un premier plexus anastomotique sous-cutané parallèle à la surface cutanée. De ce premier plexus vasculaire partent perpendiculairement des artères septales qui traversent l'hypoderme tout en donnant des collatérales destinées à vasculariser l'hypoderme. Les artères septales se réunissent pour former un deuxième plexus anastomotique dans la partie profonde du derme. Les mailles de ce second plexus vasculaire sont parallèles au premier plexus

anastomotique et à la surface cutanée. De celui-ci partent des collatérales destinées aux annexes : glandes sudoripares et follicules pilo-sébacés. De ce deuxième plexus anastomotique partent des artères dites « artères en candélabre » qui traversent la couche réticulaire du derme tout en le perfusant. Ces artères s'anastomosent en un troisième plexus situé à la jonction des couches réticulaire et papillaire du derme. De ce troisième et dernier plexus partent des artérioles qui gagnent les papilles du derme (figure 11).

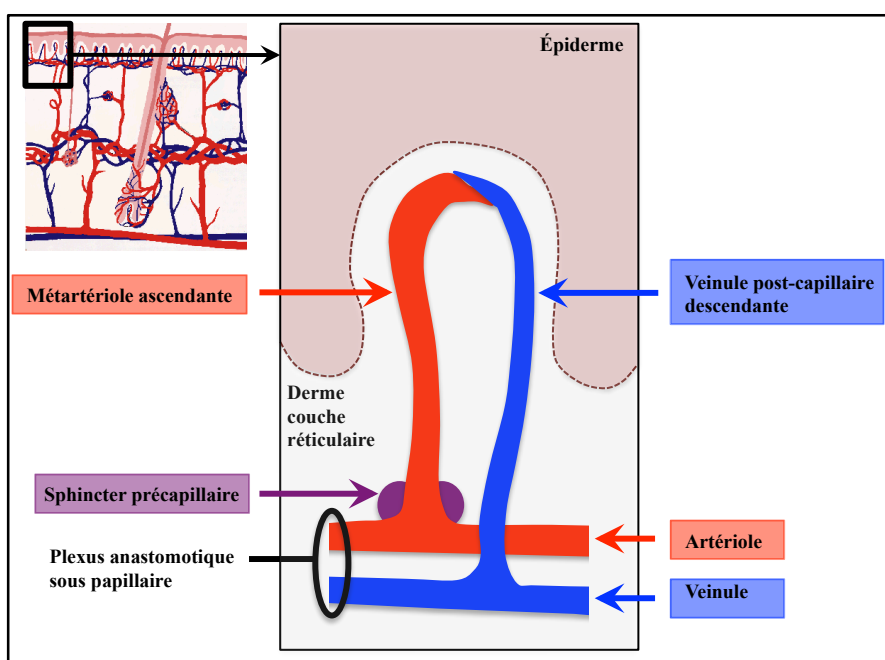


Figure 11. Représentation schématique simplifiée de la vascularisation particulière d'une papille du derme. Une boucle capillaire unique irrigue la région. Adapté de *Chao2009*.

II / 1 / E / ii – Les réseaux veineux et lymphatique

Le réseau veineux est calqué sur le réseau artériel (figure 10). Les vaisseaux lymphatiques naissent d'une anse borgne au sommet des papilles du derme et suivent le trajet du réseau veineux.

II / 1 / F – L'innervation cutanée

L'innervation cutanée est abondante. Des terminaisons nerveuses sont rencontrées dans toutes les couches de la peau. On rencontre :

- d'une part, les terminaisons nerveuses du système nerveux autonome, amyéliniques, destinées aux vaisseaux et aux annexes cutanées ;
- d'autre part, les terminaisons nerveuses des voies de la sensibilité, myélinisées ou amyéliniques, dont :
 - o des terminaisons nerveuses libres, qui comprennent des mécanorécepteurs de type C (perception de la pression), des thermorécepteurs (perception du chaud et du froid) et des nocicepteurs (perception de la douleur);
 - o des terminaisons nerveuses des complexes de Merkel (perception de la pression) ;
 - o des terminaisons des corpuscules de Meissner (toucher), de Vater-Paccini et de Krause (perception des vibrations) et enfin de Ruffini (perception de la pression et de l'étirement).

Les fibres nerveuses progressivement se regroupent pour former des nerfs d'un calibre de plus en plus gros de la couche papillaire du derme vers l'hypoderme

(Crickx2005).

EN RÉSUMÉ :

La peau, d'apparence simple, se révèle donc une structure à l'architecture complexe constituée de cellules hautement différenciées et spécialisées. Sa guérison figure parmi les processus biologiques les plus complexes qui soient *(Gurtner2008).*

II / 2 – LA CICATRISATION CUTANÉE NORMALE CHEZ LES MAMMIFÈRES ADULTES

Suite à une blessure ou un traumatisme altérant l'intégrité ou l'homéostasie de la peau, des cascades signalétiques intra et extracellulaires se mettent en place, des populations cellulaires particulières, tant différenciées qu'indifférenciées (*Singer1999*), entrent en action. La guérison tissulaire cutanée mène généralement chez les mammifères adultes à la formation d'un tissu fibreux de remplacement, communément nommé tissu fibreux cicatriciel ou cicatrice (réparation tissulaire), qui s'avère généralement peu à pas fonctionnel. Dans de certains cas, la guérison tissulaire mène à la recréation des tissus lésés (régénération tissulaire) plutôt qu'à leur réparation, permettant à ces derniers de recouvrer leur fonctionnalité pleine et entière. N'étant pas l'apanage des mammifères adultes, la régénération cutanée ne sera pas détaillée dans cette recension littéraire.

A des fins didactiques, on divise généralement la cicatrisation cutanée chez les mammifères adultes en quatre phases distinctes : hémostase, inflammation, prolifération et remodelage (*Guo2010 ; Schreml2010*). Ces phases ne doivent pas être considérées comme des entités indépendantes mais plutôt comme les étapes d'un processus finement programmé au cours duquel ces phases s'entrelacent, se chevauchent, se provoquent. La cicatrisation cutanée est donc un processus dynamique qui s'étale généralement sur quelques jours à quelques semaines, voire quelques mois à quelques années, selon la taille et la profondeur de la blessure cutanée initiale (*Schreml2010 ; Gurtner2008*). Un certain nombre d'évènements caractérisent chacune de ces phases au niveau cellulaire et moléculaire. Ces évènements doivent survenir au moment opportun, s'articuler les uns aux autres dans un ordre défini, s'étaler sur une durée déterminée et s'effectuer à une intensité précise pour que la cicatrisation se déroule sans anicroche (*Guo2010 ; Schreml2010 ; Mathieu2006*).

Chez les mammifères adultes, une cicatrisation cutanée optimale implique la séquence événementielle suivante : (1) une hémostase rapide, (2) une inflammation appropriée, (3) la différenciation, la prolifération et la migration de cellules

mésenchymateuses vers la plaie cutanée, (4) une angiogenèse adaptée, (5) une prompte ré-épithélialisation cutanée, et (6) la synthèse, l'alignement et le réseautage des fibres de collagène qui procurent ainsi force et résistance au tissu cicatriciel (*Guo2010 ; Mathieu2006 ; Gosain2004*).

Toute interruption, aberration ou prolongation d'une ou de plusieurs des phases de la guérison mène à un retard de cicatrisation cutanée, voire à une cicatrisation cutanée pathologique (CCP).

II / 2 / A – L'hémostase

Toute blessure cutanée s'accompagne d'un trauma vasculaire, une effraction vasculaire le plus souvent, à l'origine d'une extravasation sanguine inopportune encore appelée saignement. Les cellules endothéliales, dont l'intégrité a été altérée ou qui ont été stressées par le traumatisme, relâchent, entre autres produits, l'END1, un neuropeptide aux effets vasoconstricteurs puissants par action directe sur les muscles lisses péri vasculaires. S'ensuit une rapide vasoconstriction périphérique, qui certes limite les pertes sanguines, mais prive aussi la région touchée de ses apports nutritionnels, dont ceux en O₂, essentiels. Une hypoxie tissulaire aiguë s'installe (*Schreml2010 ; Hopf2007*), qu'accentue généralement la consommation accrue d'O₂ par les cellules métaboliquement hyperactives, tant inflammatoires que mésenchymateuses, impliquées dans le processus de guérison qui débute.

Cette hypoxie tissulaire aiguë s'avère bénéfique car elle stimule, via la production de ROS et de NO notamment, et par la stabilisation de la voie du HIF, la cicatrisation cutanée. La chute d'O₂ active en effet les plaquettes et la cascade de la coagulation, stimule les endothéliums vasculaires, mais aussi les monocytes (MON) et les mastocytes (MAST) à relâcher des médiateurs, des cytokines pro-inflammatoires et facteurs de croissance, dont l'histamine, l'IL-1 α , l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α , le PDGF, le facteur de croissance transformant (TGF)- β , ou le VEGF (*Guo2010 ; Schreml2010 ; Rodriguez2008 ; Falabella2001*). Ces médiateurs stimulent d'une part la migration des cellules inflammatoires et mésenchymateuses vers le site de la plaie (*Winning2010 ; Rodriguez2008 ;*

Chen2004 ; Falabella2001) et, d'autre part, modifient le tonus et la perméabilité vasculaires. Une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire s'installent alors rapidement (dans les 5 à 10 minutes suivant le trauma), qui facilitent la migration des cellules de la guérison et la diffusion des nutriments, dont l'O₂, nécessaires à leur bon fonctionnement, vers le compartiment extravasculaire et la plaie.

La brèche vasculaire expose la MEC sous-endothéliale, son collagène en particulier, favorisant le dépôt du facteur de von Willebrand et donc l'activation, l'adhésion et l'agrégation des plaquettes sanguines au site de plaie. L'agrégation plaquettaire initie la cascade de la coagulation à l'origine de la formation du caillot sanguin, qui prévient tout nouveau saignement. Le rôle du caillot apparaît multiple :

- il assure la protection physique des tissus exposés par la blessure cutanée ;
- il constitue une matrice extracellulaire provisoire (MECp) qui comble le déficit tissulaire engendré par la blessure cutanée. Cette MECp est initialement composée de fibrine, de vitronectine et de thrombospondine, éléments auxquels rapidement s'ajoutent de la fibronectine et du hyaluronan, synthétisés par les cellules inflammatoires (*Schreml2010 ; Catala2008*) ;
- il sert de réservoir de cytokines, chimiokines et autres facteurs de croissance libérés par :
 - la dégranulation des plaquettes sanguines activées ; citons le PDGF, le facteur de croissance fibroblastique (FGF), le facteur de croissance épidermique (EGF), facteur de croissance de type insuline (IGF)-1, le TGF-β1 et TGF-β2 mais aussi certains dérivés actifs dont les ROS ;
 - les cellules traumatisées et/ou activées par la blessure qui bordent la plaie et qui secrètent dans cette dernière, du TGF-α, du TGF-β1, le facteur de croissance des kératinocytes (KGF), et de l'EGF, entre autres facteurs.

Ce cocktail cytokinique et de facteurs de croissance précoce initie les événements tissulaires de ré-épithélialisation, de production et de contraction du tissu conjonctif, stimule la réponse angiogénique et assure le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires circulantes dans la plaie (*Guo2010 ; Schreml2010 ; Catala2008 ; Campos2008 ; Broughton2006 ; Gosain2004*).

II / 2 / B – La phase inflammatoire

Le recrutement des cellules inflammatoires (granulocytes ou polymorphonucléaires (PMN) neutrophiles, LYM et MON) (*Annexe I : facteurs de recrutement, facteurs sécrétés et fonctions principales des cellules inflammatoires*) survient rapidement, dans les minutes qui suivent la survenue de la blessure le plus souvent (*Guo2010 ; Campos2008 ; Broughton2006 ; Gosain2004*) (nombreux signaux chimiotactiques). Sous l'effet de certains médiateurs spécifiques (bradykinine, histamine, IL-1, TNF- α), provenant entre autres sources des plaquettes et des MAST, des changements moléculaires et positionnels s'opèrent au niveau des cellules endothéliales des capillaires de la région lésée. L'expression de sélectines permet l'adhésion des leucocytes (LEU) à la paroi des vaisseaux alors que des intégrines $\beta 2$ permettent la transmigration (ou diapédèse) des LEU activés entre les cellules endothéliales qui leur donnent accès à l'espace extravasculaire et la plaie.

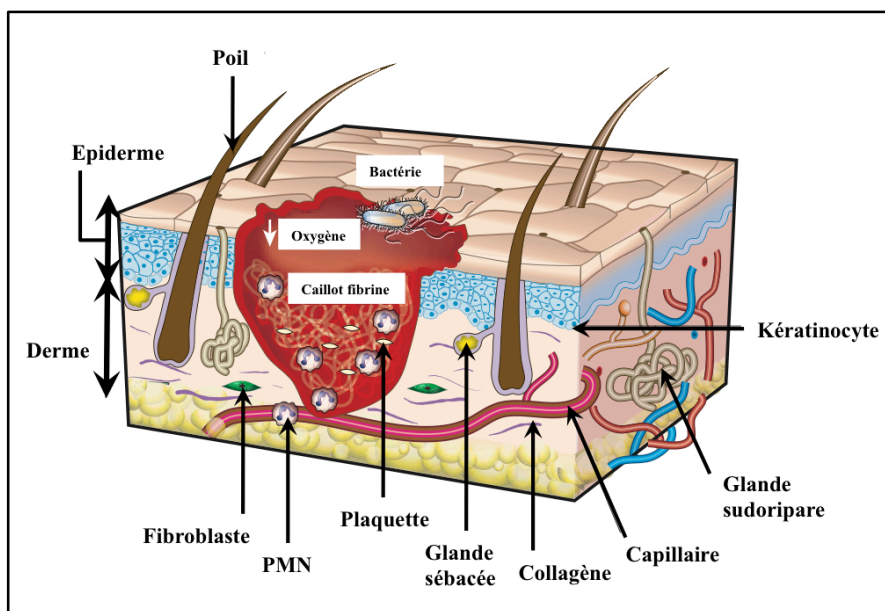


Figure 12. Représentation schématique simplifiée de la phase inflammatoire débutante de la guérison cutanée. PMN : polymorphonucléaire. Adapté de *Gurtner2008*.

II / 2 / B / i – Les granulocytes ou polymorphonucléaires neutrophiles

La tâche principale des PMN est de nettoyer la plaie de tous les microorganismes pathogènes qui l'ont envahi, et de tous les débris cellulaires et tissulaires qui s'y trouvent, par phagocytose et destruction chimique / enzymatique. L'O₂ confère aux PMN, mais aussi aux macrophages (MON/MAC), une large part de leurs propriétés antibactériennes. La membrane de leurs vacuoles contient de grandes quantités de NAD(P)H – oxydase, l'enzyme qui catalyse la production de ROS (Hopf2007 ; Soneja2005), ainsi que de nombreuses autres enzymes (collagénase, élastase, cathepsine G), très utiles pour lutter contre les microorganismes pathogènes et détruire les rebuts tissulaires et cellulaires, mais qui peuvent sévèrement endommager les tissus sains bordant la plaie lors de dégranulation intempestive (Guo2010). Les cellules inflammatoires activées par des microorganismes pathogènes apparaissent donc comme de grandes consommatrices d'O₂. Cette grande consommation d'O₂, généralement temporaire et localisée, peut créer ou accentuer une hypoxie tissulaire aiguë, même au sein d'une plaie pourtant bien oxygénée, et perturber le bon déroulement de la phase inflammatoire (Schreml2010 ; Hopf2007 ; Silver1984).

L'intensité tout comme la durée de la phase inflammatoire dépendent principalement de la nécessité et de l'aptitude des PMN à compléter cette tâche majeure (Schreml2010 ; Singer1999). Le nombre des PMN dans une plaie (figure 12) atteint généralement un pic 24 à 48 heures après la survenue de la blessure. Dès que leur tâche principale de nettoyage apparaît terminée, la migration des PMN cesse, leur activité chute, ils disparaissent en quelques jours, par apoptose, et/ou phagocytés par les MON/MAC.

Les PMN n'apparaissent pas essentiels au processus de guérison cutanée. Des études menées sur des plaies stériles et dépourvues de débris cellulaire ou tissulaire ont démontré que l'absence de PMN n'entravait pas le processus de guérison (Simpson1972).

II / 2 / B / ii – Les lymphocytes

Les LYM, en particulier les LYMT, migrent dans la plaie à la suite des autres cellules inflammatoires (Guo2010). Leur nombre atteint un pic à la fin de la phase proliférative /

au début de la phase de remodelage, entre le 5^{ème} et le 10^{ème} jours. Le rôle des LYMT n'est pas complètement compris et fait l'objet d'intenses recherches. Plusieurs études suggèrent qu'un retard dans la migration des LYMT et une diminution de leur concentration dans la plaie entraîneraient une cicatrisation cutanée pathologique. D'autres rapportent que les LYMT auxiliaires (LYMT-CD4+) stimuleraient alors que les LYMT cytotoxiques (LYMT-CD8+) inhiberaient le processus de guérison cutanée (*Park 2004 ; Swift 2001*).

Les lymphocytes T gamma-delta épidermiques (LYMT- $\gamma\delta$) régulent bien des aspects de la cicatrisation cutanée : ils œuvrent pour l'intégrité tissulaire, participent à la défense contre les microorganismes pathogènes et régulent l'inflammation. Les LYMP-DETC sont principalement activés par les kératinocytes endommagés, stressés ou transformés. Ils produisent du KGF et de l'IGF-1 qui favorisent la survie et la prolifération des kératinocytes. Les LYMT- $\gamma\delta$ libèrent aussi des chimiokines et cytokines qui participent à l'initiation et la régulation de la phase inflammatoire. Le dialogue constant entre les LYMT- $\gamma\delta$ et les kératinocytes apparaît essentiel au bon fonctionnement de l'épiderme et de la cicatrisation cutanée. Plusieurs études rapportent que des souris transgéniques ne possédant pas de LYMT- $\gamma\delta$ montrent une guérison cutanée retardée par un manque de prolifération des kératinocytes (*Guo2010 ; Mills2008 ; Jameson2007*).

D'autres études, dont une étude récente portant sur des souris transgéniques déficientes en LYMT et en lymphocytes B (LYMB), ont démontré qu'en l'absence de ces cellules, la guérison semblait davantage s'orienter vers un processus de régénération tissulaire plutôt que de réparation tissulaire, la cicatrisation y étant moindre (*Gawronska-Kozak2006*).

II / 2 / B / iii – Les monocytes activés en macrophages

L'augmentation rapide du nombre des MON/MAC pendant la phase inflammatoire résulte principalement de la migration des MON sanguins vers le compartiment extravasculaire et de leur différenciation en MON/MAC, qui viennent ainsi prêter main forte aux MON/MAC tissulaires. Les MON/MAC jouent de multiples rôles

dans la cicatrisation cutanée. Leur activité et leurs actions sont généralement corrélées aux conditions environnementales dans lesquelles ils se trouvent.

En début de phase inflammatoire, les MON/MAC se comportent tels des PMN, ils nettoient la plaie de tous les microorganismes pathogènes qui l'ont envahi et de tous les débris cellulaires et tissulaires qui s'y trouvent. Tout comme les PMN, ils possèdent un arsenal enzymatique conséquent fait de NAD(P)H – oxydase, de collagénase et d'élastase, mais aussi d'activateur du plasminogène (PA) permettant la synthèse de plasmine, à l'origine d'une dissolution des membranes basales et du remodelage de la MECp par dissolution de la fibrine, entre autres produits. Les MON/MAC relâchent de nombreuses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires qui aident à la migration et à l'activation des leucocytes. Alors que la phase inflammatoire progresse, leur phénotype change : ils dégradent progressivement le caillot sanguin, induisent l'apoptose et participent à la clairance des cellules inflammatoires par phagocytose (PMN) tout en produisant de nombreux facteurs de croissance (TGF- α , TGF- β , PDGF, VEGF entre autres facteurs) qui stimulent les cellules de la guérison (fibroblastes et cellules endothéliales) à entrer en action. Ils favorisent ainsi la transition de la phase inflammatoire à la phase proliférative subséquente (*Guo2010 ; Schreml2010 ; Mosser2008 ; Meszaros 2000*).

Des études réalisées chez des souris transgéniques dépourvues de PMN et de MON/MAC ont rapporté une bonne guérison cutanée en l'absence de cellules inflammatoires, et une tendance à la régénération cutanée plutôt qu'à la cicatrisation cutanée en l'absence de PMN et de MON/MAC (*Martin2003*). PMN et MON/MAC semblent donc favoriser la cicatrisation tissulaire plutôt que sa régénération (*Duffield2005*).

II / 2 / C – La phase proliférative (ou phase productive)

La phase proliférative suit généralement la phase inflammatoire ; elle se caractérise par le développement d'un tissu de granulation devenant progressivement contractile, à la surface duquel s'installe un néo épithélium. Les cellules mésenchymateuses (fibroblastes et cellules endothéliales) sont les maîtres d'œuvre de la phase

proliférative. Dans les 3 à 5 jours qui suivent la survenue de la blessure, elles migrent depuis la périphérie de la plaie vers le caillot sanguin qu'elles investissent, et entrent en action, en réponse aux plaquettes, aux MON/MAC et autres cellules inflammatoires qui libèrent chimiokines, cytokines et facteurs de croissance (TNF- α , IGF-1, PDGF, EGF, FGF, TGF- β et VEGF) (*Annexe III : cytokines et facteurs de croissance, leurs fonctions principales et les principales cellules productrices*). Les intégrines (ex. intégrine $\alpha 5\beta 1$) jouent un rôle majeur dans la migration des cellules mésenchymateuses. Ces protéines, récepteurs transmembranaires spécifiques de molécules constitutives de la MEC, gèrent les interactions et la transduction des signaux entre les cellules mésenchymateuses et leur environnement, assurant un dialogue constant et une adaptation cellulaire permanente.

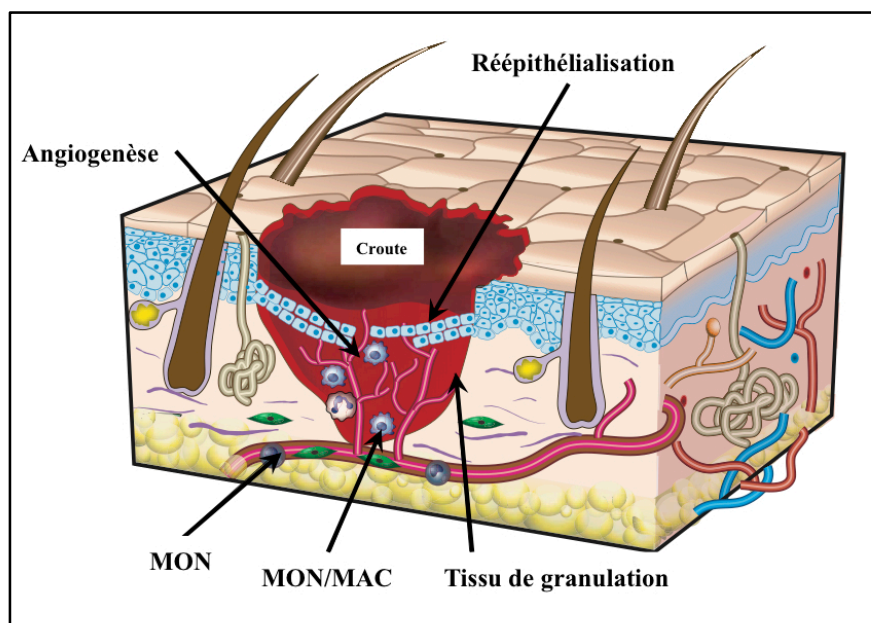


Figure 13. Représentation schématique simplifiée des divers événements survenant pendant la phase proliférative de la guérison cutanée. MON : monocyte ; MON/MAC : macrophage. Adapté de *Gurtner2008*.

II / 2 / C / i – Le tissu de granulation

II / 2 / C / i / a – Fibroblastes et fibroplasie

Sous l'effet de certains composés (fibronectine, hyaluronan) et certains facteurs de croissance (TGF- β 1 principalement), les fibroblastes résidents du derme prolifèrent au voisinage de la plaie et migrent dans la MECp. Ils s'y multiplient puis, à la faveur d'un changement de phénotype, produisent les constituants d'une MEC riche en collagène immature (type III), en GAG, en protéoglycanes (PG) et en hyaluronane. La MEC, généralement abondante, va progressivement remplacer la MECp formée lors de la phase d'hémostase et en cours de dégradation par les MAC ; elle comble ainsi progressivement le déficit tissulaire créé par la blessure cutanée. La MEC subit ensuite une phase de maturation (encore appelée phase de remodelage) durant laquelle le collagène de type III est progressivement remplacé par du collagène de type I, les fibroblastes ralentissent leur synthèse matricielle et disparaissent par apoptose ou se différencient et acquièrent des propriétés contractiles, devenant alors des myofibroblastes (*Roy2003 ; Wrobel2002 ; Desmouliere1993*).

II / 2 / C / i / b – Myofibroblastes et contraction

Sous l'effet de facteurs environnementaux, mais aussi du TGF- β 1, du PDGF, du facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF), de l'inhibiteur de type I des kinases cycline-dépendantes (p21), des ROS (*Barnes2011*) ou de composants de la MEC telle la fibronectine (*Modarressi2010 ; Sen2010 ; Roy 2010 ; Hinz2007b ; Hinz2003 ; Roy2003 ; Desmouliere1993 ; Ronnov-Jensen1993*), certains fibroblastes se différencient (*Sen2010*) et acquièrent un fin réseau de microfilaments cytoplasmiques d'alpha-actine musculaire lisse (α -SMA) arrangés parallèlement au grand axe cellulaire et en continuité avec certains composants de la MEC via les intégrines, qui leur confère des propriétés contractiles (*Hinz2007 ; Gabbiani2003 ; Hinz2001*). Ce fin réseau les fait étroitement ressembler à des cellules musculaires lisses : on les nomme alors myofibroblastes. D'autres cellules telles des cellules endothéliales, des kératinocytes, des péricytes, des fibrocytes voire certains MON/MAC semblent en mesure de se différencier en myofibroblastes (*Modarressi2010 ; Sen2010 ; Desmouliere2005 ; Ishii2005 ; Mori2005 ; Rajkumar2005 ; Desmouliere2003 ; Direkze2003*). Il existe

encore peu d'information quant au taux spécifique de participation de ces différentes populations cellulaires au pool final de myofibroblastes (Hinze2007a); il reste aussi à déterminer si les caractéristiques et la fonctionnalité des myofibroblastes d'origine diverse sont, ou non, similaires (Hinze2007b; Guyot2006).

Les myofibroblastes sont à l'origine d'une partie de la maturation (production de collagène de type I) et de la contraction progressive du tissu de granulation (α -SMA), qui participe à la fermeture de la plaie (Hinze2007a; Hinze2007b). Plus la contraction sera grande, moins la place occupée par le tissu cicatriciel de remplacement et les besoins en ré-épithélialisation seront importants, plus le tissu lésé pourra retrouver une fonctionnalité proche de la normale, dans la plupart des cas. La contraction cutanée est plus importante chez l'animal, du fait du *pannus carnosus*, que chez l'Homme qui ne possède que rarement une musculature sous-cutanée.

Le nombre de myofibroblastes présents dans un tissu de granulation apparaît proportionnel au besoin en contraction du tissu lésé, en règle générale. Avec la progression de la guérison, les besoins en contraction diminuent généralement, et le nombre de myofibroblastes décroît. La contraction d'une plaie est plus importante dans les régions où le derme est lâche. La contraction tissulaire n'est pas initiée si le nombre de myofibroblastes se révèle insuffisant, et prend fin lorsque la tension créée dans les tissus avoisinants est égale ou supérieure à la force contractile des myofibroblastes, ou dès que les bords de la plaie se rencontrent. Les myofibroblastes disparaissent soit par différenciation et retour à un état fibroblastique, soit par apoptose (Desmoulière1995).

II / 2 / C / i / c – Cellules endothéliales et angiogenèse

L'hypoxie tissulaire aiguë qui caractérise le début de la cicatrisation cutanée stimule, via la production de ROS et de NO, mais aussi par la stabilisation de la voie du HIF, la cicatrisation cutanée. Parmi les cellules activées figurent les fibroblastes, les MON/MAC, les cellules endothéliales et les kératinocytes (Schreml2010; Hopf2005; Sen2002). Toutes ces cellules produisent du VEGF, le principal facteur de croissance de l'angiogenèse, dont la finalité est de rétablir rapidement les apports nutritionnels

essentiels au bon fonctionnement cellulaire, et l'apport en O₂ tout particulièrement. La synthèse de la MEC par les fibroblastes ne peut en effet avoir lieu sans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants : les fibroblastes qui synthétisent la MEC ont d'importants besoins en nutriments, dont l'O₂, que seul un réseau vasculaire développé peut leur fournir. Inversement, les cellules endothéliales ont besoin d'un substrat de support permettant l'organisation d'un réseau vasculaire fonctionnel. La MEC le leur offre. La participation des kératinocytes à la production de VEGF, et donc à l'angiogenèse, est significative (*Hong2004 ; Rossiter2004*) : les kératinocytes seraient les principales cellules productrices de VEGF, devant les MON/MAC, les fibroblastes et les cellules endothéliales.

Le VEGF stimule la migration, la prolifération et l'organisation des cellules endothéliales en néo vaisseaux (figure 13) au sein de la MEC (*Schreml2010 ; Sen2002*). Le VEGF stimule aussi l'iNOS, favorisant ainsi la production de NO, qui en retour stimule la production de VEGF par les cellules auparavant citées (*Rizk2004*). Le NO atténue aussi l'expression des molécules d'adhésion intercellulaire des cellules endothéliales, telles la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) ou la sélectine E et favorise la formation de pseudopodes. La migration des cellules endothéliales au sein de la MEC et la formation de néo vaisseaux peuvent alors débiter (*Isenberg2005*). L'angiogenèse est orientée selon des gradients d'O₂ et de facteurs de croissance, la néo vascularisation se dirigeant vers les régions à la concentration en O₂ la plus faible et en facteurs de croissance la plus forte. Lorsque ces gradients s'atténuent et viennent à disparaître, l'angiogenèse cesse. Si les besoins tissulaires en nutriments essentiels s'atténuent, ce qui s'observe lors de l'évolution de la guérison et de la maturation du tissu cicatriciel, la néo vascularisation progressivement régresse sous l'effet de certaines enzymes matricielles (MMP), et les cellules endothéliales disparaissent par apoptose (*Guo2010*).

II / 2 / C / ii – La ré-épithélialisation et les kératinocytes

Sous l'effet de divers facteurs de croissance et autres médiateurs, tels le TNF- α (*Rodriguez2008 ; Li2006*) et le NO (*Isenberg2005 ; Rizk2004*) les kératinocytes situés à la périphérie

de la plaie se différencient (phénotype prolifératif) et prolifèrent rapidement après la survenue d'une blessure cutanée (24 à 48 heures) (Rodriguez2008 ; Falabella2001). Dès comblement du déficit tissulaire par le caillot sanguin et/ou un tissu de granulation (48 à 72 heures), les kératinocytes se différencient à nouveau (phénotype migratoire) et migrent, de la périphérie vers le centre de la plaie (figure 13), à la surface de la MEC à laquelle ils s'ancrent. Les kératinocytes migratoires ont certaines propriétés fort intéressantes :

- les kératinocytes migratoires se désolidarisent les uns des autres par dissolution de leurs desmosomes et hémidesmosomes, et développent des pseudopodes membranaires (lamellipodes et filopodes), ainsi qu'un cytosquelette composé de filaments cytoplasmiques d'actine leur permettant de se mouvoir (Jacinto2005) ;
- les kératinocytes migratoires secrètent des enzymes protéolytiques (MMP-1, -2, -3, -10, -14, -19, et -28) leur permettant de partiellement dégrader le caillot sanguin sous lequel ils cheminent, les débris cellulaires et tissulaires rencontrés en chemin, mais aussi la MEC à la surface de laquelle ils migrent (Schrem12010). L'« agression » enzymatique de la MEC permet aux kératinocytes migratoires de dévoiler certains de ses constituants spécifiques (fibronectine) ;
- les kératinocytes migratoires expriment certaines intégrines, dont l'intégrine $\alpha v \beta 6$ (Hakkinen2004), qui leur permettent de former des contacts focaux entre certains constituants de la MEC (ex. fibronectine) et leur cytosquelette. La succession alternée d'établissement et de rupture de ces contacts focaux d'adhérence permettent aux kératinocytes de migrer (Schrem12010 ; Jacinto2005).

Fait intéressant, les kératinocytes produisent naturellement des peptides antimicrobiens qui se révèlent importants au maintien de l'homéostasie cutanée et à la cicatrisation des plaies (Sivamani2007 ; Pivaresi2004 ; Sorensen2003). En effet, l'un de ces peptides, l'hCAP18, en plus de ses propriétés bactéricides sur *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* (Murakami2004), accroît les capacités migratoires des kératinocytes, et par conséquent, favorise la ré-épithélialisation, par transactivation du récepteur à l'EGF (Tokumaru2005).

Les kératinocytes perdent leur phénotype migratoire dès que la ré-épithélialisation de la plaie est complétée. Ils redeviennent alors quiescents et s'ancrent très progressivement plus solidement à la nouvelle membrane basale, riche en laminine, et au derme sous-jacent via des hémidesmosomes et des fibrilles de collagène de type VII. La présence de kératinocytes à la surface de la MEC n'est pas sans conséquence : ils influent sur le comportement des fibroblastes et tendent à leur faire quitter la phase proliférative pour les faire entrer dans la phase de remodelage de la MEC (*Ghaffari2009 ; Ghaffari2006 ; Ghahary2004*).

II / 2 / D – La phase de remodelage

La phase de remodelage débute rapidement après la mise en place du tissu de granulation (3^{ème} à 7^{ème} jour). Elle se caractérise par une maturation de ce dernier en tissu cicatriciel de remplacement, encore appelé tissu fibreux cicatriciel. Elle s'étale généralement sur plusieurs mois voire plusieurs années (*Schrem12010 ; Guo2010*). Le « but » de cette phase ultime de la guérison est simple : soit le tissu cicatriciel de remplacement a une architecture la plus proche possible du tissu lésé, soit il occupe le moins de place possible au sein du tissu lésé (*Guo2010*).

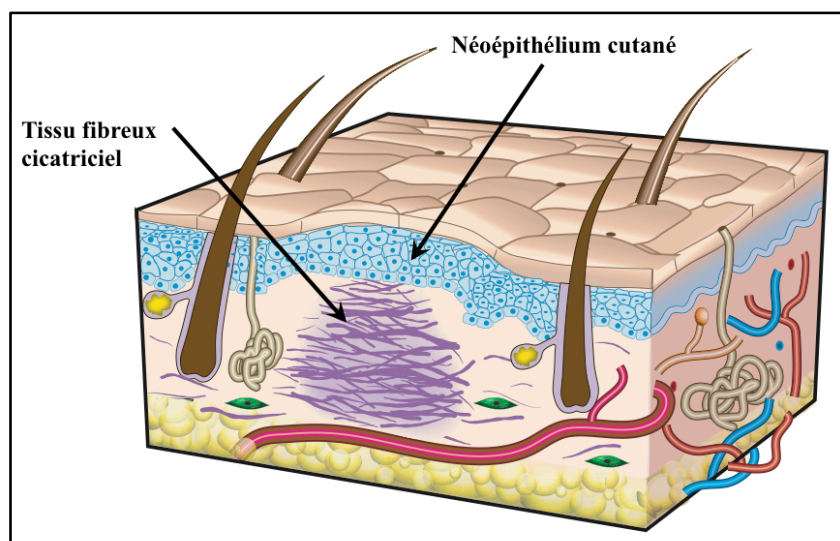


Figure 14. Représentation schématique simplifiée de la phase de remodelage et du tissu fibreux cicatriciel. Adapté de *Gurtner2008*.

La phase de remodelage s'effectue via le jeu concerté d'enzymes de dégradation de la MEC et de leurs inhibiteurs, et d'enzymes de synthèse de la MEC. Ces enzymes sont libérées tant par les cellules mésenchymateuses de la guérison que les cellules inflammatoires après stimulation par certains médiateurs spécifiques, tels l'INF γ ou les ROS (Siwik2004). Les enzymes protéolytiques qui dégradent les constituants de la MEC sont généralement des protéinases qui appartiennent aux deux familles suivantes :

- les MMPs (ou matrixines). La synthèse de la plupart des MMP est négligeable dans le tissu conjonctif normal. On en rencontre en grande quantité dans les plaies en cours de guérison, lors d'inflammation ou dans le processus de dispersion tumorale. On distingue quatre sous-familles : les collagénases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 / lyse du collagène), les stromélysines (MMP-3, MMP-10, MMP-11 / lyse du collagène, de la fibronectine, de la laminine, des gélatines, des PG), les gélatinases (MMP-2, MMP-9 / lyse du collagène, des gélatines, de l'élastine) et les matrilysines (MMP-7 / lyse du collagène, de la fibronectine, de la laminine, des gélatines, des PG).
- les sérines protéinases, principalement représentées par (Catala2008) la plasmine, dont le rôle principal est la lyse de la fibrine dans le processus de fibrinolyse, à l'origine de produits de dégradation de la fibrine.

Ces enzymes ont des inhibiteurs non spécifiques, (macroglobuline- α 2, antiprotéase- α 1), mais aussi spécifiques (inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases TIMP).

Les MMPs apparaissent virtuellement capables de dégrader tous les composés de la MEC, sans distinction. Les TIMPs inhibent l'activation des MMPs, mais aussi favorisent la prolifération d'un grand nombre de cellules, stabilisent les membranes basales des néo épithéliums, inhibent l'angiogenèse, induisent l'apoptose cellulaire, conduisant le tissu cicatriciel de remplacement vers sa forme finale, à savoir une structure avasculaire, acellulaire, principalement composée de collagène. Le juste équilibre des MMPs/TIMPs est d'une importance cruciale dans le remodelage final du tissu de granulation, tout débalancement menant à une résolution anormale de la guérison et une cicatrisation cutanée pathologique.

Un des évènements principaux de la phase de remodelage est la maturation du collagène. En effet, durant la phase de prolifération est principalement synthétisé et déposé par les fibroblastes du collagène de type III, immature, qui ne procure aucune solidité à la plaie. Le remplacement du collagène de type III par du collagène de type I, qui procure force et résistance au tissu cicatriciel de remplacement, s'effectue via le jeu concerté des MMPs et de leurs inhibiteurs, sous l'égide des myofibroblastes, principaux acteurs de la phase de remodelage du collagène, avec l'aide des enzymes de synthèse et d'organisation spatiale du collagène que sont les lysine et proline hydroxylases, la lysyl hydroxylase et oxydase (Schreml2010 ; Myllyla1977). L'activité de ces enzymes, des hydroxylases en particulier, est étroitement liée à la teneur en O₂. La matrice remodelée, les myofibroblastes disparaissent par apoptose ou différenciation fibroblastique.

Ainsi, le tissu de granulation, initialement riche en cellules mésenchymateuses et en vaisseaux sanguins, devient relativement acellulaire et avasculaire alors que la cicatrisation cutanée progresse et forme un tissu fibreux cicatriciel (figure 13).

En résumé :

La cicatrisation cutanée normale figure parmi les processus biologiques les plus complexes (Gurtner2008), tel qu'il a été décrit. Des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance, et d'autres composés (dont des dérivés actifs directs (ROS) et indirects (NO, RNOS) de l'O₂) en grand nombre interviennent, de nombreuses populations cellulaires interagissent, dans un jeu scénique qui apparaît somme toute millimétré. Cette complexité permet sans nul doute l'adaptabilité du processus à la diversité des tissus et des injures tissulaires rencontrés, mais laisse transparaître une certaine fragilité. Qu'advient-il lorsque le processus se dérègle ?

SECTION III : La cicatrisation cutanée pathologique chez les mammifères adultes

III / 1 – DIVERSITÉ DE LA CICATRISATION CUTANÉE PATHOLOGIQUE CHEZ LES MAMMIFÈRES ADULTES : HOMME versus CHEVAL

La guérison cutanée chez les mammifères adultes peut se compliquer et devenir pathologique, soit par défaut soit par excès de production de tissu cicatriciel. Parmi les mammifères, le cheval occupe une niche à part dans le domaine de la cicatrisation cutanée pathologique car il tend à en développer une à la fois par défaut et par excès (*Theoret2008a ; Wilmink2008 ; Wilmink2005*). De nombreux facteurs, tant locaux que systémiques, apparaissent en mesure de perturber le processus de guérison tissulaire, dont l'oxygénation tissulaire (*Guo2010 ; Hopf2007*).

III / 1 / A – La cicatrisation cutanée pathologique chez l'Homme

La cicatrisation cutanée pathologique revêt, chez l'Homme, deux formes principales :

- soit un défaut de production de tissu cicatriciel, à l'origine de plaies chroniques, non épithélialisées.
- soit un excès de production de tissu cicatriciel, à l'origine de cicatrices hypertrophiques et de chéloïdes, épithélialisées.

D'autres complications de la cicatrisation cutanée, telles la contracture cicatricielle et la transformation tumorale sont parfois rencontrées. Leur bien moindre fréquence, tant chez l'Homme que chez le cheval, fait qu'elles ne seront pas abordées dans cette recension de la littérature, malgré leur importance indéniable.

III / 1 / A / i – Les plaies chroniques

III / 1 / A / i / a – Qu'est-ce qu'une plaie chronique

Une plaie chronique se définit comme une plaie dont l'évolution, pour tout ou partie de la plaie, est bloquée dans la phase inflammatoire de la guérison. Une plaie chronique présente généralement une infiltration prolongée par les PMN et les MON/MAC, une activité protéolytique accrue, une présence excessive de ROS, une

angiogénèse déficiente, un tissu de granulation de mauvaise qualité en faible quantité et une épithélialisation faible à absente (*Bjarnsholt2008 ; Medina2005 ; Schultz2003 ; Falanga2000*) (figure 15).

On distingue 3 catégories de plaies chroniques : (1) les ulcères veineux ou artériels, (2) les ulcères de lit, encore appelés de pression, et (3) les ulcères diabétiques (*Mustoe2006 ; Medina2005*).

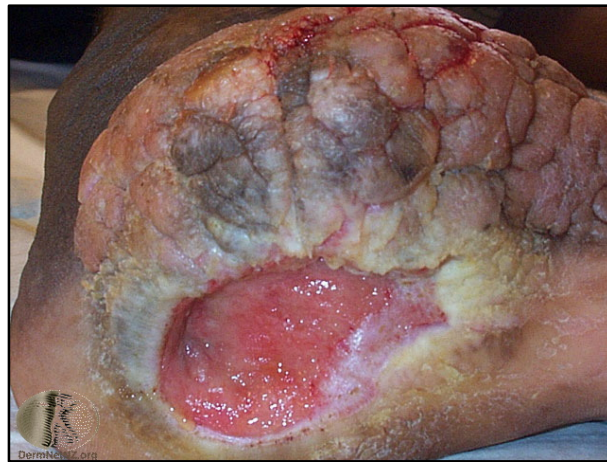


Figure 15. Plaie humaine mixte située au niveau du talon. La moitié inférieure de la photo représente une plaie chronique avec ulcère. On note le manque de comblement par un tissu de granulation et l'absence de recouvrement épithélial. Une chéloïde se situe dans la moitié supérieure de la photo. Crédit photo : New Zealand Dermatological Society Incorporated.

Une prédisposition génétique semble exister : les femmes et les individus de race caucasienne apparaissent plus disposés à développer des plaies chroniques (*Lyder2001*). Les personnes alitées apparaissent aussi prédisposés au développement de plaies chroniques.

III / 1 / A / i / b – Pathogénie simplifiée des plaies chroniques

L'infiltration prolongée des plaies chroniques par les PMN et les MON/MAC, conséquence probable d'une plus grande contamination bactérienne et de la formation

de biofilms bactériens (*Burmolle2010 ; Thomsen2010 ; Schierle2009 ; Bjarnsholt2008 ; Kirketerp-Moller2008*), s'accompagne d'une forte augmentation locale des concentrations en protéinases (MMP-1, MMP-2 et MMP-9 / sérines protéases, élastases, plasmine) (*Medina2005 ; Yager1999 ; Yager1997*) et en ROS, qu'ils produisent en quantité. La protéolyse de la MECp / MEC est une étape importante du processus de cicatrisation cutanée : elle permet la migration des cellules mésenchymateuses et l'initiation des processus de prolifération et de synthèse (angiogenèse, fibroplasie, ré-épithélialisation), puis le remodelage du tissu de granulation en tissu cicatriciel acellulaire et avasculaire (*Lobmann2002 ; Peled2002 ; Yager1999 ; Yager1997*). Les fibroblastes de plaie chronique ne produisent pas de quantité accrue de MEC; l'augmentation des protéinases, principales enzymes de dégradation de la MEC, sans augmentation notable de leurs inhibiteurs (*Grinnel1998 ; Yager1997 ; Rao1995*) s'accompagnent donc de la dégradation de cette dernière. Ces protéinases, à forte concentration, en plus de s'attaquer directement à la MEC, endommagent certains facteurs de croissance clés, tels l'EGF, le FGF-2, le PDGF, le TGF- β , ou le VEGF (*Fu2002 ; Landau2001 ; Payne2001 ; Shukla1998 ; Yager1997*), certaines chimiokines d'importance, tels les facteurs d'attraction des MON (*Strongin1995*) ou certaines intégrines, telle l'intégrine $\alpha\beta6$ (*Hakkinen2004*), indispensables au bon déroulement du processus de cicatrisation. Cette modification globale de l'environnement des plaies chroniques (*Medina2005 ; Falanga1993a ; Falanga 1993b*) altère les capacités réactionnelles des cellules mésenchymateuses de la guérison (*Xia2001 ; Wu1999*). Certaines cellules, dont les fibroblastes, entrent alors en sénescence. Ce faisant, leurs réponses aux différents stimuli et leurs synthèses changent. Les cellules sénescents tendent à produire davantage d'IL-1 α , de ROS, d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI)-1, de TIMP-1 et -2, des quantités moindres de MMP-1 et -2, à résister aux mécanismes d'apoptose, et à stimuler le système immunitaire alors que leur prolifération généralement s'atténue (*Medina2005 ; Cook2000 ; Shelton1999*).

La plaie chronique se révèle ainsi incapable de produire une MEC de qualité pouvant servir de substrat, de support à une angiogenèse et une ré-épithélialisation adaptées. Des débris permanents sont générés qui entretiennent la phase inflammatoire dans laquelle la plaie chronique est piégée.

III / 1 / A / ii – Les chéloïdes

III / 1 / A / ii / a – Qu'est-ce qu'une chéloïde ?

Une chéloïde se définit comme une surproduction de tissu cicatriciel localement agressive qui, typiquement, envahit les tissus avoisinant la plaie dans laquelle elle s'est initialement développée (Shih2010 ; Atiyeh2005) (figure 16). Cette agressivité différencie les chéloïdes des cicatrices hypertrophiques *stricto sensus*, non invasives (figure 16), et explique pourquoi les chéloïdes sont souvent qualifiées de tumeur dermique fibroproliférative non maligne, leur taux de récurrence après ablation chirurgicale se révélant par ailleurs très élevé (Shih2010 ; Atiyeh2005 ; Bayat2003).

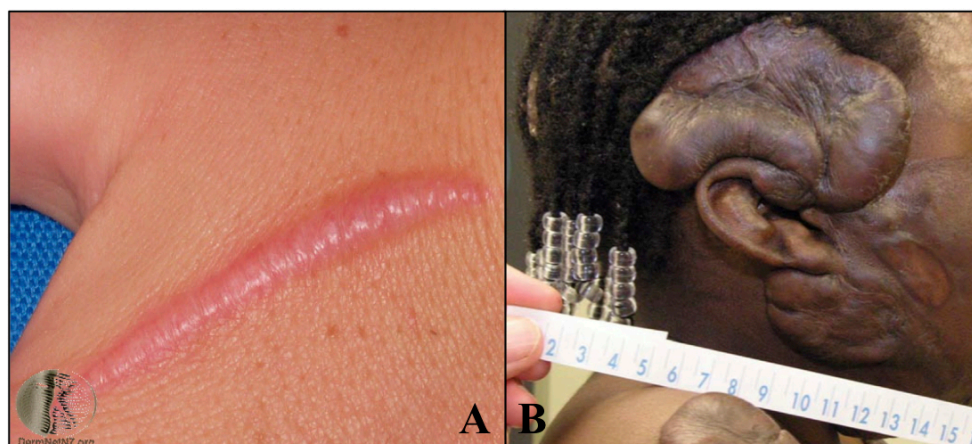


Figure 16. Plaies cutanées épithélialisées pathologiques humaines.

Section A : cicatrice hypertrophique située sur la face dorsale d'une main. La cicatrice hypertrophique se définit comme une cicatrice anormale non envahissante dépassant la surface de la peau, qui régresse spontanément avec le temps, en règle générale. Une production excessive de tissu cicatriciel est observée, qui reste cependant confinée au site d'injure initial. Section B : chéloïdes situées au pourtour de l'oreille et sur l'épaule. La chéloïde se définit comme une cicatrice anormale envahissante dépassant la surface de la peau, qui ne régresse pas spontanément avec le temps. Une production excessive de tissu cicatriciel est observée, tant au site d'injure initial que dans les tissus environnant la plaie (Atiyeh2005). Crédit photo : New Zealand Dermatological Society Incorporated.

Les chéloïdes apparaissent après des traumatismes cutanés d'intensité très variable, de la simple éraflure à la brûlure au second degré en passant par la lésion d'acné (English1999 ; O'Sullivan1996).

Une prédisposition génétique semble exister, les individus de certaines familles, à forte pigmentation cutanée (races hispaniques et noires) (figures 2 & 16), apparaissant plus disposés à développer des chéloïdes (Atiyeh2005).

III / 1 / A / ii / b – Pathogénie simplifiée des chéloïdes

La formation d'une chéloïde est généralement causée par un dérèglement d'une ou de plusieurs des phases de la guérison, dont l'évolution ne s'est cependant pas arrêtée (Butler2008), à l'inverse de ce qui est observé dans les plaies chroniques. Certains chercheurs penchent pour une réponse anormale des fibroblastes aux stimuli inflammatoires lors de ladite phase (Sandulache2007), d'autres pour une prolongation de la phase proliférative jumelée à une phase de remodelage retardée (Luo2001 ; Akasaka2001 ; Chipev2000 ; Ladin1998). L'hypoxie semble jouer un rôle important dans la pathogénie des chéloïdes : une plus grande occlusion des microvaisseaux chéloïdiens ainsi que des taux plus élevés de HIF-1 α sont rapportés (Zhang2006 ; Fujiwara2005 ; Kischer1992).

Une augmentation significative et une distribution tissulaire anormale des MAS (Fong2002 ; Craig1986), ainsi qu'une augmentation et une plus longue persistance des MON/MAC mais aussi des LYM (ratio LYMT-CD4+ / LYMT-CD8+ anormalement élevé) (Boyce2001) au sein des chéloïdes sont rapportées, sans que des conclusions claires en soient tirées. Ces cellules produisent quantité de cytokines, facteurs de croissance et autres composés. Dans le sang périphérique des patients atteints de chéloïdes (McCauley1992), sont principalement observées :

- une augmentation des taux de TNF- α , d'IL-6 et d'IFN- β ,
- une diminution des taux d'IFN- α , d'IFN- γ et de TNF- β .

Dans le processus de cicatrisation cutanée normale, l'INF- γ antagonise les effets du TGF- β 1, principal facteur pro fibrose de la guérison tissulaire, en favorisant le remodelage de la MEC. L'INF- γ inhibe ainsi la prolifération des fibroblastes et la production de la MEC (Adelmann-Grill1987), réduit les niveaux de pro collagène (Jimenez1984) et augmente la synthèse des collagénases (Duncan1989). La diminution de l'IFN- γ favorise donc l'action du TGF- β 1, sur les fibroblastes en particulier. Les fibroblastes chéloïdiens ont longtemps été désignés comme les principaux responsables du

développement des chéloïdes puisqu'ils produisent la MEC et présentent une plus grande affinité / réceptivité pour certains facteurs de croissance pro fibrose tels le PDGF (*Haisa1994*), le CTGF (*Smith2008*) ou le TGF- β 1 (*Fujiwara2005* ; *Lee1999*), sécrétés en grandes quantités. Ils n'en sont cependant pas les seuls responsables. En effet, les kératinocytes chéloïdiens apparaissent aussi impliqués dans le processus ; ils agissent de façon paracrine sur les fibroblastes présents dans le tissu de granulation (*Khoo2006* ; *Lim 2002* ; *Meyer2000* ; *Abergel1985*) via l'action de certains facteurs de croissance pro fibrose, tel le VEGF (*Caufield2008* ; *Beer2005* ; *Thomas1994* ; *Kischer1992* ; *Kischer1982*) ou le CTGF (*Smith2008* ; *Khoo2006*). Le CTGF supporte l'activité du TGF- β 1 (*Wang2011*), avec lequel il coopère et dont la production est fortement accrue dans les chéloïdes (*Fujiwara2005* ; *Lee1999*), à l'origine probable de la fibroplasie excessive. Le TGF- β 1 favorise aussi la transformation myofibroblastique des fibroblastes et l'expression de l' α SMA. Les myofibroblastes chéloïdiens sont à l'origine de la maturation du collagène de type III en type I, beaucoup plus abondant dans les chéloïdes (ratio collagène type I / collagène type III = 17) que dans les cicatrices cutanées normales (ratio collagène type I / collagène type III = 6) (*Friedman1993*).

L'apoptose est un événement important dans la cicatrisation cutanée, comme il a été décrit. Par ce mécanisme disparaissent tout ou partie des cellules inflammatoires et mésenchymateuses impliquées dans la guérison, laissant un tissu cicatriciel final relativement quiescent et acellulaire (*Shih2010*). La cicatrisation hypertrophique observée dans les chéloïdes semble être la conséquence des perturbations ci-haut détaillées, mais aussi, de la résistance à l'apoptose des fibroblastes et myofibroblastes chéloïdiens (*Chodon2000*) qui, plutôt que de disparaître, poursuivent leurs activités de prolifération, de synthèse et de maturation, à l'origine du déséquilibre du métabolisme du collagène et de l'accumulation de collagène de type I. La surproduction de TGF- β 1 (*Chodon2000*), ainsi que la diminution naturelle de certains facteurs pro apoptose cutanés, telles les caspases 6 et 14 chez les individus prédisposés au développement de chéloïde (*Nassiri2009*), pourraient expliquer cette résistance à l'apoptose.

La cicatrisation cutanée pathologique apparaît donc relativement diversifiée chez l'Homme. Les deux formes de complications venant d'être détaillées apparaissent d'ailleurs à l'exacte opposée l'une de l'autre. La guérison, en tant que processus biologique, des chéloïdes ne semble jamais vouloir s'arrêter, celle des plaies chroniques apparaît prisonnière d'une phase dont elle semble ne jamais pouvoir s'échapper. Mais dans l'une et l'autre complications, toutes les cellules de la guérison, qu'elles soient inflammatoires ou mésenchymateuses, semblent perturbées. Qu'en est-il chez le cheval ?

III / 1 / B – La cicatrisation cutanée pathologique chez le cheval

La cicatrisation cutanée pathologique chez le cheval apparaît mixte, i.e. à la fois par défaut et par excès, ce qui semble rarissime chez l'Homme (*Pokharel1999*). Le cheval qui cicatrise anormalement tend en effet à développer un abondant tissu de granulation, comme lors de chéloïde chez l'Homme, nommé tissu de granulation exubérant (TGE) chez le cheval, mais avant qu'il y ait ré-épithélialisation (*Theoret2008 ; Wilmink2008 ; Wilmink2005*), à l'image des plaies chroniques humaines (figure 17).



Figure 17. Plaie cutanée située à l'aspect plantaire latéral du boulet pelvien gauche avec tissu de granulation exubérant. Les trois photos représentent diverses vues de la même plaie. On y observe un tissu de granulation anormalement développé et l'absence de recouvrement épithélial. Cheval WarmBlood de 12 ans. Blessure ≈ 2 ans. Crédit photo : Christophe Celeste.

Les TGE, communément appelés « bouton de chair » ou « *proud flesh* », apparaissent après des traumatismes cutanés d'intensité très variable. Une prédisposition génétique, tout comme un développement privilégié dans des sites anatomiques particuliers, semblent exister.

III / 1 / B / i – Prédisposition génétique & autres types de prédisposition

III / 1 / B / i / a – Spécificités raciales

Des observations cliniques étayées par de nombreuses études comparatives (*Wilmink2003 ; VanDenBoon2002 ; Wilmink2001 ; Wilmink1999a ; Wilmink1999b*) ont mené au constat qu'il existe des prédispositions génétiques au développement du TGE au sein de l'espèce équine. Jamais observé chez les équidés sauvages (cheval de Prjevalski, zèbre), à cause de la possible élimination naturelle par les prédateurs des équidés blessés ou présentant un handicap, des différences notables existent entre les équidés domestiques, en particulier entre les chevaux de taille normale (150 à 170 cm) et les poneys, de plus petite taille. Le TGE s'observe très fréquemment chez les chevaux de taille normale alors qu'il est rarissime de le rencontrer chez les poneys.

Le processus de cicatrisation cutanée chez les poneys présente les caractéristiques globales suivantes, lorsqu'on le compare au processus observé chez les chevaux :

- une phase inflammatoire plus importante (on y observe une migration rapide des PMN au sein des plaies, qui produisent de fortes quantités de ROS, de TNF- α , d'IL-1 et de TGF- β) mais de plus courte durée (*Wilmink2003 ; Wilmink1999b*)
- une phase proliférative plus modérée (*BaconMiller2000 ; Wilmink2001 ; Wilmink1999a*) ;
- une phase de remodelage et de contraction lésionnelle plus importantes, avec une apparition et une organisation plus rapides des myofibroblastes et des fibres de collagène au sein de la MEC (*VanDenBoon2002 ; Wilmink2001 ; Wilmink1999a ; Wilmink1999b*).

Le processus de cicatrisation cutanée chez les poneys apparaît donc, globalement, plus efficace que chez les chevaux (*Wilmink2003 ; VanDenBoon2002 ; Wilmink2001 ; BaconMiller2000 ; Wilmink1999a ; Wilmink1999b*).

Aucune étude approfondie n'a à ce jour été réalisée pour établir l'existence, ou non, d'une diversité génétique à l'origine de différences anatomiques et/ou fonctionnelles, qui pourraient éventuellement expliquer les différences de cicatrisation cutanée observées entre les chevaux et les poneys.

III / 1 / B / i / b – Développement privilégié dans des sites anatomiques particuliers

De nombreuses études comparatives (*Miragliotta2008a ; Miragliotta2008c ; Dubuc2006 ; Lepault2005 ; Wilmink2005 ; DeMartin2004 ; Wilmink2003 ; Schwartz2002 ; Theoret2002a ; Theoret2002b ; Theoret2001 ; Wilmink2001 ; Wilmink1999a ; Wilmink1999b*), supportant les observations cliniques faites (*Knottenbelt1997 ; Jacobs1984*), ont permis de constater qu'il existe des différences significatives de guérison tissulaire selon que la plaie affecte le corps ou les membres du cheval : une cicatrisation cutanée pathologique, tel le développement d'un TGE, s'observe beaucoup plus fréquemment au niveau appendiculaire que corporel (*Theoret2008 ; Wilmink2008 ; Wilmink2005*).

Le processus de cicatrisation cutanée des plaies corporelles présente les caractéristiques globales suivantes, lorsqu'on le compare au processus des plaies appendiculaires :

- une phase inflammatoire plus intense mais de plus courte durée, durant laquelle s'observe une migration plus rapide des LEU, en particulier des MON/MAC au sein des plaies (*Miragliotta2008a ; Miragliotta2008c ; Lepault2005 ; Wilmink2003 ; Schwartz2002 ; Theoret2002a ; Theoret2001 ; Wilmink1999b*) ;
- une phase proliférative plus modérée qui s'accompagne (1) d'un pic précoce mais d'une moindre expression globale du TGF- β 1, (2) d'une moindre angiogenèse, et (3) d'une ré-épithélialisation plus rapide (*Miragliotta2008a ; Miragliotta2008c ; Lepault2005 ; Schwartz2002 ; Theoret2002a ; Theoret2001 ; Wilmink1999b*)
- une phase de remodelage et de contraction lésionnelle plus précoce et plus importante, avec une apparition rapide et une meilleure organisation des fibroblastes et myofibroblastes, ainsi que des fibres de collagène, au sein de la MEC (*VanDenBoon2002 ; Schwartz2002 ; Wilmink2001 ; Wilmink1999b*).

Le processus de cicatrisation cutanée apparaît donc, globalement, plus efficace au niveau corporel qu'au niveau appendiculaire (Miragliotta2008a ; Miragliotta2008c ; Dubuc2006 ; Lepault2005 ; Wilmink2005 ; DeMartin2004 ; Wilmink2003 ; Schwartz2002 ; Theoret2002a ; Theoret2002b ; Theoret2001 ; Wilmink2001 ; Wilmink1999a ; Wilmink1999b ; Knottenbelt1997 ; Jacobs1984) chez le cheval.

Quelques rares études anatomiques ont rapporté des différences significatives d'épaisseur mais aussi de structure au niveau du derme entre le corps (paroi thoracique) et les membres (partie distale) chez le cheval : l'épaisseur moyenne de la peau au niveau thoracique est de ± 2.55 mm alors qu'elle n'est que de ± 1.68 mm au niveau appendiculaire ; la couche « cuir de Cordoue », et plus précisément, sa couche accessoire, n'est présente qu'à l'aspect distal des membres (Wakuri1995 ; Mosimann1990 ; Talukdar1972). Certains auteurs citent les conditions environnementales différentes au niveau des membres (contamination bactérienne plus importante des plaies situées à proximité du sol, humidité plus importante, traumatismes cutanés plus fréquents) comme de possibles facteurs d'altérations de la cicatrisation appendiculaire chez le cheval (Knottenbelt2003 ; Bertone1989).

Aucune étude anatomique fonctionnelle n'a cependant été faite à ce jour pour élucider la cause d'une telle différence de cicatrisation cutanée entre ces régions anatomiques distinctes chez le cheval. Quelques rares études cellulaires ont été menées *in vitro* (BaconMiller2001 ; Wilmink2001 ; Cochrane1996), qui investigaient principalement le comportement des fibroblastes corporels et appendiculaires. Une plus grande prolifération des fibroblastes corporels (BaconMiller2001 ; Wilmink2001) et une meilleure contractilité des fibroblastes appendiculaires (Wilmink2001) ont été rapportées *in vitro* en conditions normoxiques de culture cellulaire, à l'opposé de ce qui est cliniquement et histologiquement observé, laissant soupçonner l'existence de facteurs causaux exogènes plutôt qu'endogènes à la cicatrisation cutanée pathologique chez les équidés.

III / 1 / B / ii – Pathogénie du tissu de granulation exubérant équin – qu'en savons-nous ?

La pathogénie du TGE chez le cheval, tout comme celles des plaies chroniques et des chéloïdes humaines, est encore imparfaitement comprise. Malgré son indéniable importance économique pour l'industrie du cheval de sport (*Perkins2005*), peu d'équipes de recherche se sont, à ce jour, sérieusement penchées sur l'étude du TGE.

Le TGE, comme tout tissu de granulation se développant dans une plaie cutanée guérissant par seconde intention, est principalement formé d'une MEC abondante, de fibroblastes aux profils prolifératif et synthétique, et de nouveaux microvaisseaux sanguins. L'étiologie exacte du TGE reste inconnue à ce jour. Plusieurs observations permettent cependant d'émettre des hypothèses quant à la / aux phase(s) de la guérison dont l'évolution pourrait être altérée et à l'origine du / des dérèglement(s) observé(s).

III / 1 / B / ii / a – Une perturbation de la phase inflammatoire ?

La phase inflammatoire de la cicatrisation cutanée est retardée au niveau appendiculaire chez le cheval, de moindre intensité, et tend à se prolonger dans le temps (*Wilmink2003 ; Schwartz2002 ; Theoret2001 ; Wilmink1999b*).

Il n'est pas rare d'observer un nombre élevé de PMN et/ou de MON/MAC au sein des plaies appendiculaires 5 à 6 semaines après la blessure initiale, alors que toute trace de ces cellules a disparu depuis plusieurs semaines dans les plaies corporelles (*Wilmink2003 ; Theoret2001 ; Wilmink1999b*). L'arrivée plus tardive des LEU dans les plaies appendiculaires, somme toute similaires à ceux qui envahissent les plaies corporelles, pourrait trouver explication dans la moindre expression des facteurs chimioattractifs libérés localement (*Burgess2005 ; Wilmink2003*), ainsi que dans la moindre expression du facteur d'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales (PECAM)-1 (*Miragliotta2008a*). Ce facteur module l'adhésion des cellules inflammatoires aux endothéliums vasculaires et stimule leur diapédèse. Il favorise aussi la phagocytose des microorganismes, des débris cellulaires et tissulaires par les MON/MAC. Son expression diminuée pourrait donc limiter, ou retarder, l'afflux de LEU dans la plaie

appendiculaire sitôt sa survenue, altérer leurs capacités de phagocytose et ainsi entraver le bon déroulement de la phase inflammatoire. L'entretien de la phase inflammatoire à bas bruit pourrait être consécutive à la formation de biofilms bactériens à la surface des plaies appendiculaires (*Westgate2011 ; Freeman2009 ; Clutterburck2007*), dont l'existence a récemment été confirmée dans les plaies du cheval (*Westgate2011*), ainsi que dans les plaies chroniques rencontrées chez l'Homme (*Burmolle2010 ; Thomsen2010 ; Schierle2009 ; Bjarnsholt2008 ; Kirketerp-Moller2007*).

III / 1 / B / ii / b – Une perturbation de la phase proliférative ?

La phase proliférative de la cicatrisation cutanée apparaît perturbée au niveau appendiculaire chez le cheval : la fibroplasie et l'angiogenèse sont excessives, à l'origine du TGE *stricto sensu*, tandis que la ré-épithélialisation semble invariablement stoppée (*Wilmink2005 ; Schwartz2002 ; Theoret2002a ; Wilmink1999b*).

L'expression anormale du VEGF, principal facteur de croissance impliqué dans l'angiogenèse et à l'origine probable du TGE observé chez les enfants trachéotomisés à long terme (*Park1999*), pourrait jouer un rôle pivot dans le développement du TGE chez le cheval. L'expression du VEGF, tout comme celle du FGF-2 et de l'IGF-1 (*Burgess2005*), qui agissent en synergie avec le VEGF, sont augmentées dans le TGE équin. Leur action concertée pourrait favoriser l'angiogenèse excessive.

La diminution d'expression de p53 (*Lepault2005*), dont l'expression altère généralement celle de VEGF (*Menendez2007*), et celles d'autres molécules pro-apoptose, pourraient résulter du défaut de couverture épithéliale rencontrée dans le TGE équin. En effet, beaucoup des signaux régulant la mort cellulaire programmée des fibroblastes et des cellules endothéliales, présents en grande quantité dans le TGE, sont sécrétées par les kératinocytes (*Greenhalgh1998*). En leur absence, mais aussi grâce à la surexpression de FGF-2 (*Burgess2005*) qui inhibe l'apoptose des cellules endothéliales (*Rosmorduc1999*), l'apoptose des fibroblastes et des cellules endothéliales pourrait être annihilée, la production de VEGF favorisée, stimulant ainsi une fibroplasie et une angiogenèse excessives. L'angiogenèse accrue du tissu de granulation des plaies appendiculaires

chez le cheval est cependant anormale : on y observe une plus grande obstruction des microvaisseaux (Lepault2005), similaire à celle rapportée dans la chéloïde de l'Homme (Kischer1992), par hypertrophie des cellules endothéliales principalement (Dubuc2006). De cette occlusion du réseau microvasculaire pourrait résulter un défaut d'approvisionnement tissulaire en nutriments, dont l'O₂.

Le TGF-β1 est le principal facteur pro fibrose de la guérison tissulaire, comme il a été décrit. Plusieurs études menées chez le cheval (Burgess2005 ; DeMartin2004 ; Schwartz2002 ; VanDenBoom2002 ; Theoret2001) rapportent une plus grande expression de TGF-β1, ainsi que de ses récepteurs, dans les plaies appendiculaires. Cette surexpression pourrait être à l'origine, ou tout du moins participer à la genèse du TGE. En effet, lorsqu'il est surexprimé ou fourni en excès, le TGF-β1 encourage la fibroplasie, tant *in vitro* qu'*in vivo* (O'Kane1997), en stimulant la multiplication des fibroblastes, en favorisant leur production des procollagènes de type I / III et des PG, et en encourageant leur différenciation en myofibroblastes (Modaressi2010 ; Hakkinen1996).

III / 1 B / ii / c – Une perturbation de la phase de remodelage ?

La phase de remodelage de la cicatrisation cutanée est perturbée au niveau appendiculaire chez le cheval : la fibrinolyse y est diminuée, le dépôt mais aussi la maturation du collagène y sont accentués, et la contraction tissulaire y est plus lente et plus limitée que dans les plaies corporelles (Burgess2005 ; Wilmink2005 ; Schwartz2002 ; Theoret2002a ; Wilmink1999a ; Wilmink1999b).

Les myofibroblastes sont les principaux acteurs de la phase de remodelage : ils participent à la maturation du collagène et régulent la contraction au niveau des plaies. Comme toute cellule impliquée dans le processus de guérison, ils disparaissent par apoptose suite à la complétion de leur(s) tâche(s). Il est possible que la diminution de certains facteurs pro apoptotiques dans les plaies appendiculaires chez le cheval (Lepault2005), accompagnée d'une plus forte expression de TGF-β1 (Burgess2005 ; DeMartin2004 ; Schwartz2002 ; VanDenBoom2002 ; Theoret2001), favorisent la persistance des myofibroblastes, tout comme celle des fibroblastes, au sein du tissu de granulation appendiculaire, et du

TGE en particulier. Ces cellules pourraient alors poursuivre leurs activités de remodelage, mais aussi de prolifération et de synthèse, à l'origine d'un déséquilibre du métabolisme du collagène et d'une accumulation anormale de collagène de type I (*Schwartz2002*) dans les plaies appendiculaires chez le cheval, tel qu'observé dans la chéloïde de l'Homme.

L'organisation des myofibroblastes, beaucoup plus anarchique et fortement retardée dans les plaies appendiculaires (*Schwartz2002 ; Wilmink1999b*), pourrait expliquer la plus faible contraction des plaies appendiculaires observée (*Wilmink2005 ; Wilmink1999a*), et être à l'origine de leurs plus grands besoins en fibroplasie et ré-épithélialisation (*Wilmink2005*).

En résumé :

La cicatrisation cutanée pathologique, telle qu'observée au niveau appendiculaire, chez le cheval, se caractérise par (1) une inflammation modérée, d'installation retardée mais qui se prolonge dans le temps, (2) une fibroplasie et une angiogenèse excessives, (3) une ré-épithélialisation retardée voire stoppée, et (4) une contraction modérée et différée. La cicatrisation cutanée pathologique chez le cheval apparaît comme un désordre mixte de cicatrisation, les plaies appendiculaires qui développent un TGE présentant à la fois des caractéristiques de la chéloïde et des plaies chroniques humaines. Peu importe le type de cicatrisation cutanée pathologique, toutes les cellules de la guérison, qu'elles soient inflammatoires ou mésenchymateuses, semblent perturbées.

Toutes ces formes de cicatrisation cutanée pathologique présentent des prédispositions génétiques. Le développement préférentiel du TGE dans certains sites anatomiques particuliers chez le cheval laissent cependant supposer qu'il existerait, au delà des éventuelles spécificités cellulaires locales (*Wall2008 ; Sorrel2004 ; Harper1979*), des spécificités physiologiques ou environnementales locales. Il apparaît en effet fort peu probable que les PMN ou MON/MAC, des cellules circulantes, aient des propriétés intrinsèques différentes selon qu'ils se localisent au niveau corporel ou au niveau appendiculaire.

III / 2 – L'HYPOXIE TISSULAIRE CHRONIQUE LOCALE : UN FACTEUR POTENTIEL D'ALTÉRATION DE LA CICATRISATION CUTANÉE CHEZ LE CHEVAL ?

III / 2 / A – L'hypoxie, qu'est-ce que c'est ?

On définit l'hypoxie au sens large comme un défaut d'oxygénation. Au sens strict, l'hypoxie se définit plus précisément comme une réduction de la pression partielle tissulaire en O₂ (P_{T_O2}) en deçà de la P_{T_O2} minimalement requise par le tissu, et les cellules qui le constituent, pour maintenir leur homéostasie et assurer normalement leurs fonctions au sein de l'organisme. Selon la magnitude de l'hypoxie, les tissus et cellules s'adaptent (voie du HIF, ROS, NO) ou succombent (*Sen2009b*).

III / 2 / A / i – Les grands types d'hypoxie tissulaire

On peut distinguer trois catégories principales d'hypoxie tissulaire, le plus souvent locale, au niveau de la peau, dont la concentration moyenne en O₂ avoisine les 3 à 5% (35 mmHg) (*Sen2010 ; Sen2009b ; Sen2006 ; Roy2003*):

- l'hypoxie tissulaire aiguë, généralement sévère (< 1% d'O₂) mais fugace : elle stimule la mise en route des processus d'adaptation, tel celui de la cicatrisation cutanée, comme il a été décrit ;
- l'hypoxie tissulaire chronique sévère (< 1% d'O₂) proche de l'anoxie complète : elle s'accompagne d'une mortalité cellulaire élevée, d'une perte tissulaire notable et d'un arrêt complet de la guérison tissulaire ;
- l'hypoxie tissulaire chronique moyenne (HTCM) (de 1 à 3% d'O₂) : les cellules de l'organisme s'y adaptent en modifiant leur comportement et leur métabolisme. Cette adaptation peut se révéler sans conséquence. Elle est cependant, souvent, à l'origine de mal fonctionnements et/ou dysfonctionnements cellulaire et tissulaire.

Une hypoxie tissulaire s'observe au sein des plaies cutanées pendant la cicatrisation. Elle fluctue au cours du processus de guérison : il n'est pas rare d'observer au sein d'une plaie cutanée des variations temporelles, mais aussi géographiques de

l'oxygénation tissulaire. Certaines régions présentent une quasi anoxie (les tissus y sont alors très vulnérables à la nécrose et aux infections) alors que d'autres présentent une hypoxie moyenne à faible, voire, une normoxie (*Sen2009b*). Ces différences temporelles et géographiques, parfois majeures, peuvent influencer de façon significative sur l'évolution des régions avoisinantes.

III / 2 / A / ii – Les principaux facteurs de l'hypoxie tissulaire

Trois groupes principaux de facteurs contribuent à l'hypoxie tissulaire au niveau cutané chez l'Homme :

- les anomalies et altérations vasculaires, qui limitent la perfusion tissulaire et garrottent l'apport en O₂ (ex : maladies artérielles périphériques, insuffisances veineuses, fibrose tissulaire, occlusion microvasculaire) (*Kumari2007 ; Allen1997*) ;
- les demandes accrues en O₂ par des cellules hyperactives sur le plan métabolique (ex : cicatrisation cutanée) (*Sen2009b*) ;
- la production massive de dérivés actifs de l'O₂ (ROS, RNOS) (ex. infections à microorganismes multi résistants) (*Sen2009b*).

L'hypoxémie, soit une réduction de la pression partielle en O₂ dans le sang (PaO₂), consécutive à une fibrose pulmonaire, une anémie majeure, une douleur majeure, une hypothermie, ou l'altitude, peut aussi contribuer à la création d'un environnement lésionnel hypoxique.

III / 2 / B – L'hypoxie tissulaire chronique moyenne : quels effets sur la guérison tissulaire ?

L'hypoxie tissulaire aiguë, fugace, stimule la mise en route des processus d'adaptation, tel celui de la cicatrisation cutanée, comme il a été décrit. L'hypoxie tissulaire chronique moyenne (HTCM), quant à elle, tend à perturber la bonne réalisation des différentes phases de la guérison tissulaire.

III / 2 / B / i – Rôle(s) de l'hypoxie dans les perturbations de la phase inflammatoire

III / 2 / B / i / a – Effets de l'HTCM sur le recrutement et la persistance des cellules inflammatoires

L'hypoxie tissulaire accroît l'expression, par les cellules endothéliales, des molécules d'adhésion aux endothéliums vasculaires, tels l'ICAM-1 et la molécule d'adhésion à l'endothélium vasculaire (VCAM)-1, et de certaines chimiokines, tels le VEGF ou l'END, qui favorisent la diapédèse des LEU, en particulier des MON, depuis le torrent circulatoire vers le compartiment extravasculaire et les tissus (*Knowles2007 ; Ribatti2007 ; Sica2007 ; Lewis2007 ; Imhof2004 ; White2004*). A la différence des MON/MAC, différenciés, qui ont besoin d'un co stimulus, tels le LPS, l'INF γ ou une ré-oxygénation temporaire (*Bosco2008 ; Lewis1999*) pour répondre de façon appropriée à l'hypoxie, les MON s'y adaptent immédiatement et modifient rapidement la transcription de leur génome (*Wenger2005 ; Semenza2001*). MON et MON/MAC activés, dans des conditions environnementales hypoxiques, accroissent l'expression de certains facteurs pro-angiogénèse, tel le VEGF, mais aussi celle des cytokines / récepteurs pro-inflammatoires et des médiateurs inflammatoires que sont l'IL-1, l'IL-6 et ses récepteurs, le TNF- α et l'arginase-1 (*Bosco2008 ; Bosco2006 ; Albina2005 ; Murdoch2005 ; Demasi2003*). Ils modifient aussi de façon drastique leur patron d'expression des chimiokines, qui coordonnent la diapédèse et l'activation des autres sous-populations de LEU. Les chimiokines favorisant la diapédèse des PMN et des LYMP (CXCL-2, -3, -5, -6, -8 et CCL-20) sont surexprimées tandis que celles favorisant la diapédèse des MON et des MON/MAC (CCL-2, -8, -15, -18, -19, -23 et CXCL-11) sont sous exprimées (*Bosco2006 ; Murdoch2005 ; White2004 ; Metinko1992*). Ainsi, les MON, et dans une moindre mesure les MON/MAC, qui infiltrent les tissus hypoxiques, tendent à recruter préférentiellement des PMN, des LYM et à stimuler l'angiogénèse (*Battaglia2008 ; Bosco2006 ; Schutyser2003*). La sous-expression par les MON et les MON/MAC des chimiokines (CCR-1, CCR-2 et CCR-5) favorisant leurs propres mouvements / migrations (*Bosco2006*), et la surexpression concomitante de celles les limitant (CXCL-2 et -3) (*Knowles2007 ; Smith2005 ; Harris2002*), pourraient expliquer la concentration / la persistance de ces sous-catégories de LEU dans les plaies souffrant d'hypoxie (*Bosco2008*).

La modulation différente des enzymes participant au remodelage tissulaire lors d'hypoxie pourrait aussi influencer sur les mouvements / migrations des MON et MON/MAC, et donc la bonne tenue de la phase inflammatoire. Les MMP dégradent la MECp / MEC, permettant son remodelage mais aussi la bonne migration des LEU au sein de la plaie (Nagase2006). L'hypoxie supprime la sécrétion de MMP-9 induite par le TNF- α et stimule celle des inhibiteurs des MMP (TIMP) chez les MON (Bosco2006 ; Nagase2006), favorisant ainsi leur accumulation aux sites hypoxiques. A l'opposé, l'hypoxie stimule la production de MMP-1, MMP-7 et MMP-12 par les MON/MAC (Knwoles2007 ; Murdoch2005 ; White2004 ; Burke2003), favorisant leurs mouvements et actions.

III / 2 / B / i / b – Effets de l'HTCM sur l'efficacité phagocytaire des cellules inflammatoires

L'efficacité des LEU dans la lutte contre les microorganismes pathogènes dépend généralement de leur production de ROS, des outils indispensables à la destruction bactérienne. Les ROS sont synthétisés en très grande quantité lors de l'invasion des tissus par des bactéries, suite à l'activation de la NAD(P)H – oxydase (Sen2009b ; Lambeth2007 ; Allen1997). Certaines cytokines inflammatoires, tel le TNF- α produit par les MON/MAC (Parameswaran2010), accroissent la sensibilité des LEU aux produits bactériens (LPS), suractivent la NAD(P)H – oxydase, à l'origine d'une production démultipliée de ROS; l'efficacité des LEU dans la destruction bactérienne s'en trouve alors accentuée.

Le substrat principal de la NAD(P)H – oxydase est l'O₂. Toute infection bactérienne, si elle n'est pas rapidement bien gérée et contrôlée, provoque une surconsommation d'O₂ par les LEU, appelée « *respiratory burst* ». Cette surconsommation d'O₂ peut provoquer / entretenir / aggraver une hypoxie tissulaire locale (Guo2010 ; Sen2009b ; Rodriguez2008 ; Hopf2007 ; Tandara2004). Toute hypoxie tissulaire préexistante peut inversement entraver le bon fonctionnement leucocytaire et conduire à une non élimination des microorganismes pathogènes, par manque du substrat nécessaire à la genèse de ROS. Des P_TO₂ minimales (40 mm Hg) sont en effet requises au bon fonctionnement de cette enzyme chez les PMN, dont 98% de l'O₂ consommé sont dévolus à cette unique

fin (Allen1997). La $P_{T_{O_2}}$ moyenne permettant une production maximale de ROS par les PMN et MON/MAC au niveau cutané est estimé à 300 mm Hg ; elle s'avère impossible à atteindre sans l'utilisation d'apport exogène d'oxygène (HBOT, oxygénothérapie tissulaire locale (TO)) (Sen2010 ; Belda2005 ; Hopf 2004 ; Grief2000 ; Allen1997).

La résistance aux infections, tant par des microorganismes pathogènes aérobiques qu'anaérobiques (Rodriguez2008 ; Gottrup2004), des plaies en voie de cicatrisation apparaît donc étroitement corrélée à leur oxygénation, et plus précisément à leur $P_{T_{O_2}}$ (Hopf2007 ; Allen1997). Des valeurs prédictives d'infection de plaie sont d'ailleurs désormais avancées en fonction de la $P_{T_{O_2}}$ mesurée au sein d'une plaie. Le taux d'infection est généralement inversement proportionnel à la $P_{T_{O_2}}$ mesurée (Rodriguez2008 ; Belda2005 ; Hopf 2004 ; Grief2000 ; Hopf1997).

Une HTCMT semble ainsi en mesure et d'altérer les capacités de défense des tissus et de favoriser la migration / la persistance sélective de certaines sous-populations de LEU, dont les capacités d'adaptation semblent varier selon qu'il y ait ou non des co stimuli d'activation.

III / 2 / B / ii – Rôle(s) de l'hypoxie dans les perturbations de la phase proliférative

III / 2 / B / ii / a – Effets de l'HTCMT sur l'angiogenèse

L'angiogenèse est, à la base, un processus stimulé par l'hypoxie, sous la dépendance d'un certain nombre de facteurs de croissance et de cytokines. L'hypoxie favorise et entretient l'expression du VEGF par de multiples cellules impliquées dans le processus de cicatrisation cutanée, tels les fibroblastes, les MON/MAC, les cellules endothéliales et les kératinocytes (Schreml2010 ; Hopf2005 ; Hong2004 ; Rossiter2004 ; Sen2002). L'hypoxie favorise et entretient aussi l'expression de l'eNOS par les cellules endothéliales (Fong2008).

Le VEGF et l'eNOS stimulent la migration, la prolifération et l'organisation des cellules endothéliales en néo vaisseaux au sein de la MEC (Schreml2010 ; Fong2008 ; Sen2002 ; Murohara1999 ; Namiki1995 ; Philips1995), tout comme le FGF-2, qui agit en synergie avec le

VEGF. Le FGF-2, dont la production est aussi stimulée par l'hypoxie, plus tardivement cependant que celle du VEGF, inhibe aussi l'apoptose normale des cellules endothéliales, favorisant le maintien de la néo vascularisation (Rosmorduc2010).

Le VEGF stimule l'activation et la prolifération des péricytes, autre source potentielle de VEGF. La migration des péricytes est quant à elle stimulée par les cellules endothéliales bourgeonnantes. Ces dernières sécrètent, et ainsi créent un gradient de concentration en PDGF chimio attractif pour les péricytes, qui favorise leur migration vers les microvaisseaux en formation. Les péricytes y interagissent alors avec les cellules endothéliales bourgeonnantes et stabilisent la néo vascularisation via la sécrétion d'angiopoïétine 1. L'hypoxie provoque et entretient la surexpression de VEGF, mais aussi celles du PDGF par les cellules endothéliales et de l'angiopoïétine 1 par les péricytes, favorisant le développement et le maintien de la néo vascularisation (Rosmorduc2010 ; Lee2007).

Le premier effet moléculaire de l'hypoxie tissulaire chronique est l'altération de la phosphorylation oxydative mitochondriale, à l'origine d'une diminution d'ATP. Cette diminution d'ATP provoque, entre autre chose, une réorientation du métabolisme cellulaire. Les voies anaérobies de production d'ATP, la glycolyse en particulier, sont stimulées (Weljie2010). Ces voies, moins efficaces en terme de productivité énergétique car plus consommatrices de substrats, génèrent plus de déchets métaboliques, tel l'acide lactique, produit en grande quantité lors d'hypoxie tissulaire. L'acide lactique est un excellent stimulant de la synthèse du collagène et de l'angiogenèse via une augmentation de la sécrétion de VEGF (Hopf2007 ; Jensen1986 ; Goodson1984).

III / 2 / B / ii / b – Effets de l'HTCM sur la fibroplasie

Les fibroblastes sont les principaux artisans de l'élaboration et du remodelage de la MEC. Le comportement des fibroblastes est étroitement régi par la pression partielle en O₂ de leur environnement immédiat. Une pression minimale en O₂ de 15 mm de Hg (≈ 1%) est requise pour que les fibroblastes aient des activités tant prolifératives (Tandara2004 ; Siddiqui1996 ; Hunt1972) que de synthèse de collagène (Tandara2004 ; Siddiqui1996) minimales. Une pression minimale en O₂ de 30 à 40 mm de Hg (3 à 5%) (similaire à

celle nécessaire au bon fonctionnement des PMN) est requise au bon fonctionnement des enzymes, lysine et proline hydroxylases, lysyl hydroxylase et oxydase surtout, impliquées dans la maturation du collagène par les fibroblastes (Schreml2010 ; Myllyla1977). L'HTCM (entre 1 et 3%), via la stabilisation de la voie du HIF, favorise la production de l'EGF, du PDGF, du CTGF, du TGF- β et du VEGF, entre autres facteurs, qui stimulent la prolifération des fibroblastes (Saed2002 ; Siddiqui1996), leur production de TGF- β (Saed2002a ; Saed2002b ; Siddiqui1996 ; Falanga1991) et inhibent leur apoptose (Poulios2007 ; Saed2002c). La synthèse de collagène de type I, mais aussi de fibronectine, est aussi accentuée, directement ou indirectement, par le TGF- β (Falanga2002), le VEGF (Rosmorduc2010), le PAI-1 (Tuan2008) l'acide lactique (Hopf2007 ; Jensen1986 ; Goodson1984) et le HIF, via les HRE présents sur le promoteur du gène codant pour le procollagène de type I (Rosmorduc2010 ; Chen2004). L'HTCM favorise, enfin, la libération de cytokines et médiateurs pro-inflammatoires, tels l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α par les MON et MAC (Bosco2008 ; Bosco2006 ; Albina2005 ; Murdoch2005) qui agissent sur le bon fonctionnement fibroblastique. Les kératinocytes situés en périphérie de la plaie secrètent certaines de ces cytokines (IL-1 α , IL-1 β), mais aussi certains facteurs tels le TGF- β (Gallant-Behm2011). IL-1 β et TGF- β , d'origines leucocytaire et/ou kératinocytaire, peuvent aussi stimuler la prolifération des fibroblastes et la synthèse de la MEC.

Une HTCM semble ainsi en mesure, directement par la voie du HIF, et indirectement via la production de lactates par exemple, et de stimuler le développement d'une néovascularisation, et de favoriser la synthèse d'une MEC, très abondantes voire excessives.

III / 2 / B / iii – Rôle(s) de l'hypoxie dans les perturbations de la contraction

La contraction lésionnelle, tout comme le remodelage et la maturation du tissu de granulation, sont principalement du ressort des myofibroblastes dermiques au niveau cutané, qui possèdent un fin réseau de microfilaments cytoplasmiques d' α -SMA. L'un des principaux facteurs de différenciation des fibroblastes en myofibroblastes dermiques est le TGF- β , dont la production, la sécrétion et l'activation sont accentuées par l'HTCM (Modaressi2010 ; Saed2002a ; Saed2002b ; Siddiqui1996 ; Falanga1991). L'hypoxie

induit cependant, chez les myofibroblastes dermiques, une sous expression du récepteur II du TGF- β 1 (TGF- β RII) *in vitro* (Modaressi2010), principal récepteur cellulaire de ce facteur de croissance.

Brièvement, la liaison du TGF- β 1 au récepteur TGF- β RII induit une hétérodimérisation avec le récepteur TGF- β RI, induisant l'activation par phosphorylation de ce dernier. Suivent la phosphorylation de Smad2 et 3, l'assemblage avec Smad4, la migration du complexe dans le noyau et l'induction de la transcription des gènes sous la gouverne de TGF- β 1, dont Smad7, une Smad inhibitrice de Smad2. Le TGF- β 1 active également des voies de signalisation Smad-indépendantes, telles les petites protéines GTPases (Rho, Rac et cdc42), la voie des MAPKinases ou bien la voie PI3K/Akt qui active la voie Wnt.

La sous expression de TGF- β RII lors d'hypoxie non seulement inhibe la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes dermiques (Modaressi2010) mais aussi provoque la différenciation des myofibroblastes en fibroblastes dermiques (Modaressi2010), à l'origine d'une diminution exponentielle des capacités contractiles. L'inverse est observé avec les fibroblastes / myofibroblastes vasculaires (Krick2005 ; Zhang2005 ; Das2002), pulmonaires (Jiang2006 ; Leufgen2005 ; Short2004), hépatiques et rénaux (Shi2007 ; Manotham2004), confirmant la réactivité différente, et donc l'hétérogénéité, des fibroblastes provenant de régions anatomiques différentes (Wall2008 ; Sorrel2004 ; Dugina1998 ; Desmouliere1992 ; Harper1979).

III / 2 / B / iv – Rôle(s) de l'hypoxie dans les perturbations de la ré-épithélialisation

L'hypoxie apparaît favorable aux kératinocytes. En effet, leur prolifération est meilleure en hypoxie, surtout lorsqu'elle est sévère (<1%), plutôt qu'en normoxie (Sivamani2007 ; Kino-Oka2005). L'hypoxie favorise, de plus, la migration des kératinocytes (Kino-Oka2005 ; Xia2001 ; O'Toole1997) via l'augmentation des pseudopodes membranaires (O'Toole1997), de certaines MMP (Xia2001) et de l'intégrine α v β 6 (Ridgway2005). Enfin, l'hypoxie, le facteur HIF-1 α surtout, stabilisé lors d'hypoxie, apparaît nécessaire à leur synthèse de peptides antibactériens (Peysonnaux2008).

Il est à noter cependant que la stabilisation de la voie du HIF, qu'elle soit ou non hypoxique, conduit, dans les plaies chroniques de l'Homme, à l'expression de certains gènes non codants, tel celui du micro ARN-210. Selon toute vraisemblance, le microARN-210 participe à l'inhibition de la ré-épithélialisation dans ce type particulier de plaies profondément hypoxiques, mais aussi et surtout ischémiques (*Biswas2010*).

En résumé :

L'hypoxie, l'HTCM en particulier, perturbe le bon déroulement de certaines phases de la guérison tissulaire :

- (1) elle favorise le recrutement des cellules inflammatoires mais perturbent leur bon fonctionnement ;
- (2) elle stimule l'angiogenèse ;
- (3) elle perturbe le bon fonctionnement des fibroblastes, tend à favoriser leur multiplication et modifie leurs synthèses.

Certaines des perturbations ci-dessus citées se rencontrent au niveau des plaies appendiculaires du cheval, dans lesquelles une plus grande occlusion des microvaisseaux peuplant le tissu de granulation a été récemment rapportée (*Lepault2005*). Un manque d'O₂ pourrait donc se révéler comme l'une des causes de la cicatrisation cutanée pathologique chez le cheval.

III / 3 – AUTRES FACTEURS POSSIBLES D'ALTÉRATION DE LA CICATRISATION CUTANÉE CHEZ LE CHEVAL

D'autres facteurs que l'O₂ peuvent altérer la cicatrisation cutanée *stricto sensus*. On les regroupe généralement en deux catégories : (1) les facteurs locaux, qui influencent directement les caractéristiques de la plaie cutanée elle-même ; (2) les facteurs systémiques, qui résultent de l'état de santé de l'individu, d'une maladie systémique. La plupart ont cependant des effets locaux qui perturbent le bon enchaînement des différentes phases de la guérison cutanée.

Ne seront détaillés ici que les facteurs communs aux mammifères. Les facteurs spécifiques liés à certaines activités ou maladies humaines, tels le tabagisme, l'alcoolisme, la surconsommation médicamenteuse, l'obésité ou le diabète, qui perturbent la cicatrisation cutanée normale, ne seront pas abordés (Guo2010).

III / 3 / A – Facteurs systémiques

III / 3 / A / i – Le statut nutritionnel

La malnutrition, tout comme les carences nutritionnelles, peuvent avoir un impact majeur sur les capacités cicatricielles d'un individu.

Les hydrates de carbone sont indispensables, tout comme l'O₂, à la production d'énergie. Leur présence en abondance évite que l'organisme n'utilise les protéines ou les acides aminés comme substrat pour la production d'énergie, ce qui pourrait perturber d'autres mécanismes (Arnold2006). Les protéines participent activement au processus de guérison tissulaire : elles sont des outils indispensables au bon fonctionnement des PMN et MAC (enzymes), entrent dans la composition de la MEC (collagène), agissent à titre de facteurs, cofacteurs et messagers (cytokines, facteurs de croissance). Elles se révèlent donc indispensables au bon déroulement de la cicatrisation cutanée. Certains acides aminés, tel l'arginine, sont des précurseurs essentiels à la synthèse des composants matriciels (proline) mais aussi à la synthèse de NO (substrat de formation), un important messager (Campos2008 ; Tong2004 ; Shepherd 2003). La glutamine est aussi un acide aminé important : il représente une source d'énergie

facilement accessible pour les cellules inflammatoires et mésenchymateuses en hyperactivité métabolique, facilitant leurs fonctions et actions (Campos2008 ; Arnold2006).

Certaines vitamines (A, C et E) ont des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires non négligeables. Leur carence s'accompagne de perturbations notables de la guérison tissulaire, telle une phase inflammatoire altérée, une phase proliférative atténuée, une synthèse matricielle (collagène) retardée (Burgess2008 ; Campos2008 ; Arnold2006). Enfin, des micronutriments comme le magnésium, le cuivre, le zinc ou le fer sont essentiels à titre de cofacteurs des principales enzymes de la guérison (Shepherd2003 ; Campos2008 ; Arnold2006).

III / 3 / A / ii – L'âge

L'âge ne perturbe réellement la cicatrisation cutanée que lorsque l'individu est malade (Gosain2004 ; Keylock2008). Les mammifères âgés en bonne santé ne présentent généralement qu'un ralentissement du processus de cicatrisation, qui s'explique principalement par :

- une hémostase modifiée : augmentation de l'agrégation plaquettaire,
- une réponse inflammatoire diluée : infiltration retardée des LYMT et des MAC, diminution des propriétés phagocytaires des MAC, altération de la production de chimiokines et facteurs de croissance,
- une phase proliférative retardée : angiogenèse et dépôt de collagène retardés, ré-épithélialisation retardée,
- une phase de remodelage réduite : réduction du remodelage du collagène, diminution de la résistance globale de la cicatrice (Guo2010 ; Gosain2004 ; Swith2001).

Ces altérations pourraient être consécutives à un ralentissement de la voie du HIF, qui est impliquée dans tous les événements affectés chez les mammifères qui vieillissent.

La simple augmentation de l'activité physique quotidienne semble favoriser une meilleure guérison tissulaire (Keylock2008 ; Emery2005).

III / 3 / A / iii – Le genre

Les hormones sexuelles influent sur la guérison tissulaire chez les individus vieillissants seulement (Guo2010). Ainsi, les femmes âgées semblent avoir de meilleures capacités cicatricielles que les hommes âgés (Gilliver2007b). Les estrogènes régulent positivement un certain nombre de gènes associés à la régénération tissulaire, à la production matricielle, à l'inhibition des protéases, à la fonction épidermique ainsi que les gènes directement associés aux processus inflammatoires (Hardman2008). La supplémentation en estrogènes améliore la cicatrisation cutanée, tant chez la femelle que chez le mâle, tandis que l'administration d'androgènes l'affecte, via la surexpression de cytokines pro inflammatoires (TNF- α) et/ou la perturbation de la maturation du collagène (Gilliver2007a).

III / 3 / A / iv – Le stress

Le stress perturbe le système immunitaire, principalement via la dérégulation des axes adrénargiques hypothalamo-pituitaire et médullaire, et du système nerveux sympathique (Boyapati2007 ; Godbout2006). Ces axes régulent la libération des hormones pituitaires et adrénales que sont les hormones adrénocorticotropes, le cortisol, la prolactine et les cathécolamines (épinéphrine et norépinéphrine). Ces dernières sont à l'origine d'une vasoconstriction locale, parfois systémique, pouvant limiter de façon drastique les apports nutritionnels tissulaires, donc en O₂. Le stress stimule la production de glucocorticoïdes, qui réduisent l'expression et/ou la concentration de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et chimiokines (IL-1 α et β , IL-6, IL-8, TNF- α), ainsi que la stimulation antigénique des cellules immunitaires, composés et mécanismes importants au bon déroulement de la phase inflammatoire de la cicatrisation cutanée (Boyapati2007 ; Godbout2006 ; Sternberg2006).

III / 3 / B – Facteurs locaux

III / 3 / B / i – Les infections

Dès qu'une brèche cutanée est créée, les micro-organismes normalement séquestrés à la surface de la peau, s'y engouffrent et accèdent aux tissus sous-jacents. La phase

inflammatoire, longtemps considérée comme la phase initiale du processus de guérison tissulaire, est une étape importante de la cicatrisation cutanée. Les cellules qui la caractérisent, PMN, MON et MAC principalement, ont pour tâche principale de nettoyer la plaie de tous les microorganismes pathogènes qui l'ont éventuellement envahie ainsi que de tous les débris cellulaires et tissulaires qui s'y trouvent. Si cette phase n'est pas rondement menée, l'inflammation se prolongera tant et aussi longtemps qu'il n'y aura pas clairance complète des micro-organismes présents. L'arsenal enzymatique des PMN et MAC est étroitement dépendant de l'O₂. Une hypoxie tissulaire aiguë caractérise le début du processus de cicatrisation cutanée. Si celle-ci perdure, la phase inflammatoire et donc la clairance bactérienne peuvent s'en retrouver altérées, tel qu'il a été décrit. De plus, certaines bactéries, telles *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecium* en particulier (Westgate2011 ; Freeman2009 ; Clutterbuck2007), dont l'existence a récemment été confirmée dans les plaies du cheval (Westgate2011) et dans les plaies chroniques humaines (Burmolle2010 ; Thomsen2010 ; Schierle2009 ; Bjarnsholt2008 ; Kirketerp-Moller2007 ;), tendent à former des biofilms bactériens, aux propriétés très particulières. Brièvement, après attachement aux tissus superficiels d'une plaie, certaines bactéries, *Pseudomonas aeruginosa* en particulier, sécrètent une matrice protectrice faite de biopolymères offrant stabilité et protection environnementales. Cette matrice contient généralement des polysaccharides, de l'alginate, des extraits d'acides nucléiques, certains lipides (rhamnolipides) et des protéines (Bjarnsholt2008). L'alginate procure une structure tridimensionnelle au biofilm (Nivens2001), piège et désactive les ROS (Simpson1989), protège contre la phagocytose et lie nombre d'antibiotiques cationiques tels les aminoglycosides (Bjarnsholt2008 ; Hentzer2001 ; Alison1992). Les rhamnolipides inactivent le processus de phagocytose des PMN. LPS, fragments du biofilm et cytokines pro-inflammatoires tels l'IL-1 et le TNF- α stimulent cependant leur influx constant. Les cellules inflammatoires, constamment appelées, stimulées mais partiellement voire totalement inactivées, se révèlent incapables de nettoyer les tissus des bactéries qui y sont attachées mais y libèrent de grandes quantités de MMPs et ROS (Burmolle2010), aux potentiels effets tissulaires

délétères. La phase inflammatoire s'avère ainsi inefficace mais perpétuellement stimulée, ce qui provoque sa pérennité.

III / 3 / B / ii – Les soins locaux

L'utilisation de produits et de bandages, quelque soit leur type, est fréquente dans la gestion des plaies cutanées chez les mammifères en général, et chez le cheval en particulier. Nous ne détaillerons ici que l'influence des bandages, la diversité des produits utilisés sur les plaies étant trop importante.

Les bandages sont utilisés afin de supporter le processus de cicatrisation en diminuant la contamination, l'œdème et les exsudats, en limitant aussi les mouvements, et en protégeant la plaie de tout trauma supplémentaire (*Knottenbelt2003*). Maintenir des bandages sur les plaies corporelles s'avérant souvent difficile et coûteux chez le cheval, il n'est pas rare que ces plaies soient laissées à l'air libre. Inversement, placer des bandages au niveau des membres étant relativement aisé, les plaies appendiculaires sont souvent recouvertes de bandages pendant tout le processus de cicatrisation.

Plusieurs études rapportent que les bandages modifient le cours normal de la guérison tissulaire au niveau appendiculaire chez le cheval (*Dubuc2006 ; Ducharme-Desjarlais2005 ; Lepault2005 ; DeMartin2004 ; Theoret2002a ; Barber1990*), alors qu'ils apparaissent, d'un point de vue clinique, sans effet au niveau corporel. Ainsi, l'utilisation de bandages semi-occlusifs favorise le développement de TGE au niveau appendiculaire (*Dubuc2006 ; Lepault2005 ; DeMartin2004 ; Theoret2002a ; Barber1990*). Ce moyen est largement utilisé, lors de la réalisation de projets de recherche, pour provoquer la surproduction de tissu de granulation et le développement de TGE au niveau appendiculaire (*Barber1990*). Inversement, l'utilisation de bandages occlusifs tels le Cica-Care® (silicone), limite le développement d'un TGE au niveau appendiculaire chez le cheval, en provoquant une plus grande occlusion microvasculaire (*Ducharme-Desjarlais2005*), tel qu'observé chez l'Homme (*Lynam2010*), sans néanmoins favoriser l'apoptose cellulaire ou une moindre production de collagène.

Une altération de l'humidité mais aussi de la température de la plaie, du pH et des échanges gazeux de la plaie avec son environnement pourrait expliquer les perturbations cicatricielles observées lors de leur utilisation (*Knottenbelt2003*).

En résumé :

Ainsi il existe d'autres facteurs que l'O₂ capables d'altérer l'évolution normale de la cicatrisation cutanée. Cependant, tous y apparaissent, de près ou de loin, reliés :

- l'arginine est un substrat essentiel à la synthèse de NO ;
- l'âge semble affecter l'efficacité signalétique de la voie du HIF ;
- le stress, par ses effets vasoconstricteurs, peut drastiquement perturber l'approvisionnement tissulaire en O₂ ;
- les infections, en particulier lorsqu'elles sont non contrôlées, peuvent spolier l'O₂ disponible ;
- les soins peuvent altérer les échanges gazeux entre la plaie et son environnement naturel, dont l'importance ne semble pas négligeable, puisque l'apport exogène local d'O₂ (TO) apparaît efficace dans le traitement de certaines plaies d'évolution anormale jusqu'à leur supplémentation locale en O₂.

HYPOTHÈSES & OBJECTIFS

HYPOTHÈSES

HYPOTHÈSE 1: La disponibilité locale en oxygène diffère selon la localisation anatomique de la plaie et dans le temps pendant la cicatrisation cutanée chez le cheval.

HYPOTHÈSE 2: La perfusion tissulaire diffère selon la localisation anatomique de la plaie et dans le temps pendant la cicatrisation cutanée chez le cheval.

OBJECTIFS

OBJECTIF 1: Évaluer la disponibilité locale en oxygène dans les plaies appendiculaires et corporelles du cheval, lors de la cicatrisation cutanée normale, en utilisant la spectroscopie par réflectance dans le proche infra-rouge.

OBJECTIF 2: Évaluer la perfusion tissulaire des plaies appendiculaires et corporelles, lors de la cicatrisation cutanée normale et anormale, en utilisant la thermographie infrarouge.

ARTICLES SCIENTIFIQUES

Note : la méthodologie ayant été utilisée dans les études menées étant détaillée avec précision dans les articles scientifiques publiés ou soumis pour publication, elle ne sera pas au préalable détaillée.

TITRE DE L'ARTICLE 1 :

REGIONAL DIFFERENCES IN WOUND OXYGENATION DURING NORMAL
HEALING IN AN EQUINE MODEL OF CUTANEOUS FIBROPROLIFERATIVE
DISORDER

STATUT DE L'ARTICLE :

Cet article est publié dans la revue Wound Repair and Regeneration, 2011; 19: 89 –
97

PARTICIPATION :

- collecte des données : 50%
- interprétation des données : 100%
- rédaction de l'article : 100%

**REGIONAL DIFFERENCES IN WOUND OXYGENATION DURING
NORMAL HEALING IN AN EQUINE MODEL OF CUTANEOUS
FIBROPROLIFERATIVE DISORDER**

Christophe J. Celeste, DVM, MSc ¹; Karine Deschene MSc ¹; Christopher B. Riley,
BVSc, PhD ²; Christine L. Theoret DVM, PHD ¹

¹ Comparative Tissue Healing Laboratory, Département de Biomédecine, Faculté de
Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Rue Sicotte, Saint-Hyacinthe,
Quebec, Canada J2S 2M2

² School of Animal and Veterinary Sciences, University of Adelaide, Roseworthy
Campus, Roseworthy, South Australia, Australia 5371

**Corresponding author / author to whom requests for reprints should be
addressed:**

Dr Christophe Celeste
Département de Biomédecine,
Faculté de Médecine Vétérinaire
3200 Rue Sicotte
Saint-Hyacinthe, QC, CANADA J2S 2M2
Tel: +1 450 773 8521 ext 8595
Fax: +1 450 778 8109

ABSTRACT

Wound repair in horse limbs is often complicated by the development of exuberant granulation tissue and excessive scarring while body wounds tend to repair uneventfully. Exuberant granulation tissue resembles the human keloid. While the events leading to keloid formation are not fully elucidated, tissue hypoxia has been proposed as a major contributing factor. The objective of this study was to investigate tissue oxygen saturation in healing full-thickness wounds created on the horse limb and body, using near infrared spectroscopy. Spectroscopic reflectance data were collected from both anatomic sites at specific times following wounding. Oxygen saturation values of limb wounds were significantly inferior to those of body wounds during the early period of healing, indicating a temporary, relative state of hypoxia in the former during the inflammatory phase of repair. Horses present a weak, persistent inflammatory response to wounding, especially at limb level. The relative hypoxia present acutely in limb wounds of horses may promote a feeble yet prolonged inflammatory response, which could interfere with and retard subsequent phases of healing. Ongoing low-grade inflammation in horse wounds is accompanied by up-regulation of various inflammatory and pro-fibrotic mediators, which might ultimately encourage the development of fibroproliferative disorders such as exuberant granulation tissue.

RUNNING TITLE:

Regional differences in wound oxygenation during healing in horses

KEYWORDS:

Wound healing, oxygen, keloid, spectroscopy, horse

INTRODUCTION

Wound healing is an orderly response to injury and its microenvironment, commonly divided into four highly integrated and overlapping phases: hemostasis, inflammation, proliferation and tissue remodeling or resolution (1). Wounds that exhibit impaired healing generally have failed to progress through these stages of healing in the proper sequence, at the specific time or for the specific duration. Such wounds are a common clinical problem in both humans and horses and exert a significant economic burden on the healthcare system (2, 3) as well as on the equine industry (4). Numerous horses are retired from an athletic career because of functionally debilitating and cosmetically disfiguring scars, which are often the result of exuberant granulation tissue (EGT) forming during wound healing.

A genetic predisposition has been incriminated in the pathogenesis of EGT (horses *versus* ponies) (5, 6), which affects specific anatomic locations in the horse (limb *versus* body) as well as the use of specific bandages. Most of the semioclusive and fully occlusive synthetic dressings, with the exception of the nonadherent and fully occlusive silicone dressing (7), have been shown to encourage the development of EGT and delay subsequent repair in horse, at limb level especially (8, 9), while they favor rapid epithelialization and cosmetic repair in many other species.

EGT, commonly known as “proud flesh”, behaves like a benign solid tumor and resembles the human keloid. The evolving wound is trapped in the proliferative phase of repair where fibroblasts persist and synthesize extracellular matrix (ECM) rather than differentiating into myofibroblasts or being eliminated (10), and endothelial cells proliferate, migrate and sprout into new blood vessels within the ECM. This process generates an abundant vascular supply, which enables EGT to grow rapidly with exponential increases in tissue volume. Interestingly, a greater occlusion of blood microvessels populating the granulation tissue of limb wounds predisposed to EGT has been reported in horses (11) indicating that though blood vessels infiltrate and proliferate in the granulation tissue, low oxygen tension may predominate, stimulate angiogenesis and encourage the limb wound to develop fibroproliferative disorders in horse.

In a wound setting, oxygen is required for cell oxidative metabolism-driven energy production by means of ATP, protein synthesis and the maturation of extracellular matrix components. It appears critical for nearly all wound healing processes. Oxygen is involved in nitric oxide (NO) synthesis, which plays a key role in the regulation of vascular tone and in angiogenesis. Large amounts of molecular oxygen are partially reduced to form reactive oxygen species (ROS) which drive endothelial cell signaling required for angiogenesis and ensure leukocyte efficiency against bacteria. Moreover, redox signaling supports key aspects of wound healing such as cell migration, cell proliferation and angiogenesis (2). Wound hypoxia, a reduction in oxygen delivery below tissue demand, characterizes some stages of the reparative process. It usually results either from impaired perfusion due to vascular disruption or sympathetically induced vasoconstriction (12), from increased oxygen consumption by metabolically active cells, or from generation of ROS (2). Generally, acute mild to moderate hypoxia supports adaptation and cell survival, triggering wound healing, whereas more severe or chronic hypoxia delays wound healing (1, 13, 14). Wound hypoxia primarily caused by vascular limitations is intensified by concurrent conditions (e.g., infection, pain, anxiety, hypo and hyperthermia) and often leads to poor healing outcomes (15, 16).

Hypoxia has been proposed as a mechanism contributing to keloid formation. Occlusion of microvessels (17), as well as increased mRNA and protein levels of Hypoxia Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) were documented in human keloid tissue (18), providing evidence for a local state of hypoxia. Acute hypoxia is a salutary response to injury (19) that stimulates many wound healing processes such as proangiogenic cytokine and growth factor production by macrophages, keratinocytes and fibroblasts (1). Prolonged or chronic hypoxia can favor constitutive expression of anti-apoptotic genes (20) and sustain the continuous production of inflammatory, angiogenic and fibrogenic cytokines and their receptors (21, 22), both conducive to fibroproliferative scarring. Occlusion of microvessels within the granulation tissue of limb wounds predisposed to EGT (11) consequent to endothelial cell hypertrophy (23), suggests a

possible contribution of local hypoxia to the pathogenesis of this dermal fibroproliferative disorder in horses.

Tissue oxygen status (StO_2) can be evaluated using spectrophotometric techniques such as Near InfraRed Spectroscopy (NIRS) (24-27). NIRS is a rapid, non-invasive analytical technique based on the relative ease with which near-infrared light passes through biological tissues. The concentrations of deoxyhemoglobin (dHb) and oxyhemoglobin (HbO_2) chromophores vary in relation to blood volume and oxygenation such that changes in the [dHb] and [HbO_2] in wound tissue provide information on tissue oxygenation status and blood volume.

The aim of this study was to determine whether a local state of hypoxia exists in the limb wounds of horses, according to the hypothesis that extensive scars resulting from the development of EGT in the horse may share a common basis of development with the human keloid, where the orderly and timely reparative process is dysregulated coincident with hypoxia. The specific hypothesis for this study, that the microenvironment of limb wounds in horses is hypoxic relative to that of body wounds, was verified by comparing tissue oxygen status over time in experimentally created body and limb wounds, using NIRS.

MATERIALS AND METHODS

EXPERIMENTAL APPROACH

Six healthy, 3- to 4-year-old Standardbred mares with no white markings were used for the experiment, which was in compliance with the Université de Montréal's guidelines for the care and use of laboratory animals as sanctioned by the Canadian Council on Animal Care. Non-pigmented areas of the limbs, face or body in horses appear predisposed to cutaneous disorders (e.g. cutaneous vasculitis) (28) that may potentially alter the healing process and jeopardize results as a confounding factor. Prior to entry into the study, horses were treated with a broad-spectrum anthelmintic and vaccinated against tetanus. Horses were kept free in individual box stalls for the duration of the study and allowed *ad libitum* access to grass hay and water. The animals were examined daily for signs of discomfort, lameness and systemic illness.

SURGICAL PROCEDURE

Horses were sedated with detomidine hydrochloride (0.01 mg/kg; iv) and butorphanol tartrate (0.04 mg/kg; iv). The hair was clipped from the dorso-lateral surface of one randomly chosen third metacarpus and one randomly chosen hemi-thorax in each horse. Local anesthesia was performed using 2% lidocaine hydrochloride; a high palmar nerve block desensitized the metacarpus while an inverted L-block was used to desensitize the assigned hemi-thorax. The surgical sites were aseptically prepared and three square (6.25 cm²) areas were traced on the dorso-lateral surface of each metacarpus beginning just above the metacarpophalangeal joint, and on the lateral thoracic wall, 2-cm apart in a staggered vertical column, using a sterile template. Full-thickness wounds were then created with a scalpel within the confines of the tracings. All limb wounds, which tend to bleed profusely immediately after surgery, were bandaged postoperatively for a 24 hour period to control hemorrhage then were left to heal by second intention without bandage. Body wounds (on the thorax) were not bandaged at any time during the study and were also left to heal by second intention.

Postoperative pain was managed with butorphanol tartrate (0,08 mg/kg IV) as required. Neither anti-inflammatory nor antimicrobial drugs were administered at any time during the study.

NEAR INFRARED SPECTROSCOPY - MATERIAL

Spectroscopic data were recorded with a dispersive photodiode assay fiber-coupled spectrometer (CDIPDA/600-1100/2.4/25 μm , CDI, South Bend, IL, USA) with a spectral resolution of 2.4 nm/pixel and a spectral bandwidth of 5.0 nm over a 500 to 1100 nm wavelength range. Each spectrum consisted of four co-added acquisitions, each taken with a 500 ms integration time. The spectra were stored as reference corrected reflectance data in optical density units, $\log(\text{reference/sample})$. A 99% diffuse reflectance standard (Zenith Reflectance Standard SG 3051 50 mm, Spherooptics, Concord, NH, USA) was recorded as the reference spectrum prior to gathering the time series of *in vivo* spectral data.

The common end of the fiber bundle consisted of a centrally located, single light collection fiber (diameter = 400 μm) surrounded by an outer fiber ring of emitter fibers separated by 1.0 mm from the central collection fiber. The emitter fibers at the bifurcated end of the bundle were coupled to an air-cooled 5W tungsten-halogen light source (Broad band light-source Model ASB-W-005 Spectral Products, Putnam, CT, USA). The output of the single collection fiber was coupled to the entrance slit of the spectrograph. In order to make the reflectance measurements in this interactance configuration, the collection end of the fiber probe was brought into direct contact with the wound tissue. The small separation between the light emitting and light collecting fibers limited penetration of the collected back-scattered light largely to the wound bed rather than the underlying tissues.

A time series of 5 spectra per point, 5 points per wound, was collected from each wound per site (body, limb) 24 hours, 48 hours, 96 hours, 1 week, 2 weeks, 3 weeks and 4 weeks after wounding.

NEAR INFRARED SPECTROSCOPY – DATA GENERATION

Light back-reflected from tissue is attenuated by the absorption of light by biochemical components in the tissue and the scattering of light out of the optical collection angle of the fiber optic probe. In the visible region between 510 – 620 nm, dHb and HbO₂ are the strongest absorbers of light in blood-perfused tissue. Using the known absorption characteristics of Hb and HbO₂, a modified Beer-Lambert unmixing model that incorporates a nonparametric scattering loss function determines the relative contribution of dHb and HbO₂ to the overall visible light reflectance spectrum. dHb and HbO₂ concentrations per unit photon path length were recovered by using the noniterative method for estimation in partially linear models based on kernel smoothing (26). The sum of relative concentrations of dHb and HbO₂ provided a measure of the total hemoglobin (tHb = dHb + HbO₂) contributing to the original tissue spectrum. The ratio of the relative concentration of HbO₂ to tHb provided a measure of tissue hemoglobin oxygen saturation ($\% \text{StO}_2 = 100 * \text{HbO}_2 / \text{tHb}$) based on the reflectance spectrum. These specific parameters (tHb, StO₂) represented wound blood volume and oxygenation differences, respectively.

STATISTICAL ANALYSIS

Mean changes in [dHb], [HbO₂], tHb and StO₂ over time were compared by use of repeated measures ANOVA with anatomical location (body vs limb) as within-subject factor. *A priori* contrasts, submitted to Bonferroni sequential correction, were then used to compare pre-selected individual means. A p value less than 0.05 was considered as a trend toward a significance.

RESULTS

CLINICAL OBSERVATIONS:

No signs of lameness or discomfort were observed after surgery. Wound exudation developed but remained serous in body wounds and resolved quickly (by 48 hours). While exudate tended to become purulent and to persist longer in limb wounds (5 days), this was accompanied only by painless edema, suggesting a prolonged influx of inflammatory cells rather than infection. Development of healthy granulation tissue was delayed in limb wounds, but granulation tissue was more abundant in this site by the end of the healing process. No EGT was observed in any wound throughout the study however. Granulation tissue developed into a dome shape at the center of all surgically-created wounds without ever covering the advancing epithelial border. Epithelialization was observed sooner in body wounds; a new epithelial border was visible in body wounds by day 2, whereas epithelium was visible in limb wounds at a median of 5 days. After the initial wound retraction, which was greater in limbs, wound areas decreased rapidly between weeks 2 and 4, with the exception of limb wounds where there was little evidence of wound contraction. Consequently, a delay in healing was observed in all limb wounds, as previously reported (6, 11, 29) even though none of them developed EGT.

The NIRS data are presented according to the clinical description of two phases of healing: the early period of healing, which encompasses hemostasis and inflammation (from injury through day 4), and the late period of healing which regroups proliferation and remodeling (from day 4 through 1 month).

WOUND DEOXYHEMOGLOBIN DURING THE EARLY PERIOD OF HEALING:

Figure 1 section A

Body wounds: there was no significant difference in body wound [dHb] over time from 24 hours to 96 hours post wounding. Interestingly, a 19% decrease in [dHb] was initially observed from 24 hours to 48 hours, followed by a 53% increase in [dHb]

from 48 hours to 96 hours, leading to an overall 23% increase in [dHb] during the early period of healing in body wounds.

Limb wounds: mean limb wound [dHb] at 96 hours was significantly lower than [dHb] at 24 hours ($p = 0,0061$), with a 42% decrease in [dHb] from 24 hours to 96 hours post wounding.

Wound differential: there was a significant difference in wound [dHb] between body and limb wounds at 24 hours ($p = 0,0028$) and 48 hours ($p < 0,0001$), with a significantly higher [dHb] in limb wounds at these times. At 96 hours, a trend toward a significantly higher [dHb] in body wounds was observed.

WOUND DEOXYHEMOGLOBIN DURING THE LATE PERIOD OF HEALING:

Figure 1 section B

Body wounds: there was no significant difference in body wound [dHb] over time from week 1 to week 4 post wounding.

Limb wounds: there was a progressive increase in wound [dHb] over time from week 1 to week 4 post wounding. Mean limb wound [dHb] at weeks 3 and 4 were significantly higher than [dHb] value at week 1 ($p = 0,0031$ and $p = 0,0003$ respectively).

Wound differential: mean [dHb] in body wounds was higher than mean [dHb] in limb wounds until week 2. This difference was not statistically significant, however. Thereafter higher [dHb] in limb wounds was observed with a trend toward a significant difference in mean wound [dHb] between body and limbs wounds at week 4 ($p = 0,039$).

WOUND OXYHEMOGLOBIN DURING THE EARLY PERIOD OF HEALING:

Figure 2 section A

Body wounds: there was no significant difference in body wound [HbO₂] over time from 24 to 48 hours post wounding. A trend toward a significant difference in [HbO₂] between 48 and 96 hours was then observed ($p = 0,05$). An overall 79% increase in mean body wound [HbO₂] was observed from 24 hours to 96 hours.

Limb wounds: there was no significant difference in limb wound [HbO₂] over time from 24 hours to 96 hours despite a slight increase from 24 to 48 hours post wounding.

Wound differential: there was a trend toward a significant difference in [HbO₂] between body and limb wounds at 96 hours ($p = 0,0421$), with a higher [HbO₂] in body wounds at that time.

WOUND OXYHEMOGLOBIN DURING THE LATE PERIOD OF HEALING:

Figure 2 section B

Body wounds: temporal differences in body wound [HbO₂] values were characterized by progressive decreases in [HbO₂] values, with a trend towards significance at week 4 ($p = 0,0320$).

Limb wounds: temporal differences in body wound [HbO₂] values were characterized by progressive decreases in [HbO₂], with a trend towards significance at weeks 2 and 4 ($p = 0,0340$ and $p = 0,0109$ respectively).

Wound differential: no statistically significant difference in [HbO₂] values was observed between body and limb wounds over time during the late period of healing.

WOUND TOTAL HEMOGLOBIN DURING THE EARLY PERIOD OF HEALING:

Figure 3 section A

Body wounds: there was no significant difference in tHb value from 24 hours to 48 hours. A trend toward a significant increase in tHb value (+ 26%) was observed between 48 hours and 96 hours ($p = 0,032$).

Limb wounds: there was no significant difference in tHb value from 24 hours to 48 hours. A trend toward a significant decrease in tHb value (- 26%) was observed between 48 hours and 96 hours ($p = 0,033$).

Wound differential: there was a trend toward a significant difference in tHb value between body and limb wounds at 24 hours ($p = 0,05$) and a significant difference in tHb value between body and limb wounds at 48 hours ($p = 0,0001$). At both times (24

hours and 48 hours), tHb value was higher in limb wounds than in body wounds. At 96 hours, there was a complete inversion of values when a trend toward a significantly higher tHb value in body wounds ($p = 0,011$) was observed.

WOUND TOTAL HEMOGLOBIN DURING THE LATE PERIOD OF HEALING:

Figure 3 section B

Body wounds: a progressive decrease in tHb values was observed, but the temporal differences in tHb values were not statistically significant for body wounds..

Limb wounds: a progressive increase in tHb values was observed, but the temporal differences in tHb values were not statistically significant for limb wounds.

Wound differential: a trend toward a significant difference in tHb values was observed between body and limb wounds at week 1 ($p = 0,013$). tHb value was higher in body wounds at week 1, then both types of wounds had similar tHb values with a slight, non significant increase in tHb value in limb wounds at week 4.

WOUND TISSUE OXYGEN SATURATION DURING THE EARLY PERIOD OF HEALING: Figure 4 section A

Body wounds: StO₂ remained elevated with an overall mean of 39,56% ($\pm 3,04\%$) but the difference was not statistically significant over time from 24 to 96 hours post wounding.

Limb wounds: mean limb wound StO₂ at 96 hours was significantly higher than at 24 hours ($p = 0,0012$), with a progressive increase from 21,26% ($\pm 8,72\%$) at 24 hours to 40,68% ($\pm 7,54\%$) at 96 hours.

Wound differential: there was a statistically significant difference in wound StO₂ between body and limb wounds at 24 hours ($p < 0,0001$) and 48 hours ($p < 0,0001$), with a significantly higher StO₂ in body wounds at these specific times. At 96 hours, mean wound StO₂ was similar between body and limb wounds.

WOUND TISSUE OXYGEN SATURATION DURING THE LATE PERIOD OF HEALING: Figure 4 section B

Body wounds: there was a progressive decrease in wound StO₂ over time from week 1 to week 4 post wounding. Mean wound StO₂ at week 4 was significantly lower than at week 1 ($p = 0,002$). There was a trend toward a significant decrease in mean wound StO₂ at week 2 ($p = 0,025$).

Limb wounds: a progressive decrease in wound StO₂ over time was observed, similarly to what was measured in body wounds. Mean wound StO₂ at week 3 and week 4 were significantly lower than StO₂ value at week 1 ($p = 0,0025$ and $p < 0,0001$ respectively) and there was a trend toward significance at week 3 ($p = 0,0269$).

Wound differential: mean wound StO₂ in body wounds was always higher than mean wound StO₂ in limb wounds. There was a trend toward a significant difference in mean wound StO₂ between body and limbs wounds at week 4 ($p = 0,0068$; body wounds $24,27 \pm 8,51$ %; limb wounds $16,75 \pm 6,43$ %).

DISCUSSION

This study mapped tissue oxygenation and blood volume throughout repair of wounds healing by second intention in different anatomic locations in horses, in an effort to document the presence of relative hypoxia in limb wounds predisposed to the development of EGT.

The wound oxygen level, appropriate for a specific wound type and anatomic location, appears crucial for optimum healing (2). While acute temporary hypoxia following injury triggers the healing process (13) via the induction of cytokines and growth factors that are crucial promoters of migration and proliferation of wound cells (14), oxygen is rapidly needed to sustain the repair process (13). If oxygenation is not quickly restored, healing is impaired (1).

Body wound StO₂ values significantly exceeded those of limb wounds during the early period of healing, indicating a temporary, relative state of hypoxia in the latter during the inflammatory phase of repair. A robust inflammatory response hinges on the ability of leukocytes to clear foreign material and resist infection. Polymorphonuclear cells (PMNs) fight infection via nonspecific phagocytosis and intracellular killing. Bacterial killing by PMNs is oxygen-dependent since ROS are the major component of bactericidal defense. Resistance to infection is therefore critically impaired in the face of wound hypoxia (12). Compared to ponies, horses mount a weak, persistent inflammatory response to dermal wounding, at limb level especially (10), and their PMNs secrete lesser amounts of inflammatory mediators, including ROS (30). Ponies, though closely related to horses, rarely develop EGT, regardless of wound location. Taken together, this evidence suggests that the relative hypoxia present acutely in limb wounds of horses may favor a feeble yet prolonged inflammatory response, which subsequently interferes with wound epithelialization, contraction, and collagen deposition, retarding wound healing (31). Moreover, ongoing low-grade inflammation in horse wounds is accompanied by up-regulation and persistence of various inflammatory and pro-fibrotic mediators (9, 29), as well as their receptors (32), which might ultimately encourage the development of fibroproliferative disorders such as EGT.

Acute tissue hypoxia is usually a result of impaired perfusion and oxygen delivery due to severance of microvessels and vasoconstriction consecutive to trauma and pain (12). Anatomic characteristics of perfusion (33-35) and thus wound-tissue oxygen tensions likely contribute to the different degrees of hypoxia between body and limb wounds in horses. Significantly greater [dHb] (figure 1 section A) and [tHb] (figure 3 section A) concentrations concurrent with lower StO₂ were measured in limb wounds during the early phase of repair. A superior blood volume might reflect the physiologic response of the vascular endothelium to localized hypoxia, characterized by vasodilation and capillary leak. Such blood pooling could participate in the genesis of edema, which should likewise be considered as a potential cause for the variation in degree of hypoxia observed between body and limb wounds. By increasing the inter-capillary distance at the local tissue level and therefore the path of oxygen diffusion (36) and/or by raising tissue pressure that augments capillary pressure (31), edema lowers tissue perfusion and local oxygen levels. Edema is significantly greater in limb than in body wounds of horses during the early phase of healing (6) and may therefore contribute to lower oxygen delivery to wound sites on the limb leading to relative tissue hypoxia in this location.

As the late period of healing proceeded, values of [HbO₂] (figure 2 section B) and StO₂ (figure 4 section B) progressively decreased in body and limb wounds concurrent with an increase in [dHb] (figure 1 section B) especially in limb wounds. Intense cell activity with a consequent increase in energy demand characterize the proliferative phase, and to a lesser extent the remodeling phase of healing, leading to a hypermetabolic state wherein additional energy is generated from oxidative metabolism, increasing oxygen demand by the healing tissue (2). Interestingly, mean [HbO₂] and StO₂ remained lower in limb than in body wounds for the duration of the late period of repair while [dHb] rose. Clinically, the granulation tissue of body wounds appeared healthy sooner than that of limb wounds in which grooves, clefts and exudate persisted. As a wound matures, fibroblasts should either disappear by apoptosis or convert into myofibroblasts to ensure wound contraction. This phenomenon is delayed in limb wounds of horses (10). Fibroblast activities in terms

of proliferation and synthesis are therefore protracted, increasing the energy requirement of limb wounds, which may explain the comparatively lower levels and more intense decrease in $[HbO_2]$ and StO_2 of limb wounds while $[dHb]$ increased. Increased oxygen consumption, leading to relative hypoxia, would likewise result from the large number of metabolically active inflammatory cells persisting within horse limb wounds even during the late period of repair (10, 30).

Interestingly, similar trends have been reported in human diabetic foot ulcers assessed by spectrophotometric technology. Tissue oxygenation appears significantly better in ulcerative wounds that heal versus those that do not (37) indicating that cutaneous tissue oxygenation correlates with normal wound healing in diabetic patients (38) as it seems the case in horses. Whether the primary culprit is macro- or microvascular disease or occlusion, as reported in limb wounds in the horse (11), it appears that tissues with vasculature incapable of supplying sufficient blood and oxygen do not heal normally.

Hyperbaric oxygen (HBO), as well as topical oxygen (TO), represents effective therapeutic approaches to bolster tissue oxygen levels in wounds suffering from oxygen deprivation. In the clinical setting, HBO and TO are usually applied in a standard format to all patients regardless of individual needs. The provision of a flat dose of oxygen may not meet the specific wound oxygen requirements to support the healing process. Moreover, the dose may be excessive and negate the beneficial effects of hypoxia, leading to growth arrest and cellular senescence (2). Results from the current study suggest that similar wounds located at different anatomic sites in the same patient may have specific, dissimilar needs in oxygen. This novel information might encourage the refinement of existing therapeutic strategies in terms of dosing regimen, and lead to the development of targeted approaches, consistent with the emerging concept of personalized healthcare (2).

To our knowledge this is the first study to map, via NIRS, tissue oxygenation throughout the reparative process of equine wounds healing by second intention. Reference data (T_0) is lacking as a result of abundant skin pigmentation in horses, which significantly alters light absorption and scattering (39) making NIRS unusable

on intact skin with no white markings. Moreover, specular reflectance created by highly reflective surfaces such as a fresh bleeding wound (27) handicapped data collection in wounds less than 24 hours old. Nonetheless, the study's main objective was to document differences between body and limb wounds. The absolute value of data generated by NIRS differs from that gathered by other means such as blood testing which is usually performed specifically on either venous or arterial blood. NIRS gives an estimate of parameters across arterioles, capillaries and venules (40), which could partially explain the observed differences. Moreover, the algorithms used in this study were designed for mammals other than horses (human, rabbit, pig), which could contribute towards differences between values obtained by different methods.

In conclusion, this study provides evidence of differences in oxygenation during the repair process of body and limb wounds in horses. It confirms the presence of a relative state of hypoxia in limb wounds during the early period of the repair process, as well as a more prolonged oxygen demand during the late period of repair. It corroborates previous studies reporting a prolonged yet inefficient inflammatory response in limb wounds, thought to contribute to the development of equine dermal fibroproliferative disorders such as EGT. Furthermore, data from this investigation impart novel information with regards to the different oxygen requirements of similar wounds in different anatomic locations in the same patient.

Further studies should verify the presence of greater hypoxia within limb wounds developing EGT. Likewise, an attempt should be made to elucidate the cause of such differences, which might then provide a basis for the development of appropriate, targeted therapies to prevent and treat excessive fibroplasia in equine wounds.

ACKNOWLEDGMENTS

Bandage materials were generously donated by Covidien Canada. Research was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, as well as the American College of Veterinary Surgeons (ACVS) and the Fondation Canadienne pour l'Innovation (FCI). The authors thank Dr Michael Sowa, from the National Research Council of Canada, Institute for Biodiagnostics, for the loan of spectroscopic material and for data generation, Dr. Guy Beauchamp for statistical analysis as well as Julie Ferland and Céline Forget for technical assistance.

FOOTNOTES

ECM	Extracellular matrix
EGT	Exuberant granulation tissue
dHb	Deoxyhemoglobin
HBO	Hyperbaric oxygen
HbO ₂	Oxyhemoglobin
NIRS	Near infrared spectroscopy
NO	Nitric oxide
PMNs	Polymorphonuclear cells
ROS	Reactive oxygen species
StO ₂	Tissue oxygen saturation
tHb	Total hemoglobin
TO	Topical oxygen

REFERENCES

1. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010; 89:219-229
2. Sen CK. Wound healing essentials: Let there be oxygen. *Wound Repair Regen* 2009; 17:1-18
3. Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelman RF. Impaired wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 25:19-25
4. Perkins NR, Reid SW, Morris RS. Risk factors for musculoskeletal injuries of the lower limbs in Thoroughbred racehorses in New Zealand. *N Z Vet J* 2005; 53:171-183
5. Wilmink JM, van Weeren PR. Second-intention repair in the horse and pony and management of exuberant granulation tissue. *Vet Clin north Am Equine Pract* 2005; 21:15-32
6. Wilmink JM, Stolk PW, van Weeren PR, Barneveld A. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopic aspects. *Equine Vet J* 1999; 31:53-60
7. Ducharme-Desjarlais M, Celeste C, Lepault L, Theoret CL. Effect of a silicone-containing dressing on exuberant granulation tissue formation and repair in horses. *Am J Vet Res* 2005; 66:1133-1139
8. Berry DB, 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

9. Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, Gordon JR. Preliminary observations on expression of transforming growth factors beta1 and beta3 in equine full-thickness skin wounds healing normally or with exuberant granulation tissue. *Vet Surg* 2002; 31:266-273
10. Wilmlink JM, van Weeren PR, Stolk PW, Van Mil FN, Barneveld A. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. *Equine Vet J* 1999; 31:61-67
11. Lepault E, Céleste C, Doré M, Martineau D, Theoret CL. Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse. *Wound Repair Regen* 2005; 13:520-529
12. Hopf HW, Rollins MD. Wounds: an overview of the role of oxygen. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9:1183-1192
13. Bishop A. Role of oxygen in wound healing. *J Wound Care* 2008; 17:399-402
14. Rodriguez PG, Felix FN, Woodley DT, Shim EK. The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatol Surg* 2008; 34:1159-1169
15. Allen DB, Maguire JJ, Mahdavian M, Wicke C, Marcocci L, Scheuenstuhl H, Chang M, Le AX, Hopf HW, Hunt TK. Wound hypoxia and acidosis limit neutrophil bacterial killing mechanisms. *Arch Surg* 1997; 132:991-996
16. Kumari R, Willing LB, Krady JK, Vannucci SJ, Simpson IA. Impaired wound healing after cerebral hypoxia-ischemia in the diabetic mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27:710718

17. Kischer CW. The microvessels in hypertrophic scars, keloids and related lesions: a review. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1992; 24:281-296
18. Zhang Q, Oh CK, Messadi DV, Duong HS, Kelly AP, Soo C, Wang L, Le AD. Hypoxia-induced HIF-1 alpha accumulation is augmented in a co-culture of keloid fibroblasts and human mast cells: involvement of ERK1/2 and PI-3K/Akt. *Exp Cell Res* 2006; 312:145-155
19. Lokmic Z, Darby IA, Thompson EW, Mitchell GM. Time course of hypoxia, granulation tissue and blood vessel growth, and remodeling in healing rat cutaneous incisional primary intention wounds. *Wound Repair Regen* 2006; 14:277-288
20. Saed MG, Diamond MP. Apoptosis and proliferation of human peritoneal fibroblasts in response to hypoxia. *Fertil Steril* 2002; 78:137-143
21. Saed MG, Collins KL, Diamond MP. Transforming growth factor beta1, beta2 and beta3 and their receptors are differentially expressed in human peritoneal fibroblast in response to hypoxia. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48:387-393
22. Vujaskovic Z, Anscher MS, Feng QF, Rabbani ZN, Amin K, Samulski TS, Dewhirst MW, Harron ZA. Radiation-induced hypoxia may perpetuate late normal tissue injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 50:851-855
23. Dubuc V, Lepault E, Theoret CL. Endothelial cell hypertrophy is associated with microvascular occlusion in horse wounds. *Can J Vet Res* 2006; 70:206-210
24. Thomson SJ, Cowan ML, Forton DM, Clark SJ, Musa S, Grounds M, Rahman TM. A study of muscle oxygenation and peripheral microcirculatory

- dysfunction in cirrhosis using near infrared spectroscopy. *Liver Int* 2009; 13:463-471
25. Weingarten MS, Papazoglou ES, Zubkov L, Zhu L, Neidrauer M, Savir G, Peace K, Newby JG, Pourrezaei K. Correlation of near infrared absorption and diffuse reflectance spectroscopy scattering with tissue neovascularization and collagen concentration in a diabetic rat wound healing model. *Wound Repair Regen* 2008; 16:234-242
26. Sowa MG, Leonardi L, Payette JR, Cross KM, Gomez M, Fish JS. Classification of burn injuries using near-infrared spectroscopy. *J Biomed Opt* 2006; 11:054002
27. Kohlenberg E, Payette JR, Sowa MG, Levasseur MA, Riley CB, Leonardi L. Determining intestinal viability by near infrared spectroscopy: A veterinary application. *Vibration Spectroscopy*
28. White SD, Affolter VK, Dewey J, Kass PH, Outerbridge C, Ihrke PJ. Cutaneous vasculitis in equines: a retrospective study of 72 cases. *Vet Dermatol* 2009; 20:600-606
29. Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, Gordon JR. Expression of transforming growth factor beta(1), beta(3) and basic fibroblast growth factor in full-thickness skin wounds of equine limbs and thorax. *Vet Surg* 2001; 30:269-277
30. Wilmink JM, Veenam JN, van den Boom R, Rutten VP, Niewold TA, Broekhuisen-Davies JM, Lees R, Armstrong S, van Weeren PR, Barneveld A. Differences in polymorphonucleocyte function and local inflammatory response between horses and ponies. *Equine Vet J* 2003; 35:561-569
-

31. Broughton G. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117 (Suppl):1-32
32. De Martin I, Theoret CL. Spatial and temporal expression of types I and II receptors for transforming growth factor beta in normal equine skin and dermal wounds. *Vet Surg* 2004; 33:70-76
33. Simon EL, Gaughan EM, Epp T, Spire M. Influence of exercise on thermographically determined surface temperatures of thoracic and pelvic limbs in horses. *J Am Vet Med Assoc* 2006; 15:1940-1944
34. Sheffield CW, Sessler DI, Hopf HW, Schroeder M, Moayeri A, Hunt TK, West JM. Centrally and locally mediated thermoregulatory responses alter subcutaneous oxygen tension. *Wound Repair Regen* 1996; 4:338-345
35. Manning TO, Monteiro-Riviere NA, Bristol DG, Riviere JE. Cutaneous laser-Doppler velocimetry in nine animal species. *Am J Vet Res* 1991; 52:1960-1964
36. Mustoe TA, O'Shaughnessy KO, Kloeters O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117:35S-41S
37. Khaodhiar L, Dinh T, Schomacker KT, Panasyuk SV, Freeman JE, Lew R, Vo T, Panasyuk AA, Lima C, Giurini JM, Lyons TE, Veves A. The use of medical hyperspectral technology to evaluate microcirculatory changes in diabetic foot ulcers and to predict clinical outcomes. *Diabetes Care* 2007; 30:903-910

38. Nouvong A, Hoogwerf B, Mohler E, Davis B, Tajaddini A, Medenilla E. Evaluation of diabetic foot ulcer healing with hyperspectral imaging of oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin. *Diabetes Care* 2009; 32:2056-2061

39. Ward KR, Ivatury RR, Barbee RW, Terner J, Pittman R, Filho IP, Spiess B. Near infrared spectroscopy for evaluation of the trauma patient: a technology review. *Resuscitation* 2006; 68:27-44

40. Thorn CE, Matcher SJ, Meglinski IV, Shore AC. Is mean blood saturation a useful marker of tissue oxygenation? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296:1289-1295

FIGURE LEGENDS

Figures represent the evolution of tissue deoxyhemoglobin [dHb], oxyhemoglobin [HbO₂], oxygen saturation (StO₂) and total hemoglobin (tHb) extracted from spectroscopic data over the healing process.

Section A in each figure represents the early period of the healing process (from injury through to day 4). Section B in each figure represents the late period of the healing process (from day 4 through 1 month)

Values are means \pm SD

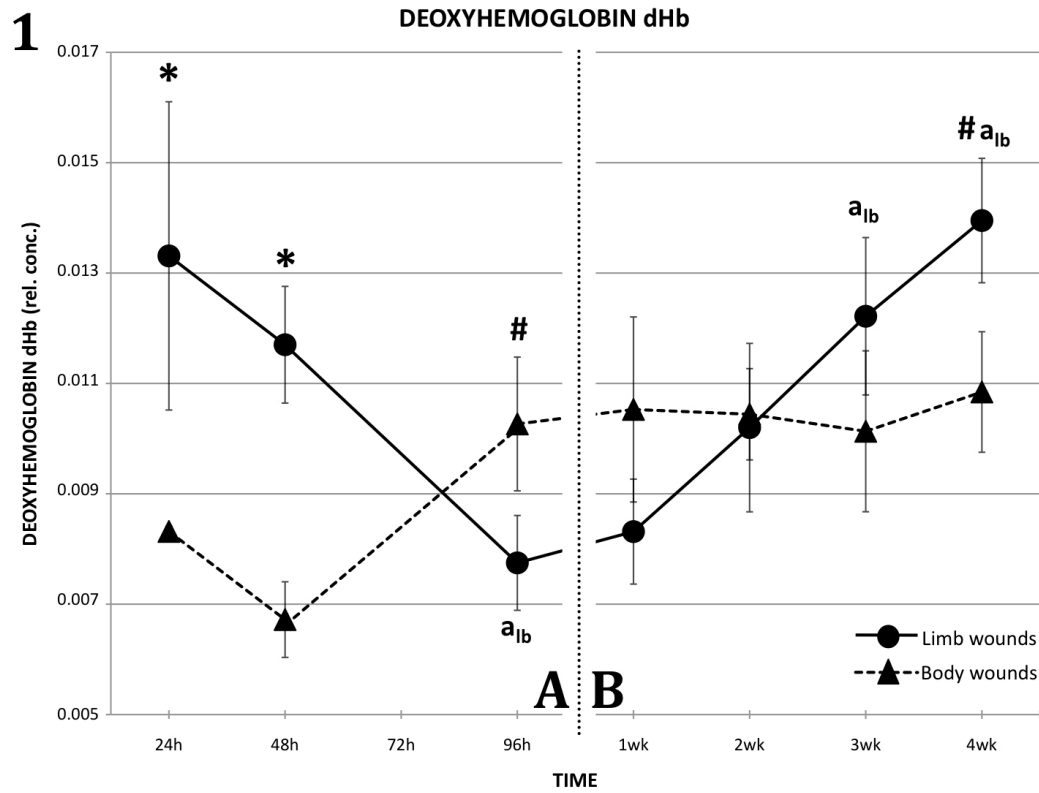
* : comparison between wound sites – body versus limb – $p < 0,003$ – difference is considered statistically significant following Bonferroni sequential correction

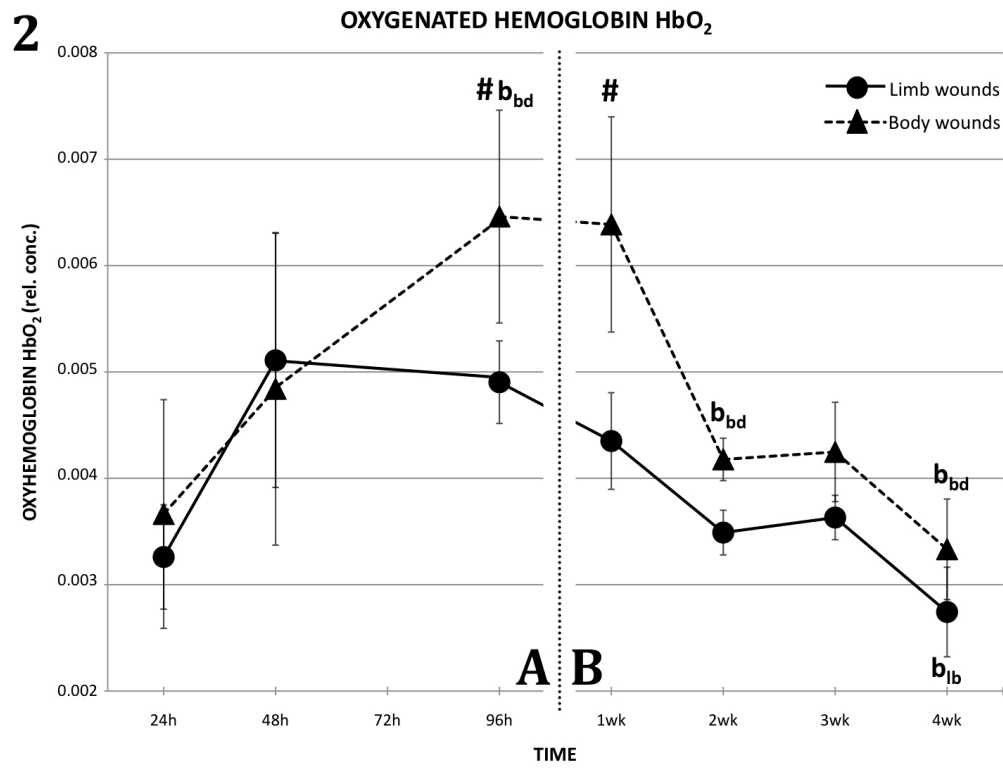
: comparison between wound sites – body versus limb – $p < 0,05$ – difference is considered as a trend toward a significance

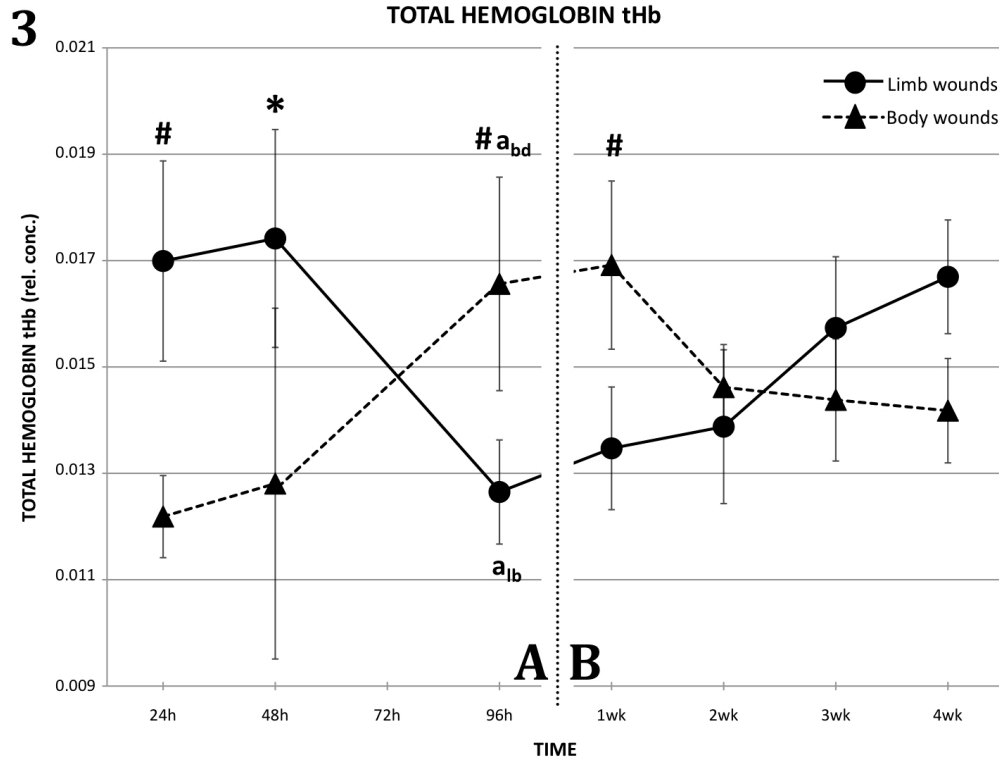
a : comparison over time – either body (bd) or limb (lb) with value at 24h or week1 considered as the reference value – $p < 0,003$ – difference is considered statistically significant following Bonferroni sequential correction

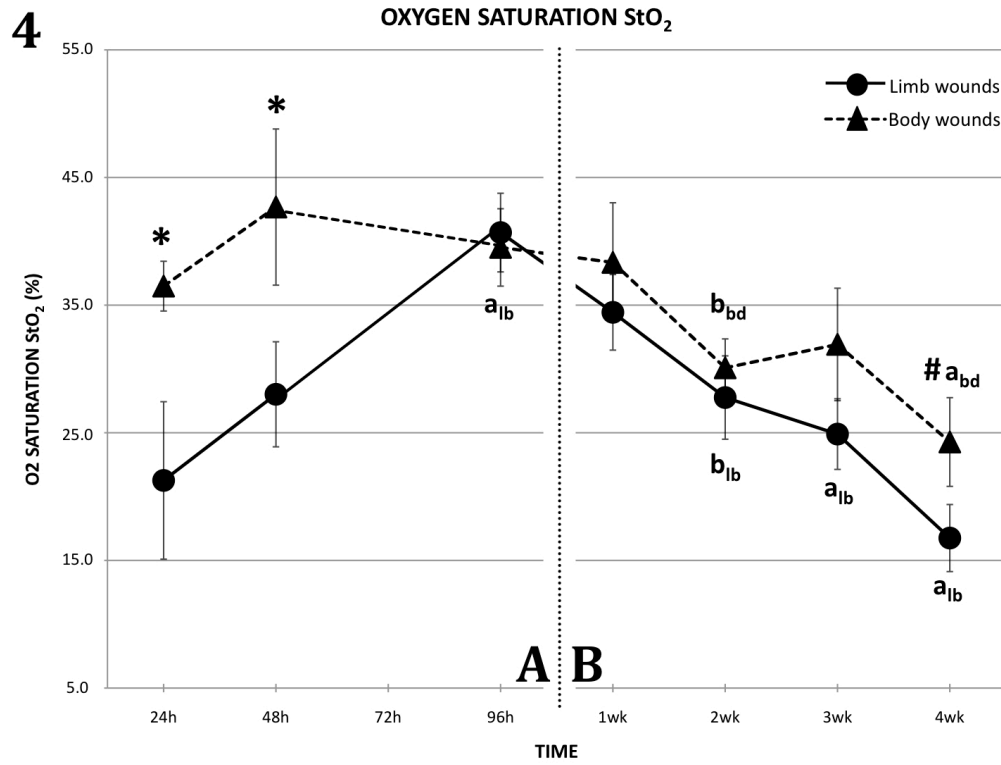
b : comparison over time – either body (bd) or limb (lb) with value at 24h or week1 considered as the reference value – $p < 0,05$ – difference is considered as a trend toward a significance

FIGURES









TITRE DE L'ARTICLE 2 :

KINETICS OF BLOOD FLOW AND ANATOMICAL-SITE DIFFERENCES IN
TISSUE PERFUSION DURING WOUND HEALING IN AN EQUINE MODEL OF
CUTANEOUS FIBROPROLIFERATIVE DISORDER

STATUT DE L'ARTICLE :

Cet article est soumis pour publication dans la revue Veterinary Surgery – numéro
d'identification du manuscrit : VSU-11-038

PARTICIPATION :

- collecte des données : 50%
- interprétation des données : 100%
- rédaction de l'article : 100%

**KINETICS OF BLOOD FLOW AND ANATOMICAL-SITE DIFFERENCES
IN TISSUE PERFUSION DURING WOUND HEALING IN AN EQUINE
MODEL OF CUTANEOUS FIBROPROLIFERATIVE DISORDER**

Christophe J. Celeste, DVM, MSc, Diplomate ACVS/ECVS¹; Karine Deschesne
MSc¹; Christopher B. Riley, BVSc, PhD, Diplomate ACVS²; Christine L. Theoret
DVM, PhD, Diplomate ACVS¹

¹ Comparative Tissue Healing Laboratory, Département de Biomédecine, Faculté de
Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Rue Sicotte, Saint-Hyacinthe,
Quebec, Canada J2S 2M2

² School of Animal and Veterinary Sciences, University of Adelaide, Roseworthy
Campus, Roseworthy, South Australia, Australia 5371

**Corresponding author / author to whom requests for reprints should be
addressed:**

Dr Christophe Celeste
Département de Biomédecine,
Faculté de Médecine Vétérinaire
3200 Rue Sicotte
Saint-Hyacinthe, QC, CANADA J2S 2M2
Tel: +1 450 773 8521 ext 8595
Fax: +1 450 778 8109

Funding: Research was funded by the Natural Sciences and Engineering Research
Council (NSREC) of Canada, as well as the American College of Veterinary
Surgeons (ACVS) Foundation through the Diplomate Clinical Research Grant
program, and the Fondation Canadienne pour l'Innovation (FCI).

Study was performed at the Comparative Tissue Healing Laboratory, Département de Biomédecine, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal

ABSTRACT

Cutaneous wound healing in horse limbs is often perturbed by the development of exuberant granulation tissue while body wounds tend to repair uneventfully. While the events leading to exuberant granulation tissue formation are not fully elucidated, tissue hypoxia, which usually results from impaired oxygen delivery to tissue or increase in tissue oxygen consumption, has been proposed as a major contributing factor. The objective of this study was to map the kinetics of cutaneous temperature and by extension to investigate skin blood flow in normal / abnormal healing of full-thickness cutaneous wounds created on the horse limb and body, using infrared thermography. Thermal data were collected from both anatomic sites at specific times following wounding. Tissue perfusion values of limb wounds were significantly inferior to those of body wounds throughout the healing process, indicating a relative state of deficient skin blood flow at limb level. Altered tissue perfusion may promote tissue hypoxia and jeopardize wound repair in the limb. While oxygen delivery to wound tissues most likely is mainly blood-dependent, a small amount of oxygen may be delivered via the superficial layer of the wound and may represent an appreciable amount of oxygen in the wound setting. Bandages, which induced development of exuberant granulation tissue in limb wounds in this model, may alter the gaseous exchanges between the wound and its microenvironment to an extent sufficient to worsen the existant deficient oxygen gradient and encourage the development of fibroproliferative disorders such as exuberant granulation tissue.

KEYWORDS:

Wound healing, oxygen, perfusion, thermography, horse

INTRODUCTION

Traumatic full thickness skin wounds occur commonly in horses and usually must heal by second intention.¹ This type of repair may lead to abnormal healing, which is often the result of exuberant granulation tissue (EGT) formation. A genetic predisposition has been incriminated in the pathogenesis of EGT (horses vs. ponies)²⁻⁴, which affects specific anatomic locations (limb vs. body), as has the use of certain bandages. Most semi-occlusive and fully occlusive synthetic dressings, with the exception of the fully occlusive silicone dressing⁵ have been shown to encourage the development of EGT and delay subsequent repair, especially at the limb level.⁶⁻⁸

A complex process, skin healing is commonly divided into four highly integrated and overlapping phases: hemostasis, inflammation, proliferation and tissue remodeling or resolution.⁹ Commonly, a wound that develops EGT is trapped in the proliferative phase of repair, where fibroblasts persist and synthesize ECM rather than differentiating into myofibroblasts or being eliminated. Angiogenesis evolves rapidly within the ECM, enabling EGT to grow exponentially. Interestingly, a relative state of wound hypoxia due to a reduction in oxygen delivery below tissue demand has recently been reported in horse limb wounds predisposed to EGT.¹⁰ This implies that although new blood vessels infiltrate and proliferate within the granulation tissue, low oxygen gradients may predominate, stimulate angiogenesis and promote the development of fibroproliferative disorders.

Oxygen, an essential nutrient to cell functions, appears critical to all wound-healing phases.¹¹ Because oxygen reaches skin wounds mainly via the bloodstream, healing appears exquisitely sensitive to wound tissue perfusion, or skin blood flow, and blood oxygen saturation level.¹² Blood oxygen saturation at skin level is usually uniform throughout the body whereas skin microvascular anatomy varies according to location.¹³ In mammals, most of the skin surface has a nutritive (NUTR) perfusion subserved by small capillaries. However certain sites, such as the face and tips of the fingers and toes in humans¹⁴⁻¹⁷ or the paws in rodents^{18,19}, have a higher density of larger diameter arterioles and venules with low resistance and high flow. In these arteriovenous (AV) areas, the blood flow response to stimuli differs compared to that

at NUTR sites.^{19,20} Therefore, mammalian skin blood flow is location-specific due to differences in the microvascular anatomy.¹²

Skin wounding impairs tissue perfusion due to vascular disruption or sympathetically induced peripheral vasoconstriction.¹² As healing proceeds, granulation tissue fills the wound bed and angiogenesis develops. Interestingly, all wound vessels do not appear equally functional, spatially and temporally, during the repair process in humans.²¹ In horses, few studies have quantified the degree of angiogenesis or examined the functionality of new blood vessels with regards to blood flow or tissue perfusion during healing. Lepault et al. reported that angiogenesis was more pronounced in limb compared to body wounds in horses as skin wounds healed.⁶ However, the granulation tissue filling the limb wound beds contained a significantly greater number of occluded microvessels than that filling the body wound beds⁶, suggesting that the importance of vessel functionality may surpass vessel quantity in achieving efficient healing. Consequently, it appears crucial to measure tissue perfusion rather than simply quantifying the number or volume of blood vessels contained in the granulation or scar tissues, in an effort to estimate blood and oxygen supply to the healing wound in horses.²¹

There exist optical methods of determining tissue perfusion, which are easily applicable, rapid, reliable, non-invasive and cost effective. The skin temperature of a bodily area is a product of cell metabolism and local blood flow such that a raise in temperature is usually the result of an increase of these factors, although blood flow plays the major role.²² Consequently, quantification of skin temperature can be correlated to qualitative evaluations of skin blood flow.²³⁻²⁵ In this manner, surface temperature measurements by thermal infrared imaging, also called infrared thermography (IT) can be used to indirectly assess changes or impairments in peripheral tissue perfusion.^{26,27} IT is a well-established non-contact imaging method creating reproducible heat maps of the investigated area^{28,29} well correlated with other means of tissue perfusion evaluation, such as laser Doppler.²³ Its use in equine diagnostic imaging is now widely accepted.^{22,30-35}

The aim of this study was to map the kinetics of cutaneous temperature and by

extension skin blood flow during wound healing in different anatomic locations in horses using a model of cutaneous fibroproliferative disorder and to determine whether abnormal tissue perfusion exists in the limb wounds of horses predisposed to develop EGT. The specific hypothesis, that limbs wounds developing EGT have impaired tissue perfusion, was verified by comparing tissue perfusion over time in experimentally created body and limb wounds using IT.

MATERIALS AND METHODS

EXPERIMENTAL APPROACH

Six healthy, 3- to 4-year-old Standardbred mares were used for the experiment, which was conducted in accordance with the Université de Montréal's rules for the care and use of laboratory animals as sanctioned by the Canadian Council on Animal Care. Prior to entry into the study, horses were treated with a broad-spectrum anthelmintic and vaccinated against tetanus. Horses were kept free in individual box stalls in a covered, environmentally controlled building for the duration of the study and allowed *ad libitum* access to grass hay and water. The animals were examined daily for signs of discomfort, lameness and systemic illness. Wounds were monitored until complete healing.

SURGICAL PROCEDURE

Skin wounding was carried out as previously described.¹⁰ Briefly, horses were restrained in stocks and sedated with detomidine hydrochloride (0.01 mg/kg; iv) and butorphanol tartrate (0.04 mg/kg; iv). The hair was clipped from the dorso-lateral surface of both third metacarpi and one randomly chosen hemi-thorax in each horse. Local anesthesia was performed using 2% lidocaine hydrochloride; a high palmar nerve block desensitized the metacarpus while an inverted L-block was used to desensitize the assigned hemi-thorax. The surgical sites were aseptically prepared and three square (6.25 cm²) areas were traced on the dorso-lateral surface of each metacarpus beginning just above the metacarpophalangeal joint, and on the lateral thoracic wall, 2-cm apart in a staggered vertical column, using a sterile template. Full-thickness wounds were then created with a scalpel within the confines of the tracings. All limb wounds, which tend to bleed profusely immediately after surgery, were bandaged postoperatively for a 24 hour period to control hemorrhage. One randomly chosen distal forelimb was then left to heal by second intention without bandage, while the contralateral limb was bandaged postoperatively to induce the formation of EGT and lead to excessive scarring.^{6,8} Semi-occlusive bandages were used and changed every other day until complete healing (primary contact layer:

Telfa™; secondary layer: Webril™; third layer: Conform™ then Flex-Wrap™) (Covidien, Saint-Laurent, Quebec, Canada). Body wounds (on the thorax) were not bandaged at any time during the study and were also left to heal by second intention. Postoperative pain was managed with butorphanol tartrate (0,08 mg/kg IV) as required. Neither anti-inflammatory nor antimicrobial drugs were administered at any time during the study.

NEAR INFRARED THERMOGRAPHY

- PREPARATION FOR MEASUREMENTS -

Horses were taken individually from their original indoor controlled environment of known temperature and humidity and restrained in stocks in a thermal imaging room located in the same environmentally controlled building. Ambient temperature and humidity were recorded. Fifteen minutes before acquisition of thermal images, bandages were removed and horses were groomed to remove debris from the wounds if present. No sedation was administered at any time during data collection. Horses were quiet, calm and weight bearing on all 4 limbs during imaging.

- EQUIPMENT -

Thermal images were acquired using a ThermoCAM SC2000 (FLIR Systems, Inc., North Billerica, Massachusetts, US), a hand-held infrared imaging radiometer placed at a distance of 1 m perpendicular to the lateral surfaces of the hemi-thorax and distal forelimbs, set for the highest sensitivity value of 0.1°C and adjusted for background temperature and humidity. An emissivity value of 0.98 was chosen based on available values reported for human skin and used in recently published equine studies.³³

A time series of six digital thermal images was collected from each surgical site (body, forelimbs) prior to the surgical procedure (baseline), and at 24, 48, 96 hours, 1, 2, 3 and 4 weeks after wounding. The data stored within the ThermoCAM SC2000 were copied to a microcomputer running on Microsoft® Windows® XP and analyzed.

- DATA ANALYSIS -

Using the FLIR Systems' ThermoCAM Researcher Professional 28 SR-3 software program (FLIR Systems, Inc., Wilsonville, Oregon, US), delineated areas were

superimposed on saved thermal images at specific wound sites as detailed on Image 1. Mean temperature for each area was calculated by the software, which used ambient temperature and humidity to make appropriate adjustment of thermal measurements to ensure accuracy. Data were then exported to a Microsoft® Excel® data handling program to compare changes in mean surface temperature at specific wound sites as affected by time of healing, anatomic location and wound management. Statistical analysis was performed within this package.

IMMUNOFLUORESCENCE

- TISSUE COLLECTION -

Excised skin during the surgical procedure was kept as a time 0 sample (intact skin).

A full-thickness wound margin sample was retrieved with an 8 mm diameter biopsy punch at 1 and 4 weeks postoperatively following thermal images acquisition. The sample included a 3- to 4- mm strip of peripheral intact skin, the migrating neoepithelium, and a 3- to 4- mm strip of granulation tissue. The sample was preserved in Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek, Inc., Torance, California, USA) and stored at -80°C for later fluorescence labelling.

- FLUORESCENCE LABELLING -

As described elsewhere,³⁶ cryosections (5 µm) of intact skin and of wound margin samples were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature, and stored in a 1% paraformaldehyde solution at 4°C until use. Cryosections were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS), then in 6% H₂O₂ to quench endoperoxidases. Tissues were then blocked with 1% blocking solution in PBS. Thereafter they were incubated with the primary antibody solution diluted in blocking solution at 4°C overnight (Protein S100A4 – Sigma-HPA007973, dilution 1:500) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). The S100A4 protein / fibroblast-specific protein-1 (FSP1) is a member of the S100 family of calcium binding proteins. S100 proteins are localized in the cytoplasm and/or nucleus of a wide range of cells and involved in the regulation of a number of cellular processes such as cell cycle progression and differentiation. FSP1/S100A4 is highly expressed in fibroblasts (*Iwano2001; Strutz1995*), in

epithelial cells undergoing epithelial-mesenchymal transition (EMT), in endothelial cells undergoing endothelial-mesenchymal transition (EndMT) (Zeisberg2009; Zeisberg2008; Iwano2002) and in epithelial cancer cells that complete a transition to a metastatic phenotype (Xue2003). Coexpression of CD31, a specific marker of endothelial cells, and FSP1/S100A4 was reported in a model of tissue fibrosis (Zeisberg2008).

Subsequently, sections were washed with PBS and incubated with Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (dilution 1:250) (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) for 2 hours at room temperature. Finally, the nuclei were counterstained with Vectashield containing DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA).

STATISTICAL ANALYSIS

Mean changes in surface temperatures at specific wound sites over time were compared by use of repeated measures ANOVA with anatomical location (body vs limb) and wound management (open vs bandage) as within-subject factors. *A priori* contrasts, submitted to Bonferroni sequential correction, were then used to compare pre-selected individual means. Significance was set *a priori* at $p < 0.05$. All data were expressed as mean \pm SEM.

RESULTS

CLINICAL OBSERVATIONS:

No signs of lameness or discomfort were observed after surgery. EGT developed in all bandaged limb wounds approximately 7 to 10 days postoperatively and impaired the wound healing, as previously reported.⁶ Other wounds, located either on the body or the limb and left to heal by second intention without bandaging, healed uneventfully and did not develop EGT at any time during the study. Formation of healthy granulation tissue and epithelialization were observed sooner, however, in open body wounds. Consequently, a delay in healing was observed in all limb wounds, either bandaged or not, as previously reported^{3,6,8} even though only those managed with bandages developed EGT.

SURGICAL WOUND TEMPERATURE (SWt)

Figures 1 & 2, sections A, B, C

Open body wounds: There was a progressive and significant increase in SWt over time from preoperative time to week 1 post-wounding ($p < 0.0001$). A 10.9 % increase in SWt was initially observed from preoperative time to 48 hours, followed by a 5.6 % increase in SWt from 48 hours to 1 week, leading to an overall 16.8 % increase in SWt during the first week of healing in open body wounds (+ 5.4°C). A progressive decrease in SWt was then observed from week 1 to week 4 post-wounding (- 1.1°C) but was not statistically significant. The mean SWt at week 4 was, however, significantly higher than preoperatively (+ 4.3 °C) ($p < 0.0001$).

Open limb wounds: There was a progressive and significant increase in SWt over time from preoperative time to week 1 post-wounding ($p = 0.0001$). Interestingly, a 5.6 % increase in SWt was initially observed from preoperative time to 24 hours, followed by a 2.0 % decrease in SWt from 24 hours to 48 hours then a 6.3 % increase from 48 hours to week 1, leading to an overall 10 % increase in SWt during the first week of healing in open limb wounds (+ 2.6°C). Thereafter a progressive decrease in SWt was observed from week 1 to week 4 post-wounding (- 0.8°C) but was not

statistically significant. The mean SWt at week 4 was, however, significantly higher than preoperatively (+ 2.4 °C) ($p < 0.0001$).

Bandaged limb wounds: A progressive and significant increase in mean SWt was observed over time from preoperative time to week 1 post-wounding ($p = 0.0001$), similar to what was observed in open limb wounds (+2.6°C). A progressive and significant decrease in SWt was then observed from week 1 to week 4 post-wounding (- 3.9°C) ($p < 0.0001$), leading to a mean SWt at week 4 not significantly different than preoperatively ($p = 0.09$).

Open wound differential: There was a statistically significant difference in SWt between open body and open limb wounds from 48 hours to week 4 post-wounding (48 hours $p = 0.003$, 96 hours $p = 0.008$, week 1 $p = 0.002$, week 2 $p = 0.002$, week 3 $p = 0.007$, week 4 $p = 0.007$), with a significantly higher SWt in open body wounds at these specific times.

Limb wound differential: The mean SWt in bandaged limb wounds was always higher than the mean SWt in open limb wounds over time from 24 hours to week 1, but the difference was not statistically significant. Thereafter, the mean SWt in open limb wounds remained elevated while the mean SWt in bandaged limb wounds significantly decreased, leading to a statistically significant difference in SWt between open and bandaged limb wounds at weeks 3 and 4 ($p = 0.01$ and $p < 0.0001$, respectively), with a significantly lower SWt in bandaged limb wounds at these specific times (- 1.4°C and - 3.1°C, respectively).

TEMPERATURE at WOUND PERIPHERY WPt

Figures 3 & 4, sections A, B, C

Open body wounds: Temporal differences in open body wounds WPt were characterized by a dramatic increase from preoperative time to 48 hours post-wounding (17.2 %) followed by a gentle 2.1 % increase from 48 hours to week 1, leading to an overall significant increase of 19.7 % in WPt during the first week of healing (+ 6.3°C) ($p < 0.0001$). A progressive and significant decrease in WPt was then observed from week 1 to week 4 post-wounding (- 2.5°C) ($p < 0.0001$).

Interestingly, the mean WPt at week 4 remained significantly higher, however, than preoperatively ($p = 0.0001$).

Open limb wounds: There was a significant increase in WPt from preoperative time to week 1 post-wounding ($p < 0.0001$) with an overall 13.5 % increase during the first week of healing in open limb wounds (+ 4.4°C). Thereafter a progressive and significant decrease in WPt was observed from week 1 to week 4 post-wounding (- 2.3°C) ($p = 0.0002$). The mean WPt at week 4 was significantly higher than preoperatively (+ 2.1 °C) ($p = 0.001$).

Bandaged limb wounds: Similar to what was observed in open limb wounds, a progressive and significant increase in mean WPt was observed from preoperative time to week 1 post-wounding (+ 4.3°C) ($p < 0.0001$), followed by a progressive and significant decrease from week 1 to week 4 post wounding (- 2.7°C) ($p < 0.0001$). Mean SWt at week 4 was significantly higher than preoperatively (+ 2.4 °C) ($p = 0.01$).

Open wound differential: There was a statistically significant difference in WPt between open body and open limb wounds only at 48 hours and week 1 post-wounding ($p = 0.002$ and $p = 0.005$, respectively), with a significantly higher WPt in open body wounds at these specific times.

Limb wound differential: No statistically significant difference in the WPt values was observed between open and bandaged limb wounds throughout healing.

TOTAL SURGICAL SITE TEMPERATURE TSS_t

Figure 5, sections A, B, C

Open body wounds: There was a progressive and significant 16.3 % increase in TSS_t from preoperative time to week 1 post-wounding ($p < 0.0001$) (+ 5.2°C) followed by a progressive and significant 6.5 % decrease until week 4 ($p = 0,0002$) (- 2.3°C). The mean TSS_t at week 4 was significantly higher than preoperatively, however (+ 3.4 °C) ($p < 0.0001$).

Open limb wounds: There was a progressive and significant 12.6 % increase in TSS_t from preoperative time to week 1 post-wounding ($p < 0.0001$) (+ 4.1°C) followed by

a progressive and significant 6.3 % decrease until week 4 ($p = 0,0003$) ($- 2.3^{\circ}\text{C}$). The mean TSS_t at week 4 was significantly higher, however, than preoperatively ($+ 1.8^{\circ}\text{C}$) ($p = 0.006$).

Bandaged limb wounds: There was a progressive and significant 12.8 % increase in TSS_t from preoperative time to week 1 post-wounding ($p < 0.0001$) ($+ 4.2^{\circ}\text{C}$) followed by a progressive and significant 6.2 % decrease until week 4 ($p = 0,0003$) ($- 2.3^{\circ}\text{C}$). The mean TSS_t at week 4 was significantly higher, however, than preoperatively ($+ 1.9^{\circ}\text{C}$) ($p = 0.002$).

Open wound differential: No statistically significant difference in the TSS_t values was observed between open body and open limb wounds at any time point throughout healing. Interestingly, the mean TSS_t in open body wounds was statistically higher than the mean TSS_t in open limb wounds across all times ($p = 0.006$).

Limb wound differential: No statistically significant difference in the TSS_t values was observed between open and bandaged limb wounds at any time point throughout healing. Interestingly, the mean TSS_t in bandaged limb wounds was statistically higher than the mean TSS_t in open limb wounds across all times ($p = 0.04$).

EVOLUTION OF WOUND TISSUE VASCULARITY

Figures 6, 7, 8

The commercially available S100A4 antibody (Sigma-HPA007973; Sigma-Aldrich) stained preferentially the nucleus and cytoplasm of cells organized in oblong structures located in the dermal compartment of equine skin or wound tissues. These structures were identical in size, shape and location to blood vessels previously identified using immunohistochemical localization of CD31/PECAM-I (*Miragliotta2008*).

It was therefore concluded that the S100A4 antibody stained preferentially the nucleus and cytoplasm of endothelial cells. Consequently the immunofluorescence pattern was used to evaluate the evolution of angiogenesis throughout healing.

No difference was observed in immunofluorescence staining between the normal body and limb skin sections. At week 1, the presence of small blood vessels within the granulation tissue filling the wound bed was observed. There was no difference in

vessel size or shape between wounds. In 4 weeks old wounds, there were large and strongly S100A4-positive oblong vessels with obvious lumen in thoracic and open limb wounds while the vessels in bandaged limb wounds were smaller, with weaker S100A4 staining and no evidence of patent lumen.

DISCUSSION

This study mapped skin temperature, and by extension appraised skin blood flow^{22,23,25} throughout repair of wounds healing by second intention in different anatomic locations in the horse, in an effort to investigate the possibility of impaired tissue perfusion in limb wounds developing EGT.

Both the temporal pattern and the magnitude of skin blood flow differed according to wound location (body vs limb). Immediately following injury, body wounds showed the expected progressive increase in blood flow (Fig 1), both within the surgical site and at the wound periphery, consistent with the vasodilatory response that accompanies the establishment of the inflammatory phase of healing. Interestingly, the increase in temperature during the first 48 hours of healing was almost twice higher at the wound periphery (Fig 3) than in the surgical wound itself (Fig 1). Wounding immediately impairs perfusion at the surgical site due to vascular disruption, while the wound periphery conserves the normal cutaneous microvascular architecture. These functional distinctions may explain the initial differences in temperature observed between the wound site and its periphery. Angiogenesis, initiated by vasodilation³⁷, then proceeds which no doubt explains the progressive temperature equalization observed at the wound site and periphery as healing ensued. Conversely limb wounds, either bandaged or not, demonstrated a transient decrease in skin temperature 48 hours following wounding, both at the wound site (Fig 2) and its periphery (Fig 4), which was followed by a progressive increase. Microvascular architecture is not uniform throughout the mammalian body. While the blood flow response to wounding is predominantly due to vasodilation at NUTR sites, vasoconstrictive responses predominate at AV sites, especially at the beginning of the healing process.^{13,18} All skin injuries affecting the distal limbs of horses tend to bleed profusely immediately following wounding, suggesting an increased number of large diameter arterioles and venules with low resistance and high flow. Consequently, bandaging limb wounds postoperatively for a 24-hour period to control hemorrhage was required in this study, while it was not a prerequisite at body level. While data about anatomic differences in horse skin perfusion are lacking, we postulate that limb

and body skin microvascular architecture may differ, with body skin having a NUTR perfusion profile and limb skin an AV perfusion one. While this statement remains to be confirmed using either functional computed tomography, magnetic resonance imaging³⁸ or photoacoustic microscopy³⁹, it might explain the difference in temperature observed among wound sites as healing commences.

Intriguingly, the delayed increase in temperature following wounding, observed in limb wounds either bandaged or not, was less pronounced in limb (SWt + 10%, WPt + 13.5%) (Fig 2 & 4) than in body wounds (SWt + 16.8%, WPt + 19.7%) (Fig 1 & 3) as healing progressed while angiogenesis conversely appeared more pronounced in limb than in body wounds, as estimated by immunofluorescent marking of endothelial cells. We previously reported a difference in microscopic appearance of granulation tissue at body and limb wound levels, with more pronounced angiogenesis accompanied by greater occlusion of microvessels populating the granulation tissue of limb wounds⁶ consequent to endothelial cell hypertrophy.⁴⁰ We report here that a lower temperature characterizes horse limb wounds which may explain, in part, the difference in tissue oxygen saturation between limb and body wounds in horses¹⁰ but also that tissue perfusion deteriorates in wounds developing EGT. Taken together, these results suggest that blood vessels populating similar wounds located in different anatomic locations may not be equally efficient during the repair process and that vessel functionality may prevail over vessel number to ensure blood perfusion and oxygen delivery in horses, as reported in humans.²¹ These results also imply that limb wounds suffer from a deficient oxygen gradient as a consequence of reduced perfusion during healing. As EGT develops, blood perfusion worsens probably due to increased microvascular occlusion, which exacerbates the pre-existing oxygen gradient deficiency within the wound thus intensifying tissue hypoxia.

Tissue hypoxia is known to impair all wound-healing phases. Indeed, while tissue hypoxia stimulates angiogenesis^{41,42}, it also favors fibroblast proliferation⁴³ and synthesis of ECM components⁴⁴⁻⁴⁶, impairs fibroblast-to-myofibroblast differentiation and myofibroblast function⁴⁷ and prevents fibroblasts from undergoing apoptosis⁴⁸,

all features of EGT. Furthermore, tissue hypoxia is known to enhance expression of transforming growth factor- β ⁴⁹ and its receptors⁴⁶, a fibrogenic cytokine that persists in horse limb wounds⁵⁰, particularly those displaying excessive fibroplasia.⁸

Temperature peaked at week 1, both in the wound site and its periphery, then slightly decreased from week 1 to week 3 in body and limb wounds managed without bandage and healing uneventfully. It is intriguing to note that the temperature at the surgical wound site, but not at the wound periphery, increased again at week 4. Vessel functionality in several wound regions may be significantly impaired until much later in the repair process²¹, which may explain this late increase in blood flow. Partial vascular perfusion may therefore be sufficient for acute wound healing since the normal human cutaneous circulation greatly exceeds the need for tissue nutrition⁵¹, a phenomenon that likely characterizes the cutaneous circulation of most mammals.

Interestingly, only wounds managed with synthetic semi-occlusive bandages developed EGT 7 to 10 days postoperatively as previously reported.^{6,8} Other wounds, at either body or limb level, managed without bandaging healed uneventfully with no EGT at any time during the study. This suggests that synthetic semi-occlusive bandages interfere with the healing process by favoring the development of EGT. Dressings are intended to enhance and support the healing process by decreasing contamination, edema and exudate, and by protecting the wound against movement and further trauma. Moisture but also temperature at the wound site, pH and gaseous exchanges are however altered by dressings⁵², which may perturb normal healing. Although no significant difference in mean TTSt was observed at specific timepoints between open and bandaged limb wounds (Fig 5), a significantly superior mean TTSt in bandaged limb wounds was observed overtime. Normally, increased temperature induced by bandaging should encourage vasodilation by local neural mechanisms as well as local generation of nitric oxide (Kellogg2006), and thus an increase in tissue perfusion. Intriguingly, we observed a dramatic decrease in temperature in limb wounds that developed EGT following bandaging. Consequently, a mechanism other than alteration of microenvironmental temperature must be involved in impairment of

skin wound healing associated with bandaging in horses. Alteration of gaseous exchanges, oxygen especially, in superficial wound tissues, may be the culprit. It is believed that oxygen reaches skin wounds mainly via the bloodstream. However, many studies report that topical oxygenation is useful in cases where hypoxia of the superficial wound tissue is a key limitation to healing.⁵³⁻⁵⁷ Thus, while oxygen delivery to wound tissues most likely is mainly blood-dependent, a small amount of oxygen may be delivered via the superficial layer of the wound and may represent an appreciable amount of oxygen in the wound setting. Interestingly, topical oxygen therapy is associated with superior expression of vascular endothelial growth factor, a signal protein that stimulates angiogenesis, in the tissues at the wound edge.⁵³ By limiting the gaseous exchanges between the wound and its environment, the synthetic semi-occlusive bandages may convert the relative state of tissue hypoxia preexisting in horse limb wounds¹⁰ into a true state of tissue hypoxia with all related consequences.

To our knowledge, this study is the first to map the kinetics of cutaneous wound tissue temperature throughout the normal but also abnormal processes of equine wound healing. The study design did not include remote, control sites to evaluate the potential of widespread systemic vasoregulatory phenomena following wounding. However, the observed changes appeared to be local rather than systemic since specific changes were detected in wounds from different anatomic locations and/or managed in dissimilar fashions. As skin temperature mainly reflects tissue perfusion^{22,23,25}, fluctuations of cell numbers and metabolism throughout repair were not taken into account. Since cell influx and activity are greater in horse limb wounds, especially when EGT develops^{2-4,58,59}, were they considered significant contributors to temperature variations, the differences in tissue perfusion among wound sites observed during the healing process in horses would be even greater than those reported here. Skin thickness and subcutaneous fat may also influence temperature readings. Significant differences in skin thickness, but not in fat content, exist between the cranial costal region ($\pm 255 \mu\text{m}$) and the lateral side of the metacarpal region ($\pm 168 \mu\text{m}$) in horses.⁶⁰ As all wounds showed similar baseline

values, differences in skin thickness were not considered to exert a significant effect on thermal imaging in the current model.

In conclusion, this study offers evidence of significant differences in the kinetics of blood flow during the repair of body and limb wounds in horses. It confirms that lower tissue perfusion afflicts limb wounds throughout the repair process, particularly those characterized by excessive fibroplasia. Furthermore, data generated by this investigation impart novel information regarding the mechanisms whereby EGT develops within limb wounds as well as those whereby bandages may affect the skin wound healing process.

Further studies should verify the presence of greater hypoxia within limb wounds developing EGT. The dosage of Hypoxia-Inducible Factor- α would be of great interest to estimate tissue hypoxia levels as healing proceeds normally or not. Likewise, an attempt should be made to elucidate the cause of such differences. Studies of the exact anatomy of equine skin microvasculature appear mandatory. Such information might then provide a basis for the development of appropriate, targeted therapies including therapeutic bandages to prevent and treat excessive fibroplasia in equine wounds.

ACKNOWLEDGMENTS

Bandage materials were generously donated by Covidien Canada. The authors thank Dr. Derek Boerboom, from the University of Montreal, for the use of immunofluorescence microscopy, the University of Prince Edward Island for the loan of the ThermaCAM SC2000, Dr. Guy Beauchamp for statistical analysis as well as Dr. Julie Ferland and Céline Forget for technical assistance.

REFERENCES

1. Wilmink JM, van Herten J, van Weeren PR, Barneveld A: Retrospective study of primary intention healing and sequestrum formation in horses compared to ponies under clinical circumstances. *Equine Vet J* 2002; 34:270-273
2. Wilmink JM, van Weeren PR: Second-intention repair in the horse and pony and management of exuberant granulation tissue. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2005; 21:15-32
3. Wilmink JM, Stolk PW, van Weeren PR, Barneveld A: Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopic aspects. *Equine Vet J* 1999; 31:53-60
4. Wilmink JM, van Weeren PR, Stolk PW, Van Mil FN, Barneveld A: Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. *Equine Vet J* 1999; 31:61-67
5. Ducharme-Desjarlais M, Celeste C, Lepault L, Theoret CL: Effect of a silicone-containing dressing on exuberant granulation tissue formation and repair in horses. *Am J Vet Res* 2005; 66:1133-1139
6. Lepault E, Celeste C, Doré M, Martineau D, Theoret CL: Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse. *Wound Repair Regen* 2005; 13:520-529
7. Berry DB, 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
8. Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, Gordon JR: Preliminary observations on expression of transforming growth factors beta1 and beta3 in equine full-

thickness skin wounds healing normally or with exuberant granulation tissue.
Vet Surg 2002; 31:266-273

9. Guo S, DiPietro LA: Factors affecting wound healing. J Dent Res 2010; 89:219-229
10. Celeste CJ, Deschene K, Riley CB, Theoret CL: Regional differences in wound oxygenation during normal healing in an equine model of cutaneous fibroproliferative disorder. Wound Repair Regen 2011; 19:89-97
11. Sen CK. Wound healing essentials: Let there be oxygen. Wound Repair Regen 2009; 17:1-18
12. Hopf HW, Rollins MD. Wounds: an overview of the role of oxygen. Antioxid Redox Signal 2007; 9:1183-1192
13. Rendell MS, Milliken BK, Finnegan MF, Finney DA, Healy JC: The skin blood flow response in wound healing. Microvasc Res 1997; 53:222-234
14. Zweifach BW, Lipowsky HH: Pressure-flow relations in blood and lymph microcirculation, in Renkin EM, Miche CC, Geiger SR (eds): Handbook of Physiology. The Cardiovascular System. Oxford, UK, Oxford Univ Press, 1987, pp 251-308
15. Popoff N: The digital vascular system. Arch Pathol 1934; 18:295-330
16. Rowell L: Reflex control of the cutaneous vasculature. J Invest Dermatol 1959; 69:154-166

17. Hales JRS, Jessen C, Fawcett AA, King RB: Skin AVA and capillary dilation and constriction induced by local skin heating. *Pflug Archiv* 1985; 404:203-207
18. Rendell MS, Johnson ML, Smith D, Finney D, Capp C, Lammers R, Lancaster S: Skin blood flow response in the rat model of wound healing: expression of vasoactive factors. *J Surg Res* 2002; 107:18-26
19. Rendell MS, Bamisedun O: Diabetic cutaneous microangiopathy. *Am J Med* 1992; 93:611-618
20. Evans E, Rendell M, Bartek J, Connor S, Bamisedun O, Dovgan D, Giiter M: Thermally induced cutaneous vasodilatation in aging. *J Gerontol Med Sci* 1993; 48:53-57
21. Bluff JE, O'Ceallaigh S, O'Kane S, Ferguson MW, Ireland G: The microcirculation in acute murine cutaneous incisional wounds show a spatial and temporal variation in the functionality of vessels. *Wound Repair Regen* 2006; 14:434-442
22. Head MJ, Dyson S: Talking the temperature of equine thermography. *Vet J* 2001; 162:166-167
23. Schlager O, Gschwandtner ME, Herberg K, Forhner T, Schillinger M, Koppensteiner R, Mlekusch W: Correlation of infrared thermography and skin perfusion in Raynaud patients and in healthy controls. *Microvasc Res* 2010; 80:54-57

24. Xu RX, Huang K, Qin R, Huang J, Xu JS, Ding L, Gnyawali US, Gordillo GM, Gnyawali SC, Sen CK: Dual-mode imaging of cutaneous tissue oxygenation and vascular function. *J Vis Exp* 2010; 8:1-8
25. Pascoe DD, Mercer JB, deWeerd L: Physiologies of thermal signals, in Diakides NA, Bonzimo JD (eds): *The Biomedical Engineering Handbook* 3rd edition; New York, NY, CRC press Taylor & Francis, 2006, pp 1-20
26. Manley DM, Xiang B, Kupriyanov VV: Visualization and grading of regional ischemia in pigs in vivo using near-infrared and thermal imaging. *Can J Physiol Pharmacol* 2007; 85:382-395
27. Merla A, Di Romualdo S, Di Donato L, Proietti M, Salsano F, Romanii GL: Combined thermal and laser Doppler imaging in the assessment of cutaneous tissue perfusion. In *Proceedings of the 29th Annual International Conference of the IEEE EMBS, Cité Internationale, Lyon, France, August 23-26, 2007*, pp 2630-2633
28. Murray AK, Moore TL, Manning JB, Taylor C, Griffiths CE, Herrick AL: Noninvasive imaging techniques in the assessment of scleroderma spectrum disorders. *Arthritis Rheum* 2009; 61:1103-1111
29. Zaproudina N, Varmavuo V, Airaksinen O, Närhi M: Reproducibility of infrared thermography measurements in healthy individuals. *Physiol Meas* 2008; 29:515-524
30. Levet T, Martens A, Devisscher L, Duchateau L, Bogaert L, Vlaminck L: Distal limb cast sores in horses: risk factors and early detection using thermography. *Equine Vet J* 2009; 41:18-23

31. Autio E, Neste R, Airaksinen S, Heiskanen ML: Measuring the heat loss in horses in different seasons by infrared thermography. *J Appl Anim Welf Sci* 2006; 9:211-221
32. Bergh A, Nyman G, Lundeberg T, Drevemo S: Effect of defocused CO2 laser on equine perfusion. *Acta Vet Scand* 2006; 47:33-4
33. Cornelisse CJ, Robinson NE, Berney CA, Eberhart S, Hauptman JE, Derksen FJ: Thermographic study of in vivo modulation of vascular responses to phenylephrine and endothelin-1 by dexamethasone in the horse. *Equine Vet J* 2006; 38:119-126
34. Simon EL, Gaughan EM, Epp T, Spire M. Influence of exercise on thermographically determined surface temperatures of thoracic and pelvic limbs in horses. *J Am Vet Med Assoc* 2006; 15:1940-1944
35. Tunley Bv, Henson FM: Reliability and repeatability of thermographic examination and the normal thermographic image of the thoracolumbar region in the horse. *Equine Vet J* 2004; 36:306-312
36. Deschene K, Celeste CJ, Boerboom D, Theoret CL: Constitutive expression of HIF1A in keratinocytes during the repair of skin wounds in horses. *Wound Repair Regen* 2011; (in press)
37. Carmeliet P: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6:389-395
38. Kemmling A, Duning T, Lemcke L, Nierdstadt T, Minnerup J, Wersching H, Marziniak M: Case report of MR perfusion imaging in sinking flap syndrome: growing evidence for hemodynamic impairment. *BMC Neurol* 2010; 10:80

39. Favazza CP, Jassim O, Cornelius LA, Wang LV: In vivo photoacoustic microscopy of human cutaneous microvasculature and a nevus. *J Biomed Opt* 2011; 16: 15-19
40. Dubuc V, Lepault E, Theoret CL: Endothelial cell hypertrophy is associated with microvascular occlusion in horse wounds. *Can J Vet Res* 2006; 70:206-210
41. Semenza GL: Regulation of hypoxia-induced angiogenesis: a chaperone escorts VEGF to the dance. *J Clin Invest* 2001; 108:39-40
42. Shih SC, Claffey KP: Role of AP-1 and HIF-1 transcription factors in TGF-beta activation of VEGF expression. *Growth Factors* 2001; 19:19-34
43. Tandara AA, Mustoe TA: Oxygen in wound healing – more than a nutrient. *World J Surg* 2004; 28:294-300
44. Falanga V, Zhou L, Yufit T: Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF-beta1. *J Cell Physiol* 2002; 191:42-50
45. Falanga V, Kirsner RS: Low oxygen stimulates proliferation of fibroblasts seeded as single cells. *J Cell Physiol* 1993; 154:506-510
46. Falanga V, Qian SW, Danielpour D, Katz MH, Roberts AB, Sporn MB: Hypoxia upregulates the synthesis of TGF-beta 1 by human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1991; 97:634-637

47. Modaressi A, Pietramaggiore G, Godbout C, Vigato E, Pittet B, Hinz B: Hypoxia impairs skin myofibroblast differentiation and function. *J Invest Dermatol* 2010; 130:2818-2817
48. Saed MG, Diamond MP. Apoptosis and proliferation of human peritoneal fibroblasts in response to hypoxia. *Fertil Steril* 2002; 78:137-143
49. Häkkinen L, Westermarck J, Kähäri VM, Larjava H: Human granulation-tissue fibroblasts show enhanced proteoglycan gene expression and altered response to TGF-beta 1. *J Dent Res* 1996; 75:1767-1768
50. Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, Gordon JR. Expression of transforming growth factor beta(1), beta(3) and basic fibroblast growth factor in full-thickness skin wounds of equine limbs and thorax. *Vet Surg* 2001; 30:269-277
51. Hopf HW: Development of subcutaneous wound oxygen measurement in humans: contributions of Thomas K Hunt, MD. *Wound Repair Regen* 2003; 11:424-430
52. Knottenbelt DC: Basic wound management, in Knottenbelt DC (ed): *Handbook of equine wound management*; London, UK, Saunders, 2003, pp 54-73
53. Gordillo GM, Roy S, Khanna S, Schlanger R, Khandelwal S, Phillips G, Sen CK: Topical oxygen therapy induces vascular endothelial growth factor expression and improves closure of clinically presented chronic wounds. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35:957-964

-
54. Davis SC, Cazzaniga AL, Ricotti C, Zalesky P, Hsu LC, Creech J, Eaglstein WH, Mertz PM: Topical oxygen emulsion: a novel wound therapy. *Arch Dermatol* 2007; 143:1252-1256
 55. Fries RB, Wallace WA, Roy S, Kuppusamy P, Bergdall V, Gordillo GM, Melvin WS, Sen CK: Dermal excisional wound healing in pigs following treatment with topically applied pure oxygen. *Mutat Res* 2005; 579:172-181
 56. Said HK, Hijawi J, Roy N, Mogford J, Mustoe T: Transdermal sustained-delivery oxygen improves epithelial healing in a rabbit ear wound model. *Arch Surg* 2005; 140:998-1004.
 57. Kalliainen LK, Gordillo GM, Schlanger R, Sen CK: Topical oxygen as an adjunct to wound healing: a clinical case series. *Pathophysiology* 2003; 9:81-87
 58. Wilmlink JM: Differences in wound healing between horses and ponies, in Stashak TD, Theoret CL (eds): *Equine wound management 2nd ed*; Ames, IO, Wiley-Blackwell 2008, pp 29-46
 59. Theoret CL: Wound repair: problems in the horse and innovative solutions, in Stashak TD, Theoret CL (eds): *Equine wound management 2nd ed*; Ames, IO, Wiley-Blackwell 2008, pp 47-68
 60. Wakuri H, Mutoh K, Ichikawa H, Liu B: Microscopic anatomy of the equine skin with special reference to the dermis. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1995; 72:177-183

FIGURE & PHOTO LEGENDS

IMAGE 1: Thermal image at wound site (body) with delineated superimposed regions of interest.

SWt = mean temperature / Surgical Wound

WPt = mean temperature / Wound Periphery

TTSt = mean temperature / Total Surgical Site

FIGURES 1 to 5

Evolution of mean temperatures throughout healing at surgical wound (1 & 2), at wound periphery (3 & 4) and for the total surgical site (5), extracted from thermal imaging data.

Section A represents the preoperative time (or day 0).

Section B represents the early period of the healing process (from injury to day 4), which encompasses the hemostatic and inflammatory phases of healing.

Section C represents the late period of the healing process (from week 1 to week 4), which regroups the proliferative and remodeling phases of healing.

Values are mean \pm SEM

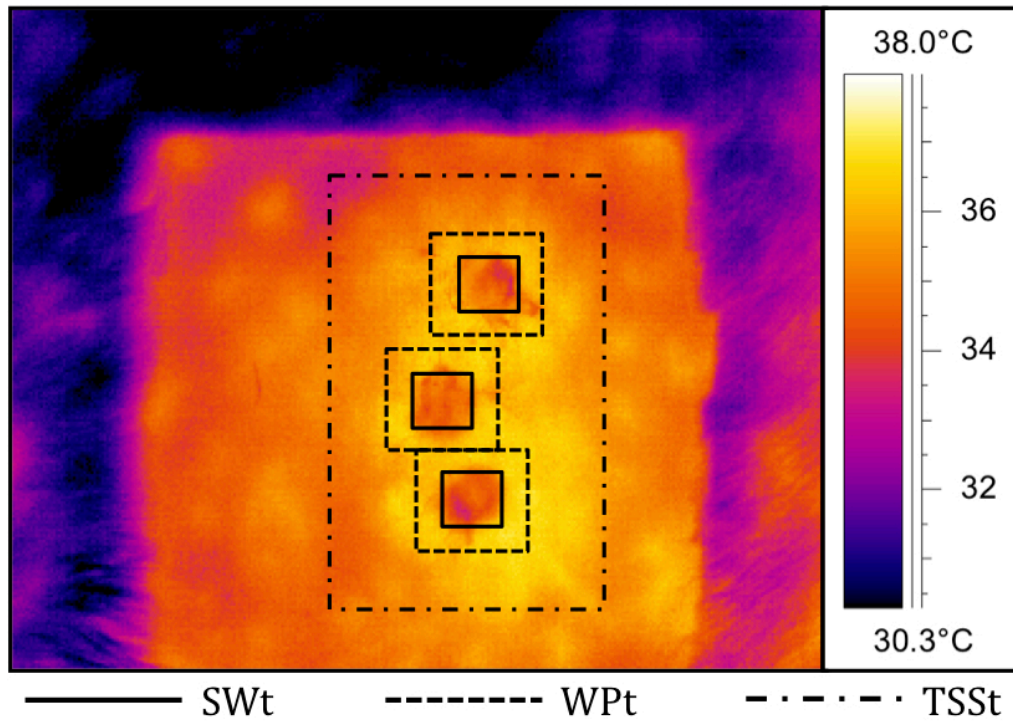
* : comparison between wound sites – open body versus open limb (1, 3 & 5) / open limb versus bandaged limb (2, 4 & 5) – $p < 0.05$

: comparison over time – either open body (ob) or open limb (ol) or bandaged limb (bl) with value at PreOP considered as the reference value for 24h to 1wk and value at 1wk considered as the reference value for 2wk to 4wk – $p < 0.05$

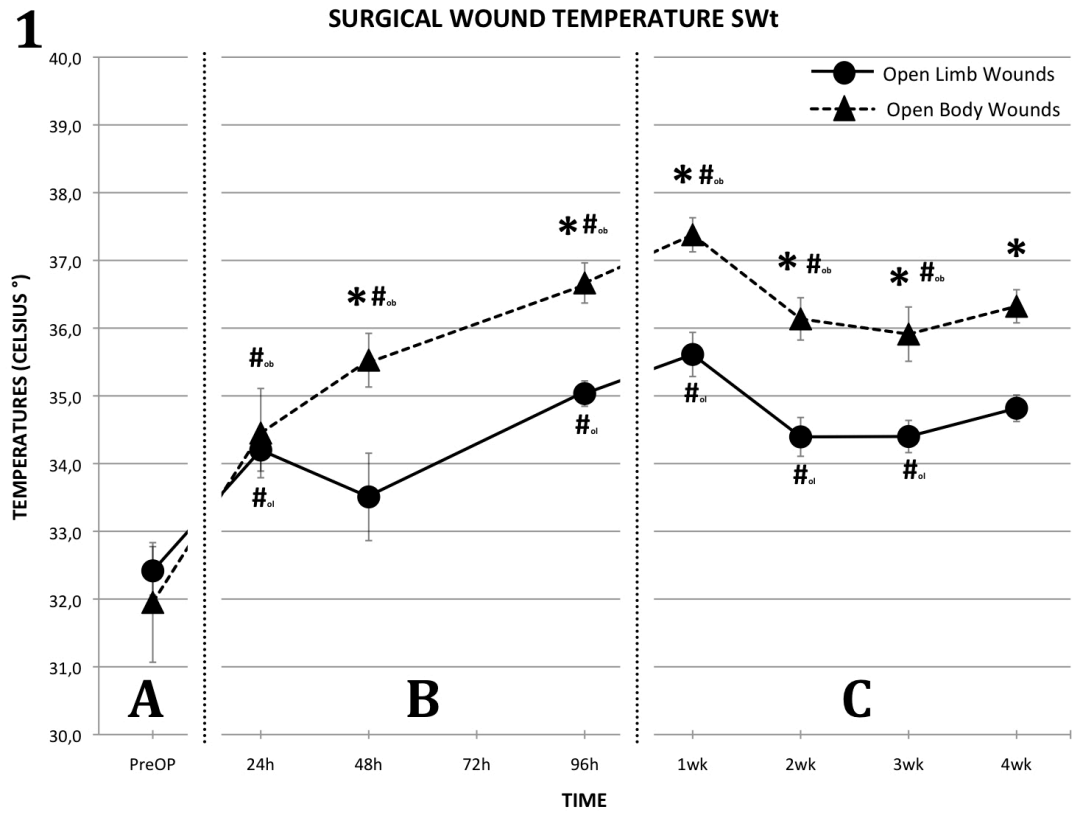
FIGURES 6 to 8

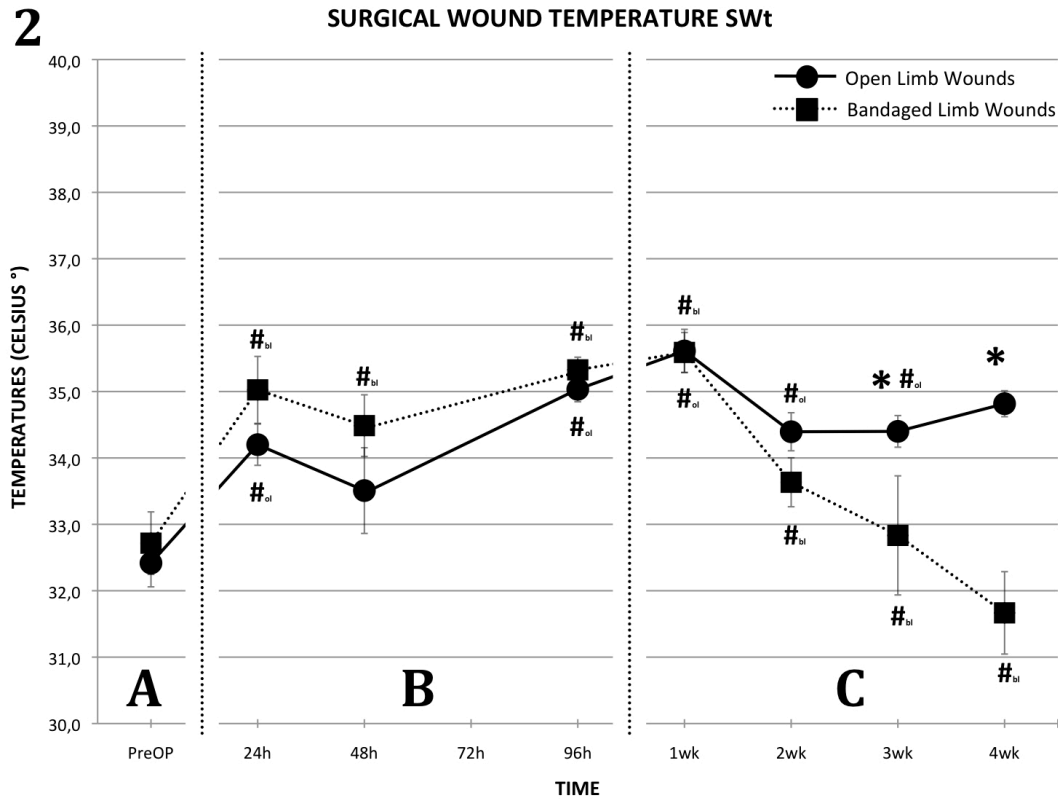
Immunofluorescence staining of cells in tissue sections (PreOp or day 0 – normal skin / weeks 1 and 4 post-wounding – granulation tissue) for protein S100A4 (red – rhodamine) and nuclei (blue) was used to evaluate qualitatively the evolution of angiogenesis.

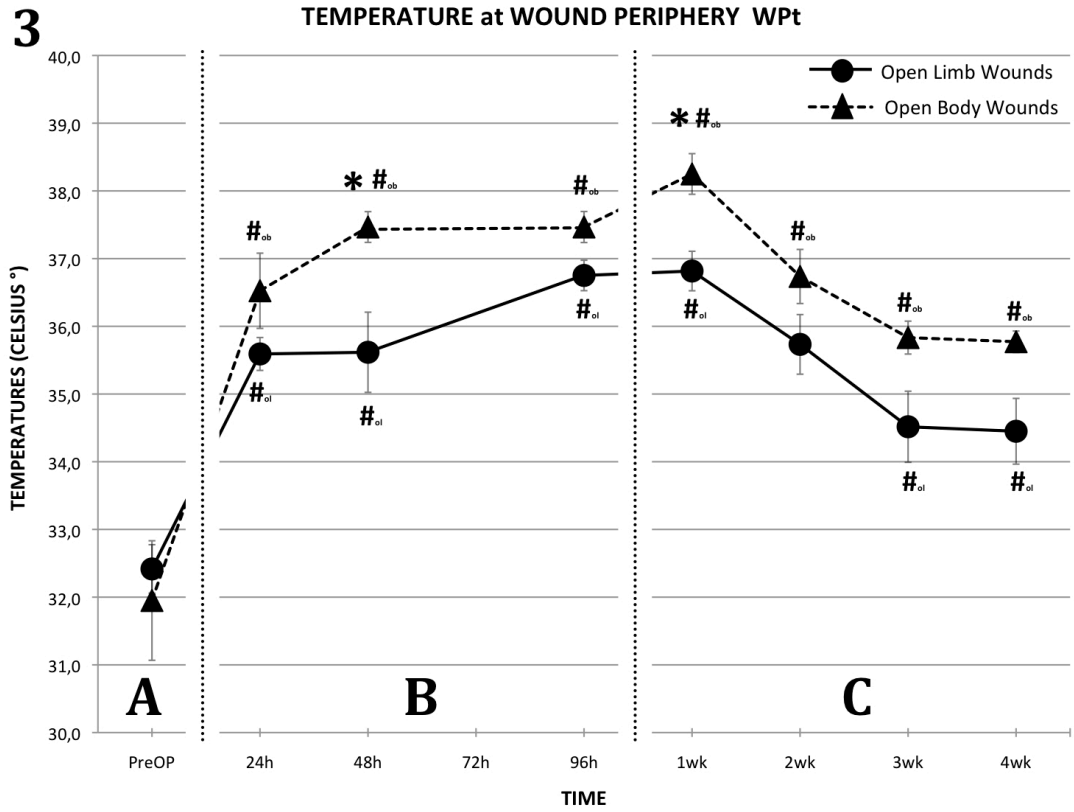
IMAGE 1

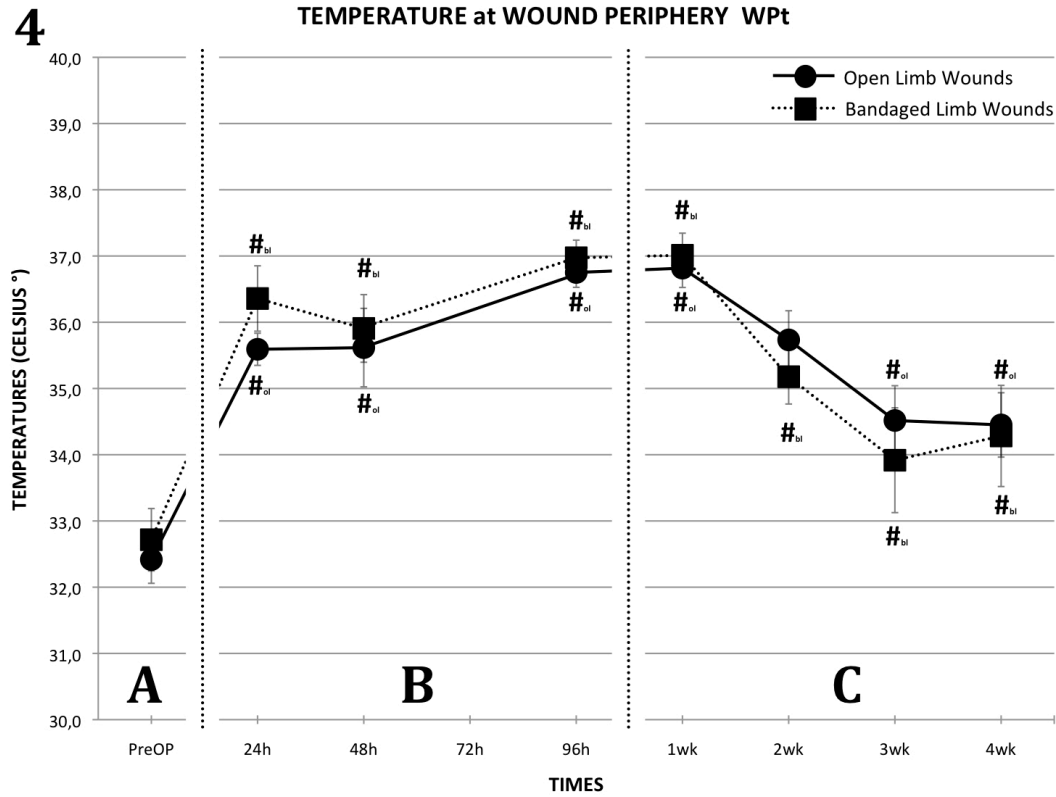


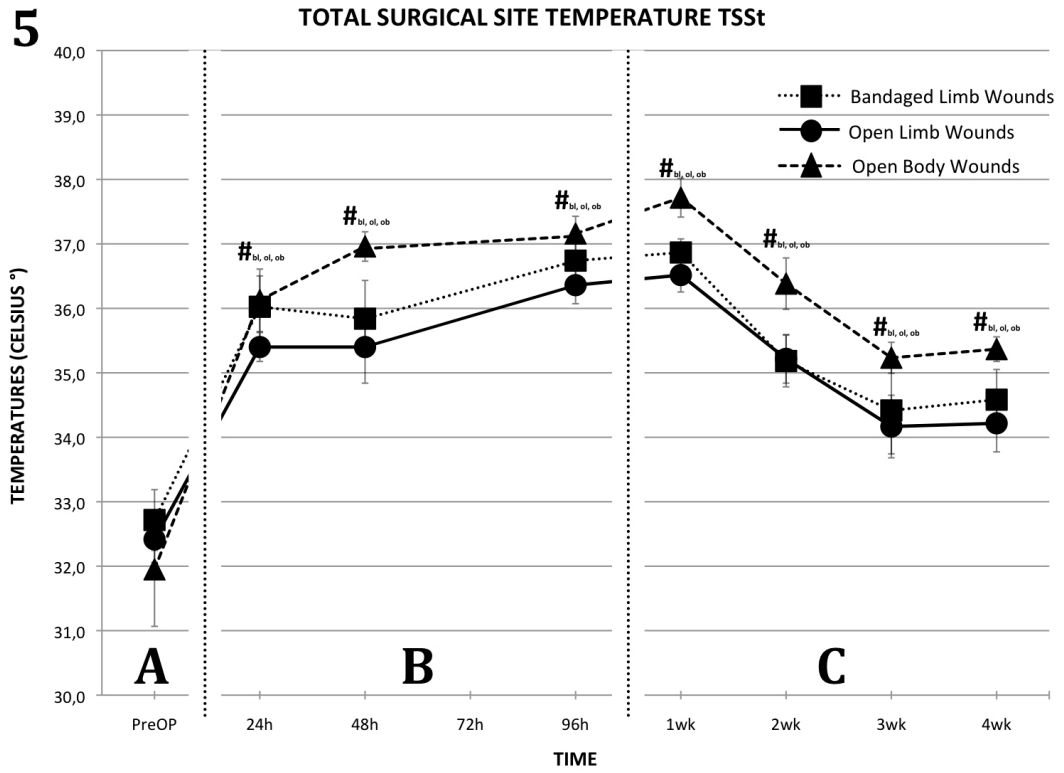
FIGURES

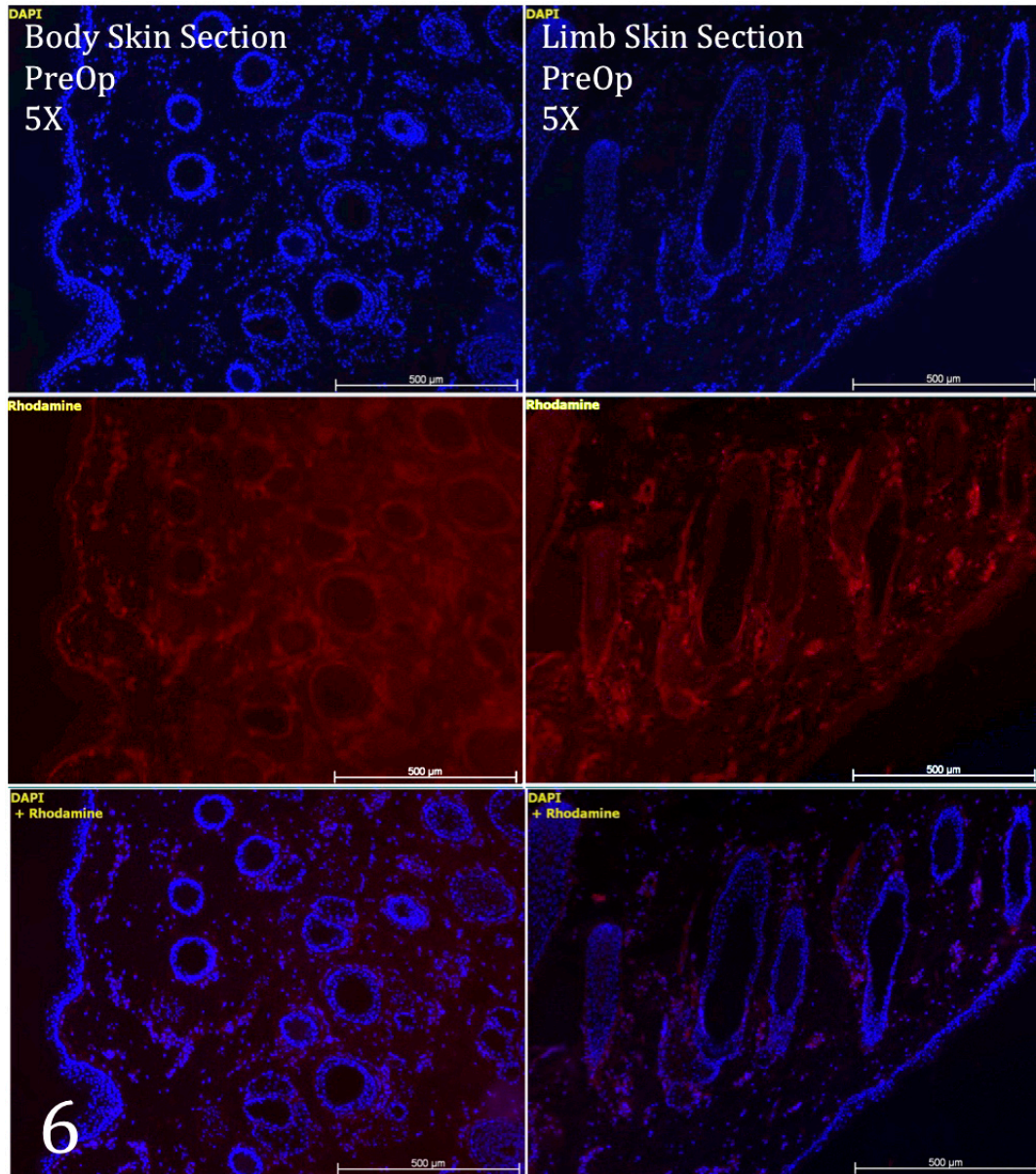


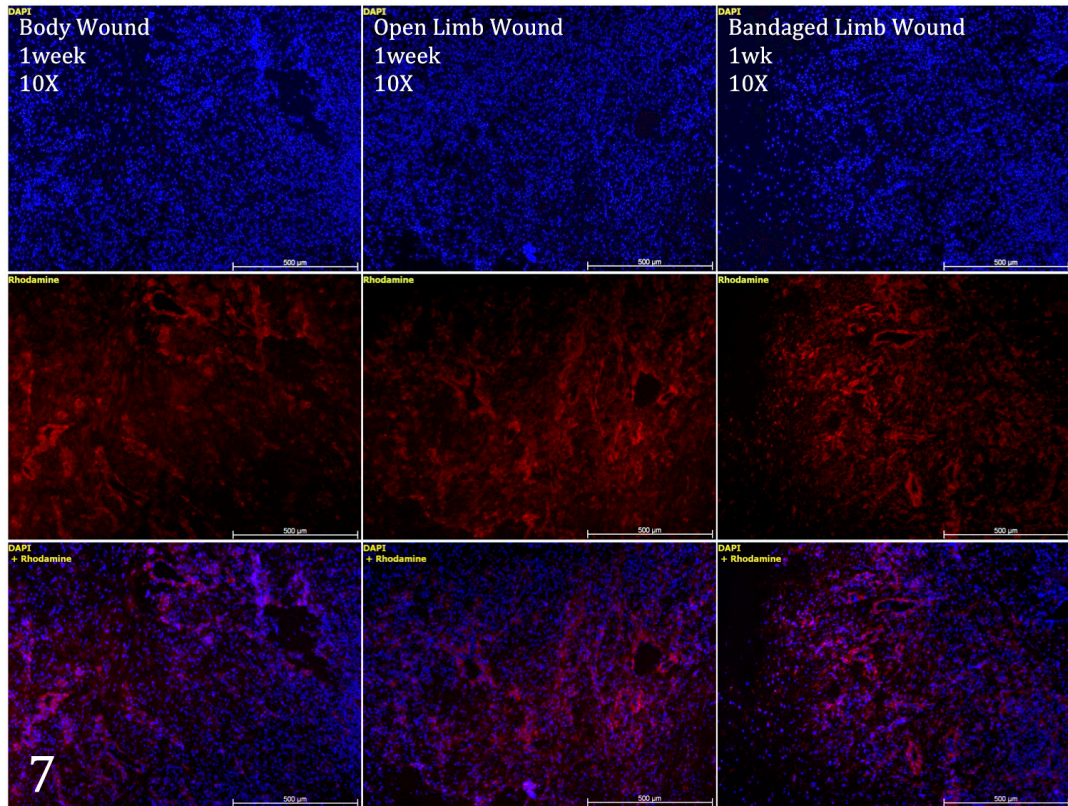


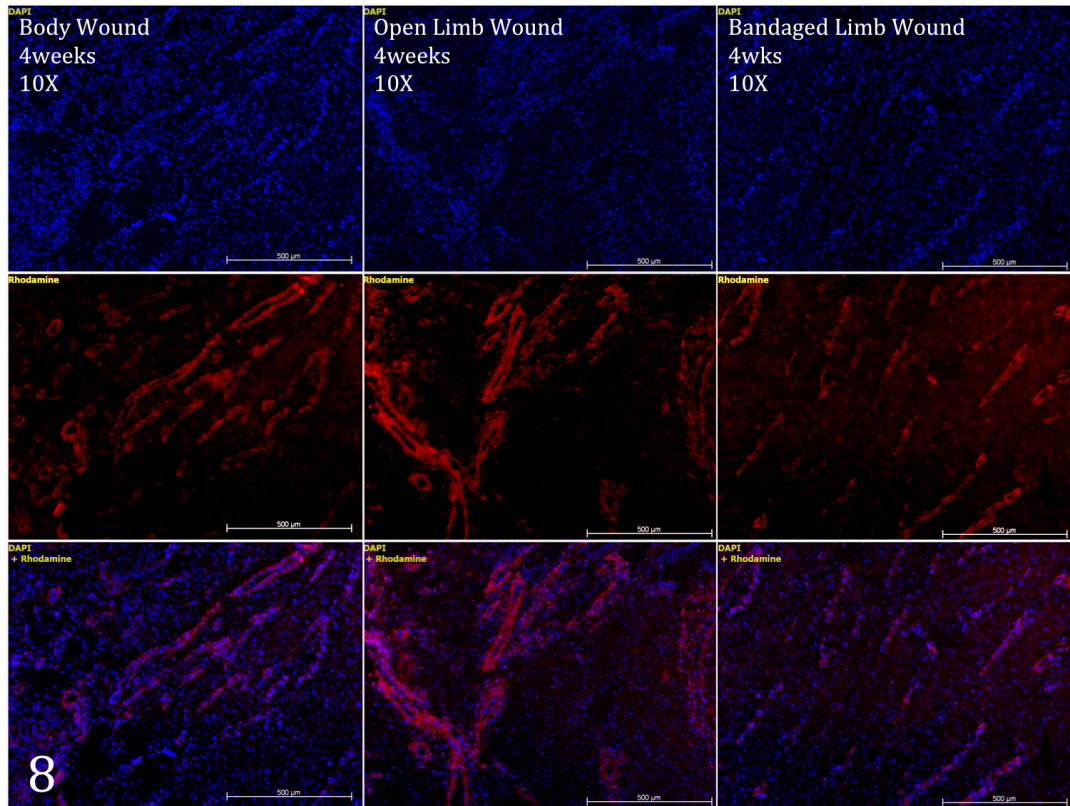












DISCUSSION GÉNÉRALE

A – DISCUSSION SUR LES ÉTUDES RÉALISÉES

A / 1 – Discussion autour des résultats obtenus

La cicatrisation cutanée pathologique chez le cheval se rencontre principalement au niveau appendiculaire. Elle se caractérise par une perturbation des phases inflammatoire, proliférative et de remodelage de la guérison tissulaire, tel que décrit, et se manifeste par un retard de cicatrisation et le développement d'un TGE (*Theoret2008 ; Wilmink2008*). Lepault a rapporté l'existence d'une plus grande occlusion des microvaisseaux dans le tissu de granulation des plaies appendiculaires chez le cheval (*Lepault2005*), suggérant un possible manque d'O₂. Le manque d'O₂ perturbe le bon déroulement de la guérison tissulaire en altérant les phases inflammatoire, proliférative et de remodelage de celle-ci (*Guo2010 ; Modaressi2010 ; Schreml2010 ; Sen2009 ; Bosco2008 ; Rodriguez2008 ; Hopf2007 ; Bosco2006 ; Hopf2005 ; Tandara2004*), à l'image de ce qui est observé au niveau appendiculaire chez le cheval.

Partant de ces constats, (1) nous avons posé les hypothèses que la disponibilité locale en O₂ et la perfusion tissulaire diffèrent selon la localisation anatomique de la plaie et dans le temps pendant la cicatrisation cutanée chez le cheval, et (2) nous nous sommes fixés les objectifs de mesurer, par des méthodes physiques d'évaluation, non invasives, la disponibilité tissulaire locale en oxygène (par NIRS) et la perfusion tissulaire (par ThIR) de plaies cutanées, chirurgicalement créées dans des sites anatomiques distincts (corps *versus* membre), lors de leur cicatrisation par seconde intention, dans un contexte normal et pathologique.

Nous rapportons :

(1) une meilleure perfusion tissulaire (ThIR) associée à une plus grande disponibilité de l'O₂ dans les plaies thoraciques (NIRS), en début de guérison tout particulièrement. L'œdème plus important qui se développe au niveau appendiculaire (observation clinique ObsCli (*Annexe IV : Évolution clinique des plaies étudiées*)), probable conséquence de l'accumulation sanguine qui y est constatée (NIRS), perturbe certainement la perfusion tissulaire des plaies appendiculaires (ThIR) et participe vraisemblablement à l'hypoxie tissulaire relative (NIRS) que l'on y observe. Cette

hypoxie pourrait perturber la phase inflammatoire de la guérison au niveau appendiculaire, tel que décrit (*Wilmink1999a ; Wilmink1999b*) et être à l'origine de perturbations directes ou indirectes des phases prolifératives et de remodelage (*Theoret2008 ; Wilmink2008*).

(2) une perfusion tissulaire des plaies appendiculaires inférieure à celle des plaies thoraciques, qui se détériore de façon significative lorsqu'un TGE se développe (ThIR). Une angiogenèse plus importante, accompagnée d'une plus grande occlusion microvasculaire, ont été rapportées au niveau appendiculaire (*Lepault2005*). La fonctionnalité des vaisseaux présents au sein des tissus de granulation chez le cheval tend donc à prévaloir sur leur nombre pour assurer la perfusion tissulaire et l'apport d'O₂. Une détérioration de la perfusion tissulaire accompagne le développement du TGE (ThIR). Cette détérioration, vraisemblablement consécutive à une plus grande occlusion microvasculaire, pourrait exacerber la déficience en O₂ constatée au niveau appendiculaire, intensifier l'hypoxie présente, et perturber davantage la cicatrisation cutanée à ce niveau.

(3) une diminution progressive de la disponibilité de l'O₂ dans les plaies (NIRS), plus marquée au niveau appendiculaire, au fur et à mesure que la guérison progresse, malgré une perfusion tissulaire restant plus élevée que la normale (ThIR). Une activité cellulaire intense caractérise la phase tardive de la guérison, à l'origine probable d'une grande consommation d'O₂. La cicatrisation cutanée étant retardée et la phase inflammatoire prolongée au niveau appendiculaire (ObsCli) (*Wilmink1999a ; Wilmink1999b*), il apparaît plausible qu'il y ait plus de cellules métaboliquement actives au niveau appendiculaire que thoracique dans la phase tardive de la guérison, si un TGE se développe tout particulièrement, à l'origine d'une plus grande consommation d'O₂ au niveau appendiculaire et d'une hypoxie relative.

(4) une accentuation du caractère pathologique de la cicatrisation cutanée appendiculaire par l'utilisation de bandages synthétiques semi-occlusifs. Nous constatons que l'utilisation de bandages au niveau appendiculaire s'accompagne du développement systématique de TGE au sein des plaies (ObsCli). Les bandages altèrent l'humidité, la température, le pH et les échanges gazeux des plaies avec leur environnement (*Knottenbelt2003*). Ces altérations pourraient expliquer les perturbations

cicatricielles observées lors de leur utilisation. L'administration topique d'O₂, bien que d'un effet thérapeutique limité, a été rapportée comme étant bénéfique aux plaies souffrant d'hypoxie superficielle (Gordillo2008 ; Davis2007 ; Fries2005 ; Said2005 ; Kalliainen2003). L'utilisation de bandages pourrait, à l'inverse, aggraver l'hypoxie relative constatée au niveau appendiculaire chez le cheval, et ainsi perturber davantage la cicatrisation cutanée à ce niveau.

Lorsque combinées, nos études permettent de conclure qu'il existe :

- (1) des différences à la fois temporelles et spatiales de disponibilité locale en O₂ (NIRS) (Celeste2011a) et de perfusion tissulaire (ThIR) (Celeste2011b), donc d'oxygénation tissulaire, au niveau de la peau du cheval, pendant la cicatrisation cutanée de plaies créées chirurgicalement ;
- (2) une hypoxie tissulaire relative, chronique, au niveau des plaies cutanées appendiculaires ;
- (3) un retard de cicatrisation au niveau des plaies cutanées appendiculaires, compliqué du développement d'un TGE lorsque des bandages synthétiques semi-occlusifs sont utilisés dans la gestion de ces dites plaies.

A / 2 – Limites des études réalisées

Les plaies étudiées, de petite taille, de pleine épaisseur et chirurgicalement créées, apparaissent peu représentatives des plaies que nous rencontrons couramment en pratique équine, qui sont, en règle générale (1) d'épaisseur cutanée variable ; (2) de profondeur tissulaire variable ; (3) de taille variable (il est rare de rencontrer d'aussi petites plaies cutanées chez le cheval, un animal coutumier des réactions de panique, et, habitué à fuir ; (4) mixtes (il n'est pas rare qu'au sein d'une même plaie se rencontrent des sections cutanées franches, des déchirures cutanées anarchiques, des écrasements tissulaires) ; (5) fortement contaminées si ce n'est infectées au moment de leur examen ; (6) déjà médicamenteuses (les propriétaires des chevaux blessés auront souvent utilisé un grand nombre d'onguents, de poudres, de bandages avant de faire appel à un vétérinaire équin).

Le modèle utilisé permet cependant de reproduire ce qui est couramment observé en pratique équine, à savoir une guérison cutanée rapide des plaies corporelles, une guérison cutanée retardée des plaies appendiculaires, souvent compliquée par le développement d'un TGE. A ce titre, le modèle utilisé apparaît tout à fait adapté à l'étude de la cicatrisation cutanée normale et pathologique chez le cheval, tel que rapporté (*Dubuc2006 ; Lepault2005 ; DeMartin2004 ; Theoret2002a ; Theoret2002b ; Theoret2001 ; Wilmink1999a ; Wilmink1999b*).

Des données de référence (T0) manquent dans nos résultats de NIRS, conséquence de l'abondante pigmentation cutanée des chevaux utilisés. Les pigments corporels, la mélanine et l'Hb en particulier, altèrent de façon significative l'absorption et la dispersion des ondes lumineuses utilisées en NIRS (*Ward2006*). Cette méthode d'évaluation de la disponibilité locale en oxygène s'avère donc non utilisable sur la peau intacte pigmentée du cheval ou lors de saignements (*Kohlenberg2005*), tels ceux observés suite à la création des plaies cutanées. Des chevaux blancs, ou possédant des taches blanches, auraient pu être utilisés. Les régions dépigmentées du cheval sont cependant plus susceptibles aux maladies cutanées, telles les vasculites (*White2009*), qui perturbent le processus de cicatrisation cutanée; la validité de nos résultats aurait pu être affectée. Notre objectif, en utilisant la NIRS, étant d'établir une éventuelle différence de disponibilité locale en O₂ entre des sites anatomiques distincts pendant la cicatrisation, et non de déterminer des valeurs de référence pour le cheval, ne pas disposer de données de référence ne représentait pas un handicap en soi.

Des données de référence établies tout au long de nos études dans des sites anatomiques distants non manipulés manquent aussi, qui auraient permis d'évaluer les fluctuations de perfusion microvasculaire et de disponibilité locale en oxygène cutanées au cours du temps. Les changements observés apparaissent cependant plus locaux que systémiques, puisque des changements spécifiques ont été observés au sein des différentes plaies cutanées étudiées, tant en cicatrisation normale que pathologique. L'obtention de telles données, bien que d'intérêt, ne semblait donc pas requise à la bonne interprétation des résultats obtenus.

Les valeurs de disponibilité locale obtenues par NIRS diffèrent de celles obtenues par d'autres méthodes d'évaluation de la disponibilité locale en O₂. Ces méthodes s'intéressent, en règle générale, à la disponibilité veineuse ou artérielle en O₂. La NIRS donne un estimé de la disponibilité globale en O₂ au sein du tissu étudié, à travers artérioles, capillaires et veinules (*Thorn2009*), ce qui explique probablement les différences observées. Les algorithmes utilisés, qui plus est, n'ont pas été établis pour le cheval mais pour d'autres mammifères, tel l'Homme, le lapin ou le porc, ce qui pourrait aussi être à l'origine des différences observées.

La température cutanée reflète principalement la perfusion microvasculaire cutanée (*Schlager2010 ; Pascoe2006 ; Head20010*). Le métabolisme cellulaire, ainsi que la fluctuation du nombre de cellules métaboliquement actives, qui n'ont pas été pris en compte dans nos interprétations des thermogrammes obtenus pourraient aussi influencer. L'activité cellulaire apparaît plus importante dans les plaies appendiculaires, en particulier dans celles développant des TGE (*Wilmink2008 ; Theoret2008 ; Wilmink2005 ; Wilmink1999a,b*). Si une telle activité avait été prise en compte et considérée comme significative dans la genèse des variations de température cutanée observées, les différences de perfusion microvasculaire rapportées entre les différentes plaies étudiées auraient été encore plus significatives que celles que nous rapportons.

L'épaisseur cutanée, ainsi que la couche graisseuse sous-cutanée, peuvent influencer l'obtention des thermogrammes. Tel qu'il a été décrit, il existe des différences significatives d'épaisseur cutanée entre la paroi costale ($\pm 255 \mu\text{m}$) et l'aspect latéral distal des membres thoraciques ($\pm 168 \mu\text{m}$) chez le cheval, mais aucune différence d'épaisseur de la couche graisseuse n'a été rapportée (*Wakuri1995*). Les données thermographiques de référence (T0) de toutes les plaies étudiées étant similaires, les variations d'épaisseur cutanée entre les sites anatomiques étudiés ne semblent pas avoir affecté l'obtention de thermogrammes interprétables.

Le choix des anticorps pour réaliser des analyses de biologie moléculaire chez le cheval est un problème majeur. Très peu d'anticorps mono / polyclonaux spécifiques au cheval sont commercialement disponibles. Le choix de l'anticorps polyclonal lapin

HPA007973 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) visant la protéine humaine S100A4 pour réaliser des études d'immunofluorescence a été un choix de dernier recours. Plusieurs anticorps spécifiques des cellules endothéliales ont été au préalable essayés sans succès (anticorps polyclonal caprin, lapin PECAM1/CD31, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA); anticorps monoclonal murin PECAM1/CD31 (Dako Canada, Inc. Burlington, ON, CAN). Des tests non fructueux ont aussi été réalisés avec les lectines de *Lycopersicon esculentum* (tomate). L'anticorps polyclonal lapin PECAM1/CD31 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) avait été utilisé avec succès en immunohistochimie et en transfert Western pour suivre l'angiogenèse de plaies appendiculaires et thoraciques similaires chez le cheval (*Miragliotta2008a*), pendant leur guérison, dans notre laboratoire. Aucun signal n'a pu être obtenu avec l'utilisation de cet anticorps en immunofluorescence cependant. La coexpression de S100A4 et de CD31 dans les cellules endothéliales étant rapportée (*Zeisberg2008*), la distribution de S100A4 en immunofluorescence étant en tout point similaire à celle de CD31 en immunohistochimie (*Miragliotta2008a*), les structures identifiées par S100A4 étant des structures tubulaires oblongues avec lumière (image caractéristique des vaisseaux sanguins dans un tissu de granulation), il a été décidé d'utiliser l'anticorps polyclonal lapin HPA007973 pour suivre de façon qualitative l'angiogenèse des plaies appendiculaires et thoraciques dans notre étude sur la perfusion tissulaire.

Ainsi, même si le modèle d'étude et les méthodes d'évaluation de la perfusion microvasculaire et de la disponibilité locale en oxygène présentent des limites, ces limites ne semblent pas avoir influé de façon significative sur les résultats obtenus, ni remettre en question la validité de ces résultats.

B – DISCUSSION SUR DE POTENTIELS AXES DE RECHERCHE

B / 1 – Fonctionnalité du réseau microvasculaire et variations anatomiques vasculaires et microvasculaires

La fonctionnalité du réseau microvasculaire cutané n'ayant pas été évaluée dans les études présentées, il est impossible de conclure sur la cause exacte de la différence spatiale d'oxygénation tissulaire observée. Le cheval étant un mammifère, il apparaît plus que probable que la moindre oxygénation tissulaire observée au niveau des plaies appendiculaires soit d'origine anatomique, tel que rapporté chez d'autres mammifères (*Hopf2007 ; Rendell 2002 ; Rendell1997 ; Evans1993 ; Rendell1992 ; Zweifach1987 ; Hales1985 ; Rowell 1959 ; Popoff 1934*). Les variabilités anatomiques inter-espèces sont nombreuses aux niveaux vasculaire et microvasculaire, et les études anatomiques et fonctionnelles de la vascularisation et de la microvascularisation cutanées sont, somme toute, inexistantes chez le cheval. Il apparaît donc que seules des investigations poussées, menées conjointement chez le cheval et le poney, et utilisant des technologies appropriées telle la tomographie fonctionnelle, l'imagerie par résonance acoustique (*Kemmling2010*) ou la microscopie photo acoustique (*Favazza2011*) permettront d'en apprendre davantage sur les variations anatomiques des réseaux vasculaire et microvasculaire cutanés équin à l'origine probable de la différence spatiale d'oxygénation tissulaire observée chez le cheval, qui semble inexistante chez le poney (*Wilmink2003 ; VanDenBoon2002 ; Wilmink2001 ; BaconMiller2000 ; Wilmink1999a ; Wilmink1999b*), ce dernier ne présentant aucun problème de cicatrisation cutanée, à l'inverse du cheval.

B / 2 – Variabilité du microbisme lésionnel

L'hypoxie affecte directement la bonne réalisation de la phase inflammatoire, tel qu'il a été décrit. Elle altère les capacités de défense des plaies en limitant l'efficacité enzymatique des LEU, et favorise la migration et la persistance sélectives de certaines sous-populations de LEU. L'arrivée des LEU au sein des plaies appendiculaires étant retardée chez le cheval, il est fort peu probable que ce soit les LEU qui induisent, via le « *respiratory burst* », l'hypoxie tissulaire rapidement constatée au niveau appendiculaire. Il apparaît fort probable que leur persistance, par contre, l'entretienne, voire l'accroisse. Une altération potentielle des capacités de

défense des plaies appendiculaires pourrait entraîner une clairance bactérienne plus faible au niveau appendiculaire, et ainsi favoriser la sélection et l'établissement à plus long terme de colonies bactériennes plus résistantes aux attaques des PMN et des MON/MAC, à l'origine d'une plus longue stimulation et de la persistance des LEU. Une plus grande contamination bactérienne et l'existence de biofilms bactériens, ont été récemment rapportés au niveau des plaies appendiculaires chroniques chez le cheval (*Westgate2011 ; Freeman2009 ; Clutterbuck2007a*), à l'image de ce qu'il semble exister dans les plaies chroniques de l'Homme (*Burmolle2010 ; Thomsen2010 ; Schierle2009 ; Bjarnsholt2008 ; Kirketerp-Moller2008*). Étonnamment, malgré des environnements de vie relativement différents, les mêmes bactéries se retrouvent dans les plaies chroniques de l'Homme et du cheval : citons *Staphylococcus spp*, *Pseudomonas spp*, *Enterococcus spp* (*Westgate2011 ; Burmolle2010 ; Thomsen2010 ; Freeman2009*).

La formation d'un biofilm par des bactéries est un processus complexe qui implique une évolution bactérienne majeure: les bactéries, qui ont généralement une vie planctonique, doivent devenir sessiles (*Clutterburck2007a*). Certaines bactéries forment spontanément des biofilms, tel *Pseudomonas aeruginosa* ; la plupart des bactéries ont cependant besoin de signaux environnementaux particuliers, tels un changement de température ou de pH, un stress nutritif ou oxydatif (*Hoiby2010 ; Kolpen2010 ; Ciofu2005 ; O'Toole 2000*) pour former un biofilm. La formation de biofilms bactériens apparaît donc comme un processus d'adaptation à des conditions environnementales stressantes (*Schierle2009 ; Otto2008 ; Donlan2002a,b ; Stoodley2002 ; Costerton1999*). Chez le cheval, ces signaux environnementaux particuliers pourraient provenir :

- (1) d'une part, des PMN et des MON/MAC, grands consommateurs d'O₂ et grands producteurs de ROS, dont la persistance dans les plaies appendiculaires pourrait être à l'origine d'un stress environnemental ;
- (2) d'autre part, des bandages semi-occlusifs fréquemment utilisés et sous lesquels les plaies appendiculaires développent invariablement des TGE (*Celeste2011b ; Dubuc2006 ; Ducharme-Desjarlais2005 ; Lepault2005 ; DeMartin2004 ; Theoret2002a ; Barber1990*). Ces bandages modifient la température (*Celeste2011b*), l'humidité, le pH (*Knottenbelt2003*) et

probablement les échanges gazeux (Celeste 2011b ; Knottenbelt2003) des plaies cutanées, et représentent donc une possible source de stress environnemental.

Ces changements environnementaux pourraient s'avérer suffisants pour que les bactéries présentes à la surface des plaies cutanées changent de *modus operandi* au niveau appendiculaire et forment, en particulier sous bandages, des biofilms qu'elles ne produiraient pas en temps normal, et à l'origine d'une cicatrisation cutanée pathologique.

Aucune étude sériee comparant la contamination bactérienne des plaies corporelles, gérées avec ou sans bandage, celle des plaies appendiculaires, gérées avec ou sans bandage, et celle des plaies appendiculaires développant un TGE, n'a à ce jour été faite, chez le cheval. Une telle étude apporterait des informations fondamentales sur et la possible contamination bactérienne de ces plaies, mais aussi et surtout, sur la possible existence de biofilms bactériens dans certaines d'entre elles, conséquence potentielle du stress hypoxique / oxydatif environnemental régnant au sein des plaies appendiculaires, tel qu'il sera discuté, et dont l'importance semble indéniable et à l'origine de(s) possible(s) perturbation(s) cicatricielle(s) rencontrée(s) chez le cheval. Il apparaît plausible que des différences de microbisme soient observées et que ces différences soient à l'origine de, ou participent à la perturbation de la cicatrisation cutanée chez le cheval. Il est rapporté chez l'Homme que la taille et l'évolution des plaies chroniques sont directement proportionnelles à leur degré d'invasion par *Pseudomonas aeruginosa* (Burmolle 2010 ; Gjodsbol2006), laissant supposer que le microbisme ambiant pourrait influencer sur les aptitudes fonctionnelles de certaines populations cellulaires, dont les myofibroblastes, responsables de la contraction lésionnelle.

B / 3 – Le myofibroblaste cutané équin

La cellule principalement responsable du remodelage de la MEC et de la contraction lésionnelle, déficients dans les plaies appendiculaires du cheval, est le myofibroblaste, un type particulier de fibroblaste activé (Meran2011 ; Hinz2003b ; Werner2003). Il apparaît donc fort probable que le dysfonctionnement de cette cellule contribue, en tout ou partie, à la cicatrisation cutanée pathologique appendiculaire du cheval. Or,

peu d'études vétérinaires se sont penchées sur cette cellule particulière (*Schwartz2002 ; Wilmink2001 ; Wilmink1999b*), alors qu'elle est l'objet d'intenses recherches chez l'Homme, puisqu'elle est considérée comme (1) la cellule responsable des désordres fibrotiques humains (peau, rein, foie, cœur), et que (2) son bon fonctionnement apparaît altéré par l'hypoxie.

De nombreuses populations cellulaires peuvent, semble-t-il, se différencier en myofibroblastes, tels les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les péricytes, les cellules hépatiques péri sinusoidales, les cellules souches mésenchymateuses, les fibrocytes (*Meran2011 ; Hinz2010 ; Hinz2007*). L'hypoxie, le stress oxydatif et la voie de signalisation du HIF semblent jouer un rôle majeur dans la différenciation de ces populations cellulaires, en particulier dans la différenciation épithélio-mésenchymateuse, tel qu'il sera discuté. La contribution relative de ces différentes populations cellulaires à la population myofibroblastique cutanée reste cependant à déterminer. Même s'il apparaît probable que les myofibroblastes dérivent principalement de la population fibroblastique locale (*Hinz2010*), il est possible que la contribution relative de ces précurseurs varie d'un tissu à l'autre, d'un site anatomique à l'autre, et que les myofibroblastes qui en découlent n'aient ni les mêmes propriétés, ni la même réactivité aux divers facteurs environnementaux rencontrés, qu'ils soient d'ordre chimique ou physique (*Hinz2010 ; Hinz2007*). Le retraçage de l'origine génétique des myofibroblastes est un outil en développement (*Humphreys2010*), qui pourrait être d'une grande utilité dans l'identification de l'origine exacte des myofibroblastes peuplant les plaies cutanées corporelles et appendiculaires chez le cheval.

Il existe deux formes de myofibroblastes:

- (1) le proto-myofibroblaste : il s'agit d'un stade intermédiaire de différenciation du fibroblaste en myofibroblaste (*Meran2011 ; Desmouliere2005*). Il possède des faisceaux contractiles, ou fibres de stress, principalement composés de β et de γ actines cytoplasmiques, qui génèrent peu de forces contractiles (*Hinz2007 ; Hinz2001b*) ;

(2) le myofibroblaste *stricto sensu*, encore appelé myofibroblaste différencié : il s'agit du stade ultime de différenciation du fibroblaste en myofibroblaste. Il exprime et incorpore à ses fibres de stress de grandes quantités d' α SMA, qui génèrent d'importantes forces contractiles à l'origine de la contraction lésionnelle (Hinze2007 ; Hinze2001a).

L'une et l'autre forme ont des propriétés synthétiques. Seule la forme différenciée finale a cependant des propriétés contractiles efficaces. Le principal marqueur utilisé pour détecter la présence des myofibroblastes chez le cheval est l' α SMA, qui permet la détection des myofibroblastes différenciés, mais pas celle des proto-myofibroblastes (Meran2011 ; Hinze2003 ; Hinze2001a,b), qui à l'instar des fibroblastes et myofibroblastes (Meran2011 ; Serini1998), expriment fortement le transcrit ED-A de la fibronectine, d'une importance cruciale dans la poursuite de la différenciation myofibroblastique (Meran2011). La question suivante se pose donc: les cellules peuplant le TGE sont-elles des proto-myofibroblastes, plutôt que des fibroblastes ou des myofibroblastes, capables de synthétiser en abondance du collagène de type I mais incapables d'effectivement contracter les plaies ? Des études, utilisant comme marqueur sélectif le transcrit ED-A de la fibronectine, pourraient apporter d'intéressants éclaircissements sur la nature exacte des cellules peuplant les plaies appendiculaires du cheval, et tout particulièrement les TGE qui tendent à s'y développer et qui apparaissent peuplés de cellules résistantes à toute forme d'apoptose.

L'hypoxie, via la stabilisation de la voie du HIF, favorise l'expression d'un certain nombre de facteurs, dont le TGF- β 1 et le PAI-1, et inhibe l'expression d'autres, tels les cadhérines. Les cadhérines des cellules fibroblastiques (Nonomura2009) sont des glycoprotéines membranaires à l'origine des jonctions d'adhérence et des desmosomes cellulaires. Les cadhérines sont souvent associées aux caténines intracellulaires, qui servent alors d'intermédiaire entre les cadhérines et le cytosquelette (actine). Les cadhérines permettent ainsi l'adhésion, la liaison et la communication intercellulaire. La sous expression des cadhérines lors d'hypoxie abroge l'inhibition par contact de la prolifération cellulaire (Nonomura2009 ; Imai2003),

souvent à l'origine d'une prolifération cellulaire effrénée et d'une dispersion cellulaire, tel qu'il est souvent rencontré en cancérologie. La perte de l'inhibition par contact de la prolifération cellulaire favorise l'activation de la voie de signalisation de la kinase d'adhésion focale : cette voie protège les myofibroblastes de l'apoptose (Hinz2010). Le TGF- β 1, tout comme l'END 1, dont l'hypoxie accroît également l'expression (Bodi1995 ; Elton1992), inhibe aussi l'apoptose des myofibroblastes via la voie de signalisation de la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) / protéine kinase B (Akt). Ainsi, l'hypoxie tissulaire tend à provoquer la mise en route de plusieurs mécanismes favorisant la persistance et la prolifération des myofibroblastes au sein des tissus de granulation hypoxiques (Hinz2010 ; Douglass2008). La prolifération cellulaire fibroblastique **accrue** (Annexe V : Comparaison de la multiplication des fibroblastes cutanés équins appendiculaires (canon) et corporels (thorax), dans des conditions de normoxie (20% O₂) et d'hypoxie (1% O₂)) et la diminution des facteurs pro-apoptotiques que nous observons au sein des plaies appendiculaires chez le cheval (Lepault2005) pourraient ainsi s'expliquer par l'hypoxie tissulaire relative dont elles souffrent (Celeste 2011a,b).

Le TGF- β 1, tel qu'il a été décrit, stimule la prolifération et les synthèses protéiques de diverses populations cellulaires, dont les myofibroblastes. Le TGF- β 1 a aussi d'autres fonctions, dont une majeure : c'est principalement sous l'action du TGF- β 1, en collaboration avec l'ED-A (domaine supplémentaire A) de la fibronectine et certaines NAD(P)H-oxydases (Brüner2011), qu'a lieu la complétion de la différenciation fibroblastique, donc le passage du proto-myofibroblaste au myofibroblaste différencié (Meran2011 ; Serini1998). Un certain nombre de facteurs surexprimés lors d'hypoxie, dont l'intégrine α v β 6 produite par les cellules épithéliales (Hinz2011 ; Aluwihare2008 ; Jenkins2006 ; Ridgway2005) favorisent l'activité, donc l'action du TGF- β 1, et ainsi la complétion de la différenciation fibroblastique. La voie de signalisation du TGF- β 1 fait appel à des récepteurs spécifiques, dont le récepteur de type II (TGF- β RII). Modaresi a récemment rapporté une sous expression de TGF- β RII lors d'hypoxie (2% O₂) (Modaresi2010) chez des fibroblastes / myofibroblastes cutanés. Cette sous-expression de TGF- β RII s'accompagnait :

- (1) d'une importante différenciation fibroblastique des myofibroblastes cutanés (régression phénotypique) ;
- (2) d'une phosphorylation accentuée des SMAD ;
- (3) d'une expression accrue du PAI-1.

Ces résultats suggèrent que l'hypoxie supprimerait la différenciation fibroblastique au niveau cutané, voire la renverserait, par un mécanisme non dépendant des SMAD, principale voie de signalisation du TGF- β 1, sans affecter de façon significative cette dernière. L'hypoxie pourrait donc annihiler les propriétés contractiles des myofibroblastes, par une voie autre que celle des SMAD et/ou du TGF- β 1, sans altérer leurs propriétés synthétiques (Modaressi2010). D'autres voies d'activation de la différenciation fibroblastique que celle du TGF- β 1 ont été rapportées (Watsky2010); elles ont peu été étudiées jusqu'alors, leur importance est donc peu connue et il n'est pas encore déterminé avec exactitude si ces voies sont strictement indépendantes de la voie du TGF- β 1, ou collaborent, par un mécanisme encore non élucidé, à cette voie. A titre d'exemple, le facteur de croissance nerveuse (NGF) stimule la différenciation fibroblastique au niveau cutané (Watsky2010 ; Micera2001). Fait des plus intéressant, NGF induit l'expression de l' α SMA et favorise la contraction lésionnelle cutanée, mais n'influence ni la production de collagène ni celle de MMP. NGF favorise donc la contraction lésionnelle sans influencer sur le remodelage de la MEC. L'hypoxie provoque une sous-expression de NGF (Barhwal2008), qui pourrait être à l'origine du renversement de la différenciation fibroblastique observée par Modaressi (Modaressi2011). L'hypoxie tissulaire relative observée au niveau appendiculaire chez le cheval pourrait donc s'avérer suffisante pour provoquer une différenciation myofibroblastique à l'origine de la contraction lésionnelle quasi inexistante qui est observée au niveau des plaies appendiculaires. On a longtemps considéré que la « plus grande » tension cutanée qui semblait exister en périphérie des plaies appendiculaires était le facteur limitant à la contraction lésionnelle de ces plaies chez le cheval. Il apparaît que, si cette tension cutanée est effectivement un facteur limitant, ce qui reste encore à prouver puisque l'application d'un stress mécanique à la MEC apparaît bénéfique à la différenciation fibroblastique (Modaressi2010), l'hypoxie relative dont souffrent les plaies appendiculaires pourrait être un facteur limitant

encore plus important. En effet, les fibroblastes / myofibroblastes cutanés appendiculaires équins, dans des conditions normoxiques de culture semblent avoir de meilleures capacités contractiles que les fibroblastes / myofibroblastes cutanés corporels équins (Wilmink2001), à l'opposé de ce que l'on observe *in vivo*, amenant Wilmink à conclure que les différences de contraction lésionnelle observées *in vivo* ne pouvaient pas, selon toute évidence, être causées par des caractéristiques inhérentes aux fibroblastes / myofibroblastes cutanés équins. Seuls des facteurs exogènes environnementaux apparaissent capables de renverser aussi drastiquement le bon fonctionnement d'une cellule, ce que semble vouloir confirmer l'utilisation de bandages. En altérant les échanges gazeux superficiels des plaies appendiculaires, en modifiant aussi leur environnement en cytokines, facteurs de croissances, et autres médiateurs (ROS, RNOS), les bandages pourraient accroître le niveau d'hypoxie tissulaire ainsi que le niveau de stress oxydatif rencontrés dans les plaies appendiculaires non bandées (Celeste2011b), annihilant par la même toute possibilité de contraction lésionnelle et favorisant une production matricielle exagérée à l'origine du TGE.

La réponse des myofibroblastes cutanés à l'hypoxie semble varier de façon significative selon leur origine anatomique : les myofibroblastes dermiques et cardiaques tendent à se différencier en fibroblastes lors d'hypoxie tandis que les myofibroblastes pulmonaires et hépatiques tendent à accentuer leur expression d' α SMA (Modaressi2010).

Des études plus approfondies des origines, des capacités fonctionnelles et du comportement *in situ* des myofibroblastes cutanés appendiculaires et corporels équins s'avèrent donc requises afin d'élucider les raisons exactes de leur dysfonctionnement au niveau appendiculaire *in vivo*. L'hypoxie tissulaire relative rapportée au niveau appendiculaire, et le stress oxydatif qui l'accompagne, jouent très certainement un rôle essentiel dans ce dysfonctionnement, comme pourraient en jouer un les bactéries / biofilms bactériens qui probablement se développent au sein des plaies appendiculaires.

B / 4 – Statut redox lésionnel et cicatrisation cutanée pathologique

Il apparaît paradoxal qu'une hypoxie tissulaire provoque un stress oxydatif, les perturbations en hyper du statut redox étant généralement associées, dans l'esprit collectif, à la production excessive de ROS qui accompagne les apports excessifs d'O₂. Les cellules réorientent généralement leur métabolisme énergétique lors d'hypoxie chronique modérée, privilégiant les voies anaérobies, telle la glycolyse anaérobie, pour produire de l'ATP. Le peu d'O₂ disponible est cependant exploité et entre dans le cycle de Krebs et/ou la chaîne respiratoire mitochondriale, qui se réalisent tout ou partiellement. Le cycle de Krebs peut ainsi générer des composés intermédiaires (*Sudarshan2009 ; Klimova2009 ; Kaelin2008*) et la chaîne respiratoire mitochondriale des ROS, dont l'accumulation apparaît inappropriée (*Majmundar2010 ; Miyata2010 ; Hamanaka 2009*). Ces ROS :

- (1) limitent l'activité des PHD, tout comme le manque direct d'O₂ et les composés intermédiaires du cycle de Krebs (*Sudarshan2009 ; Klimova2009 ; Kaelin2008*). Ils stabilisent ainsi la voie de signalisation du HIF et stimulent les voies efférentes (*Majmundar2010 ; Klimova2008 ; Kaelin2005*). Une controverse existe quant à l'importance des divers mécanismes de stabilisation de la voie de signalisation du HIF (*Majmundar2010*) ;
- (2) altèrent le statut redox du tissu hypoxique, à l'origine d'un stress environnemental de type oxydatif.

La formation de biofilms bactériens tout comme l'induction des dysfonctionnements cellulaires observés chez les myofibroblastes pouvant, en tout ou partie, être provoqués par un stress oxydatif, il apparaît possible que les plaies appendiculaires du cheval, en particulier celles gérées sous bandage, souffrent et d'hypoxie tissulaire et de perturbations de leur statut redox, à l'origine d'une activation de la voie du HIF et des complications cicatricielles observées. Cette hypothèse, très attrayante, reste cependant à confirmer.

L'acide lactique provoquerait, selon toute vraisemblance, un stress oxydatif « physiologique » similaire à celui provoqué par les ROS lors d'hypoxie tissulaire. (*Milovanova2008*). Cette particularité pourrait expliquer l'importante stimulation de la

synthèse du collagène et de l'angiogenèse via une augmentation de la sécrétion de VEGF lors d'acidose lactique.

B / 5 – La voie du HIF dans la guérison cutanée du cheval

L'activation de la voie de signalisation du HIF, proportionnelle au degré d'hypoxie (Cassavaugh2011 ; Majmundar2010), passe par la stabilisation des sous-unités HIF-1 α et HIF-2 α , tel qu'il a été décrit. Structuellement similaires, l'HIF-1 α et l'HIF-2 α ont beaucoup de gènes cibles communs. Cependant, quelques-uns diffèrent. Parmi ces derniers, certains gènes cibles se complètent, rendant l'HIF-1 α et l'HIF-2 α complémentaires, alors que d'autres s'opposent, rendant l'HIF-1 α et l'HIF-2 α antagonistes (Skuly2009 ; Gordan2007 ; Simon2006). Brièvement, et à titre d'exemples :

- (1) dans la régulation du métabolisme énergétique :
 - a. l'HIF-1 α oriente le métabolisme glucidique vers la production anaérobie d'énergie, facilitant ainsi la survie cellulaire, mais aussi la production de substrat à la synthèse nucléotidique, facilitant ainsi la croissance et la multiplication cellulaire (Zhao2010 ; Tong2009 ; Gordan2007 ; Simon2006) ;
 - b. l'HIF-2 α oriente le métabolisme lipidique vers le stockage énergétique en bloquant le catabolisme et la β oxydation lipidiques (Rankin2009 ; Bostrom2006 ; Huss2001) ;
 - c. l'HIF-1 α et l'HIF-2 α maximisent l'efficacité de la chaîne respiratoire mitochondriale (Gordan2007) ;
- (2) dans la régulation de l'angiogenèse et de la vasculogenèse :
 - a. l'HIF-1 α contrôle la prolifération, le métabolisme et la survie des cellules endothéliales ;
 - b. l'HIF-2 α contrôle la migration et l'adhésion des cellules endothéliales, ainsi que l'intégrité vasculaire (Skuli2009) ;
 - c. l'HIF-1 α et l'HIF-2 α maximisent l'expression des médiateurs de l'angiogenèse, tels le VEGF, le PDGF, le PGF (Manalo2005 ; Hu2003 ; Kelly2003) ;
- (3) dans la régulation du statut redox :
 - a. l'HIF-1 α intervient peu ;

b. l'HIF-2 α stimule la production d'enzymes anti-oxydantes, limite l'accumulation et l'action des ROS (*Gordan2007*) et favorise la stabilité du statut redox et la viabilité cellulaires. L'HIF-2 α permet ainsi aux cellules de beaucoup mieux résister aux agressions oxydatives (*Majmundar2010*).

(4) dans la régulation de la réponse inflammatoire :

a. l'HIF-1 α gère la réorientation du métabolisme énergétique vers la glycolyse anaérobie chez les MAC (*Fang2009 ; Cramer2003*) ; son expression dans les PMN est requise à la défense contre les microorganismes pathogènes, ainsi que pour leur survie (*Walmsley2006 ; Peysonnaux2005*)

b. l'HIF-2 α régule la production des cytokines inflammatoires, telles l'IL-1 β , l'IL-12 et le TNF- α , et stimule la migration et le chimiotactisme des MAC (*Imtiyaz2010 ; Fang2009 ; Cramer2003*)

Il semble donc que les sous-unités α du HIF gèrent des mécanismes adaptatifs différents. Les questions suivantes s'imposent : se pourrait-il que l'expression différentielle préférentielle de l'une ou l'autre des sous-unités α du HIF mène à des pathologies différentes ? L'hypoxie tissulaire relative constatée au niveau appendiculaire chez le cheval pourrait-elle s'accroître lors de l'utilisation de bandages, provoquant une expression différente des sous-unités HIF-1 α et HIF-2 α dans les plaies appendiculaires bandées et non bandées, à l'origine du développement d'un TGE dans notre modèle d'étude ?

Le TGE se développant au niveau des plaies appendiculaires étant souvent qualifié de tumeur dermique fibroproliférative non maligne, à l'image de la chéloïde humaine, il apparaît intéressant de s'intéresser succinctement à l'expression des sous-unités α du HIF au sein des tumeurs. Les rôles distincts du HIF-1 α et du HIF-2 α dans la carcinogénèse sont actuellement à l'étude ; on commence à mieux cerner l'importance de l'une et l'autre des sous-unités α du HIF. Il apparaît que l'expression différentielle de l'HIF-1 α et de l'HIF-2 α régule finement le comportement des tumeurs, leur proliféricité, leur capacité à métastaser, leur aptitude à recruter des cellules souches / progénitrices mais aussi leur réponse favorable / défavorable aux traitements instaurés pour les contrecarrer. Leurs teneurs respectives ont d'ailleurs

des valeurs pronostiques pour certains types de cancer (neuroblastome, carcinome et adénocarcinome pulmonaires). Une plus forte expression du HIF-1 α est rencontrée dans les cancers peu avancés, de faible grade ou à faible morbidité / mortalité. Inversement, plus l'expression du HIF-2 α est élevée, plus la morbidité / mortalité est élevée, plus le pronostic vital apparaît sombre (*Majmundar2010*).

B / 6 – La transition épithélio-mésenchymateuse

Les cellules épithéliales sont des cellules hautement spécialisées, qui se caractérisent par une polarisation apico-basale, une répartition précise des molécules d'adhésion (intégrines et cadhérines), une latéralisation des jonctions intercellulaires, une polarisation des filaments d'actine. Elles sont intimement jointes entre elles par des structures membranaires hautement spécialisées, tels les jonctions serrées, les jonctions adhérentes ou les desmosomes et forment des couches cellulaires reposant sur une lame basale localisée au pôle basal des cellules les plus profondes. Les cellules épithéliales disposent d'une certaine mobilité qui leur permet de se déplacer au sein de la couche cellulaire à laquelle elles appartiennent, mais, elles ne peuvent pas, en temps normal, sortir de cette couche. Les cellules mésenchymateuses, au contraire, n'ont pas de polarisation apico-basale, n'ont que de rares contacts focaux avec les autres cellules, ne forment pas de couches organisées et ne reposent sur aucune lame basale. Elles ont une plasticité et secrètent des enzymes protéolytiques leur permettant de migrer au sein de la MEC. Les cellules épithéliales peuvent acquérir un phénotype mésenchymateux au cours du phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La TEM caractérise un processus dynamique au cours duquel les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales et développent des propriétés mésenchymateuses. La transition d'un phénotype cellulaire à un autre recouvre un large spectre de modifications inter- et intracellulaires rarement observées en totalité (*Pallet&Anglicheau2008 ; Neilson2007*). La TEM n'est pas donc nécessairement un changement complet de lignage cellulaire (*Pallet&Anglicheau2008 ; Thiery2006*).

La TEM est un événement clé dans la dispersion métastatique (les cellules initialement épithéliales acquièrent une mobilité de type mésenchymateuse) (*Majmundar2010*), dans la guérison tissulaire, et dans la perturbation de cette dernière. En effet, de nombreuses populations cellulaires, dont les cellules épithéliales, semblent en mesure de se différencier en fibroblastes / myofibroblastes, pendant la cicatrisation cutanée (*Meran2011 ; Hinz2010 ; Hinz2007*), tel qu'il a été cité. L'hypoxie et les sous-unités α du HIF semblent jouer un rôle important, à la fois direct et indirect, dans la TEM (*Mak2010 ; Erler2009 ; Bertout2008 ; Kaelin2008*).

L'hypoxie accroît l'expression du TGF- β 1, tel qu'il a été décrit (*Bodi1995 ; Elton1992*). Le TGF- β 1 est sans aucun doute le médiateur essentiel du processus de la TEM, capable d'induire à lui seul l'ensemble des altérations phénotypiques observées (*Pallet&Anglicheau2008 ; Schnaper2003 ; Bottinger2002 ; Massague2000*). D'autres facteurs, tels le bFGF ou l'EGF, sont aussi impliqués; ils ont la particularité d'agir en synergie avec le TGF- β 1 (*Pallet&Anglicheau2008 ; Strutz 2002 ; Okada1997*). Le collagène de type I et l'HA sont également capables d'induire la TEM (*Pallet&Anglicheau2008 ; Zeisberg2001 ; Okada1997*). Ces activateurs ont en commun la voie de signalisation activant les petites protéines Rho, Rac et cdc42 qui ont comme fonction de défaire les jonctions intercellulaires, de réorganiser le cytosquelette d'actine, de former des lamellipodes et filopodes, mais également d'activer les facteurs transcriptionnels SNAIL 1 et 2, à l'image du TGF- β 1 (*Pallet&Anglicheau2008 ; Peinado2007 ; Thiery2006*). La stabilisation des sous-unités HIF1 α et HIF-2 α , qu'elle soit hypoxique ou autre (ROS, NO), favorise l'expression de la lysyl oxydase, une enzyme qui, d'une part, encourage la synthèse et le dépôt de collagène, favorisant le dépôt matriciel, et, d'autre part, stabilise les SNAIL (*Chapman2010 ; Sahlgren2008*). Les SNAIL répriment la transcription des gènes codant pour certaines cadhérines (E-cadhérine) et favorisent la transcription de gènes codant pour des marqueurs mésenchymateux, favorisant ainsi la désolidarisation et la différenciation des cellules épithéliales (*Chapman2010 ; Sahlgren2008*). Une sous expression de la cadhérine OB a été rapportée au niveau des plaies appendiculaires du cheval (*Miragliotta2008b*). La surexpression de la sous-unité HIF-2 α semble jouer un rôle majeur dans la TEM dans la cancérogenèse pulmonaire (*Chapman2010 ; Kim2009*).

C – DISCUSSION SUR DE POTENTIELLES APPROCHES THÉRAPEUTIQUES

C / 1 – L'oxygénothérapie hyperbare

Si nous partons de l'hypothèse que les plaies appendiculaires qui tendent à développer des TGE chez le cheval souffrent concomitamment et d'hypoxie et de stress oxydatif, les options thérapeutiques disponibles pour combattre la cicatrisation cutanée pathologique chez le cheval apparaissent des plus limitées. L'une d'entre elle, l'HBOT, apparaît cependant intéressante, si elle est utilisée à bon escient.

L'HBOT représente une méthode de choix pour accroître les niveaux tissulaires d'oxygène lors d'hypoxie. L'administration de 100% d'oxygène sous une pression de 2 atmosphères multiplie la $P_{T_{O_2}}$ par 10 voire 20 (Sen2009a ; Mathieu2006). L'HBOT permet principalement une augmentation de la quantité d'oxygène dissout dans le plasma sanguin, facilement disponible pour les cellules puisque directement disponible, l'élasticité des capacités de saturation et de transport de l'oxygène par l'hémoglobine étant très limitée. L'utilisation de l'HBOT pourrait donc s'avérer utile dans la gestion des plaies appendiculaires chez le cheval pour combattre l'hypoxie tissulaire qui semble y régner. L'HBOT a été peu étudiée chez le cheval. Les quelques rapports existant sont truffés d'anecdotes, les régimes d'administration apparaissent empiriques, l'unique étude scientifique publiée déconseille son utilisation (Holder2008). Il apparaît, selon nos études (Celeste2011a,b), mais aussi selon plusieurs études menées chez l'Homme (Sen2009b ; D'Souza2007 ; Wang2003 ; Bello200 a,b), que les plaies cutanées ont, en règle générale, des besoins en oxygène qui diffèrent selon leur nature, leur stade d'évolution, ou leur localisation anatomique (Celeste2011a). Par conséquent, l'application d'une dose / un régime unique, qui a longtemps été préconisée, apparaît loin d'être un gage de réussite. L'oxygène pouvant être toxique à forte dose, la détermination de régimes appropriés d'administration apparaît donc requise avant que ne soit utilisée à grande échelle l'HBOT, tant chez le cheval que chez l'Homme. L'utilisation conjointe de l'HBOT et d'une technologie permettant de cartographier en temps réel la $P_{T_{O_2}}$ d'une plaie, telle la spectroscopie par résonance paramagnétique électronique (Sen2009a ; Hama2007 ; Vikram2007) pourrait être une alternative très intéressante.

L'HBOT agit principalement par l'augmentation des ROS et RNOS, tant localement que systématiquement (Thom2011), donc par l'accroissement du stress oxydatif. S'il est confirmé que les plaies appendiculaires du cheval souffrent de stress oxydatif, l'utilisation de l'HBOT pourrait se révéler contre-indiquée (Thom2011), tout du moins lorsqu'un TGE est déjà formé. En effet, l'HBOT restaure, au sein des plaies hypoxiques, le pouvoir antibactérien des LEU (Cimsit2009), l'activité de certains antibiotiques, tels les aminoglycosides, dont l'efficacité est étroitement dépendante de la $P_{T_{O_2}}$, mais aussi l'efficacité de certaines cellules mésenchymateuses, telles les fibroblastes / myofibroblastes, dont les activités de synthèse, de remodelage, et contractiles apparaissent aussi étroitement dépendantes de la $P_{T_{O_2}}$. Administrée à des doses appropriées dès la survenue de la blessure appendiculaire, l'HBOT pourrait supporter l'activité leucocytaire déficiente des plaies appendiculaires pendant la phase inflammatoire, favoriser sa complétion et probablement le bon déroulement des phases subséquentes de la cicatrisation cutanée. Administrée plus tardivement alors qu'un stress oxydatif potentiel et qu'un TGE sont déjà installés risquerait d'aggraver le processus en cours.

C / 2 – La thérapie par pression négative

Un œdème tissulaire plus important se développe, en règle générale, au niveau des plaies appendiculaires chez le cheval. Cet œdème (1) accroît la distance séparant les cellules du réseau vasculaire le plus proche (Mustoe2006 ; Tandara2004 ; Sheffield1988) et, (2) accentue la pression sur le réseau microvasculaire, à l'origine d'une augmentation de pression capillaire (Orgill2010 ; Broughton2006). L'œdème tissulaire tend ainsi à réduire la perfusion microvasculaire et à entraver l'apport d' O_2 , créant un environnement hypoxique impropre au bon fonctionnement du métabolisme cellulaire. Une alternative à l'HBOT serait l'utilisation de la thérapie par pression négative (TPN), qui limite l'infection bactérienne, contrecarre l'œdème tissulaire, encourage la perfusion microvasculaire et stimule mécaniquement les plaies, favorisant ainsi l'oxygénation tissulaire et la différenciation myofibroblastique, donc la contraction lésionnelle et la fermeture des plaies cutanées (Orgill2010 ; Sen2010 ; Vikatmaa2008). Cependant, là encore, l'utilisation de la TPN apparaît, à l'image de l'HBOT, d'une utilité certaine

pour prévenir le développement du TGE, mais d'une utilité beaucoup plus limitée lorsque celui-ci est installé.

A ce jour, une seule et unique approche thérapeutique semble fonctionner lorsqu'un TGE s'est développé au sein d'une plaie : la résection chirurgicale, qui permet de lever, tout du moins temporairement, l'obstacle physique que représente le TGE à la ré-épithélialisation.

CONCLUSION

La guérison tissulaire, en l'occurrence la cicatrisation cutanée dans notre étude, figure bien parmi les processus biologiques les plus complexes qui soient. De nombreux facteurs, locaux et systémiques, l'affectent. Parmi ces facteurs figure, entre autres, l'O₂.

L'utilisation combinée de méthodes physiques d'évaluation de la disponibilité locale en O₂ et de la perfusion tissulaire nous permet de conclure qu'il existe :

- des différences à la fois temporelles et spatiales de disponibilité locale en O₂ (NIRS) *(Celeste2011a)* et de perfusion tissulaire (ThIR) *(Celeste2011b)*, donc d'oxygénation tissulaire, au niveau de la peau du cheval, pendant la cicatrisation cutanée de plaies créées chirurgicalement ;
- une hypoxie tissulaire relative chronique au niveau des plaies cutanées appendiculaires, tel que le laissait suspecter les résultats de Lepault *(Lepault2005)*, hypoxie qui vraisemblablement participe au développement du TGE, fréquemment observé dans ces plaies.

Des études moléculaires plus approfondies s'avèrent maintenant nécessaires pour confirmer et quantifier plus précisément le niveau d'hypoxie régnant au sein des différentes plaies étudiées, déterminer l'éventuelle expression préférentielle de l'une ou/et l'autre des sous unités α du HIF, confirmer cette expression par le dosage séquentiel d'un certain nombre de facteurs spécifiquement gérés par le HIF1 α et le HIF2 α , confirmer ou infirmer la présence d'un stress oxydatif associé, qui pourraient être à l'origine des dysfonctionnements cellulaires mais aussi bactériens observés, et donc des complications cicatricielles rencontrées au niveau des plaies appendiculaires chez le cheval.

Nos études n'évaluant pas la fonctionnalité du réseau microvasculaire, il apparaît impossible à ce stade de nos recherches de conclure sur la(les) cause(s) possible(s) de l'hypoxie tissulaire relative appendiculaire observée. Seules des investigations anatomiques et physiologiques poussées, menées conjointement chez le cheval et le poney, permettront d'en apprendre davantage sur les possibles variations anatomo-physiologiques des réseaux vasculaire et microvasculaire cutanés équins

potentiellement en cause. Il est possible qu'aucune différence anatomo-physiologique significative existe et que la(les) cause(s) de cette hypoxie réside(nt) ailleurs.

Les phases inflammatoire et de remodelage de la cicatrisation cutanée apparaissant les plus perturbées dans la cicatrisation cutanée pathologique chez le cheval, il apparaît plus qu'opportun de concentrer les recherches futures sur les événements particuliers caractérisant ces phases. Leur dérèglement pourrait provoquer l'hypoxie tissulaire relative observée et le probable stress oxydatif qui l'accompagne, comme il pourrait être, inversement, provoqué par l'hypoxie tissulaire relative constatée. Qui est l'œuf, qui est la poule ... là est la question ? Le développement de biofilms bactériens, qui a été constaté au sein des plaies appendiculaires cicatrisant anormalement, est-il la cause ou la conséquence du dérèglement de la phase inflammatoire de ces plaies ? Bien des questions se posent, auxquelles il faudra trouver des réponses si l'on souhaite offrir des traitements adaptés aux chevaux qui souffrent de cicatrisation cutanée pathologique.

Les moyens thérapeutiques actuellement disponibles, hors résection chirurgicale, tels l'HBOT ou le TPN, qui n'ont pas encore été scientifiquement évalués chez le cheval, semblent d'un intérêt réel pour prévenir le développement du TGE, si les hypothèses que nous avons émises se vérifient. Ils n'apparaissent malheureusement, pour l'instant, d'aucun secours lorsqu'un TGE est installé.

BIBLIOGRAPHIE

-
- Aarabi S**, Longaker MT, Gurtner GC. Hypertrophic scar formation following burns and trauma: new approaches to treatment. *PLoS Med* 2007; 4: e234
- Abe R**, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 2001; 166: 7556 – 7562
- Abergel RP**, Pizzurro D, Meeker CA, Lask G, Matsuoka LY, Minor RR, Chu ML, Uitto J. Biochemical composition of the connective tissue in keloids and analysis of collagen metabolism in keloid fibroblast cultures. *J Invest Dermatol* 1985; 84: 384 – 390
- Adelmann-Grill BC**, Hein R, Wach F, Krieg T. Inhibition of fibroblast chemotaxis by recombinant human interferon gamma and interferon alpha. *J Cell Physiol* 1987; 130: 270 – 275
- Akasaka Y**, Fujita K, Ishikawa Y, Asuwa N, Inuzuka K, Ishihara M, Ito M, Masuda T, Akishima Y, Zhang L, Ito K, Ishii T. Detection of apoptosis in keloids an a comparative study on apoptosis between keloids, hypertrophic scars, normal healed flat scars, and dermatofibroma. *Wound Repair Regen* 2001; 9: 501 – 506
- Albina JE**, Mahoney EJ, Daley JM, Wesche DE, Morris Jr SM, Reichner JS. Macrophage arginase regulation by CCAAT / enhancer-binding protein beta. *Shock* 2005; 23: 168 – 172
- Allen DB**, Maguire JJ, Mahdavian M, Wicke C, Marcocci L, Scheuenstuhl H, Chang M, Le AX, Hopf HW, Hunt TK. Wound hypoxia and acidosis limit neutrophil bacterial killing mechanisms. *Arch Surg* 1997; 132: 991 – 996
- Allison DG**, Matthews MJ. Effects of polysaccharide interactions on antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Bacteriol* 1992; 73: 484 – 488
- Aluwihare P**, Munger JS. What the lung has taught us about latent TGF-beta activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 39: 499 – 502
- Arnold M**, Barbul A. Nutrition and wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117(7 Suppl): 42S – 58S
- Atiyeh BS**, Costagliola M, Hayek SN. Keloid or hypertrophic scar. The controversy: review of the literature. *Ann Plast Surg* 2005; 54: 676 – 680
-

-
- Attas M**, Hewko M, Payette J, Posthumus T, Sowa M, Mantsch H. Visualization of cutaneous hemoglobin oxygenation and skin hydration using near-infrared spectroscopic imaging. *Skin Res Technol* 2001; 7: 238 – 245
- Autio E**, Neste R, Airaksinen S, Heiskanen ML: Measuring the heat loss in horses in different seasons by infrared thermography. *J Appl Anim Welf Sci* 2006; 9:211-221
- Bacon-Miller C**, Wilson DA, Keegan KG, Kreeged 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
- Balestra GM**, Bezemer R, Boerma EC, Yong ZY, Sjauw KD, Engstrom AE, Koopmans M, Ince C. Improvement of sidestream dark field imaging with an image acquisition stabilizer. *BMC Med Imaging* 2010; 13: 10: 1 – 7
- Barhwal K**, Hota SK, Prasad D, Singh SB, Ilavazhagan G. Hypoxia-induced deactivation of NGF-mediated ERK1/2 signaling in hippocampal cells : neuroprotection by acetyl-L-carnitine. *J Neurosci Res* 2008 ; 86 : 2705 – 2721
- Barnes JL**, Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int* 2011; 79: 944 – 956
- Barrientos S**, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 585 – 601
- Battaglia F**, Delfino S, Merello E, Puppo M, Piva R, Varesio L, Bosco MC. Hypoxia transcriptionally induces macrophage-inflammatory protein-3alpha / CCL-20 in primary human mononuclear phagocytes through nuclear factor NF-kappa B. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 648 – 662
- Baud L**. Physiologie respiratoire PCEM2. Contrôle de la ventilation. Université Pierre et Marie Curie, Paris, France 2003: 1 – 8
- Bayat AB**, Bock O, Mrowietz U, Ollier WE, Ferguson MW. Genetic susceptibility to keloid disease and hypertrophic scarring: transforming growth factor beta 1 common polymorphisms and plasma levels. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111: 535 – 543
- Beer TW**. Keloids are not angiogenic lesions. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 1097
- Belda FJ**, Aguilera L, Garcia de la Asuncion J, Alberti J, Vicente R, Ferrandiz L, Rodriguez R, Company R, Sessler DI, Aguilar G, Botello SG, Orti R. Supplemental

perioperative oxygen and the risk of surgical wound infection: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005; 294: 2035 – 2042.

Bello YM, Phillips TJ. Adjunctive therapies for wound healing. *JAMA* 2000; 284: 40 – 41

Bello YM, Phillips TJ. Recent advances in wound healing. *JAMA* 2000; 283: 716 – 718

Berchner-Pfannschmidt U, Yamac H, Trinidad B, Fandrey J. Nitric oxide modulates oxygen sensing by hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of prolyl hydroxylase 2. *J Biol Chem* 2007; 19: 1788 – 1796

Bergh A, Nyman G, Lundeberg T, Drevemo S: Effect of defocused CO2 laser on equine perfusion. *Acta Vet Scand* 2006; 47:33-4

Bergmann A, Steller H. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Sci Signal* 2010; 26: re8

Berman B, Perez OA, Konda S, Kohut BE, Viera MH, Deakgado S, ZellD, Li Q. A review of the biologic effects, clinical efficacy, and safety of silicone elastomer sheeting for hypertrophic and keloid scar treatment and management. *Dermatol Surg* 2007; 33: 1291 – 1303

Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 2004; 555: 589 – 606

Berry DB, 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

Bertone AL, Sullins KE, Stashak TS, Norrdin RW. Effect of wound location and the use of topical collagen on exuberant granulation tissue formation and wound healing in the horse and pony. *Am J Vet Res* 1985; 46: 1438 – 1444

Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of oxygen availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 967 – 975

Bishop A. Role of oxygen in wound healing. *J Wound Care* 2008; 17:399-402

Biswas S, Roy S, Banerjee J, Hussain SR, Khanna S, Meenakshisundaram G, Kuppusamy P, Friedman A, Sen CK. Hypoxia inducible microRNA 210 attenuates keratinocyte proliferation and impairs closure in a murine of ischemic wounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 13 : 6976 – 6981

-
- Bjarnsholt T**, Jensen PO, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol* 2009; 44: 547 – 558
- Bjarnsholt T**, Kirketerp-Moller K, Ostrup Jensen P, Madsen KG, Phipps R, Krogfelt K, Hoiby N, Givskov M. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 2 – 10
- Bluff JE**, O'Ceallaigh S, O'Kane S, Ferguson MW, Ireland G: The microcirculation in acute murine cutaneous incisional wounds show a spatial and temporal variation in the functionality of vessels. *Wound Repair Regen* 2006; 14:434-442
- Bodi I**, Bishopric NH, Discher DJ, Wu X, Webster KA. Cell-specificity and signaling pathway of endothelin-1 gene regulation by hypoxia. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 975 – 984
- Bosco MC**, Puppo M, Blengio F, Fraone T, Cappello P, Giovarelli M, Varesio L. Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. *Immunol* 2008; 213: 733 – 749
- Bosco MC**, Puppo M, Santangelo C, Anfosso L, Pfeffer U, Fardin P, Battaglia F, Varesio L. Hypoxia modifies the transcriptome of primary human monocytes: modulation of novel immune-related genes and identification of CC-chemokine ligand 20 as a new hypoxia-inducible gene. *J Immunol* 2006; 177: 1941 – 1955
- Bostrom P**, Magnusson B, Svensson PA, Wiklund O, Boren J, Carlsson LM, stahlman M, Oloffson SO, Hulten LM. Hypoxia converts human macrophages into triglyceride-loaded foam cells. *Arterioscler Thrombnb Vasc Biol* 2006 ; 26 : 1871 – 1876
- Bottinger EP**, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2600 – 2610
- Botusan IR**, Sunkari VG, Savu O, Catrina AI, Grünler J, Lindberg S, Pereira T, Ylä-Herttuala S, Poellinger L, Brismar K. Stabilization of HIF-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 19426 – 19431
- Boyapati L**, Wang HL. The role of stress in periodontal disease and wound healing. *Periodontol* 2007; 44: 1219 – 1222
- Boyce DE**, Ciampolini J, Ruge F, Murison MS, Harding KG. Inflammatory-cell subpopulations in keloid scars. *Br J Plast surg* 2001; 54: 511 – 516
-

- Boyle NH**, Roberts PC, Ng B, Berkenstadt H, McLuckie A, Beale RJ, Mason RC. Scanning laser Doppler is a useful technique to assess foot cutaneous perfusion during femoral artery cannulation. *Crit Care* 1999; 3: 95 – 100
- Brissett AE**, Sherris DA. Scar contractures, hypertrophic scars, and keloids. *Facial Plast surg* 2001; 17: 263 – 272
- Broughton G 2nd**, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing (retraction of Witte M, Barbul A. In: *Surg Clin north Am* 1997; 77: 509 – 528). *Plast Reconstr Surg* 2006 (a); 117: 12S – 34S
- Broughton G**. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117 (Suppl):1-32
- Brüne B**, Zhou J. Hypoxia-inducible factor-1alpha under the control of nitric oxide. *Methods Enzym*, 2007 (a); 435: 463 – 478
- Brüne B**, Zhou J. Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signalling. *Cardiovasc Res* 2007 (b); 75: 275 – 282
- Burgess C**. Topical vitamins. *J Drugs Dermatol* 2008; 7(7 Suppl): s2 – s6
- Burgess LC**, Kuntz D, Rice E, Fisher T, Burgess TP. Expression of angiogenic, inflammatory and cell cycle control RNAs from cells cultured from equine exuberant granulation tissue. 2005 Unpublished data.
- Burke B**, Giannoudis A, Corke KP, Gill D, Wells M, Ziegler-Heitbrock L, Lewis CE. Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-related gene therapy. *Am J Pathol* 2003; 163: 1233 – 1243
- Burmolle M**, Thomsen TR, Fazli M, Dige I, Christensen L, Homoe P, Tvede M, Nyvad B, Tolker-Nielsen T, Givsov M, Moser C, Kirteterp-Moller K, Johansen HK, Hoiby N, Jensen PO, Sorensen SJ, Bjarnsholt T. Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 59: 324 – 336
- Butler PD**, Longaker MT, Yang GP. Current progress in keloid research and treatment. *J Am Coll Surg* 2008; 206: 731 – 741
- Campos AC**, Groth AK, Branco AB. Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11: 281 – 288
- Carmeliet P**. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438: 932 – 936
-

- Carmeliet P.** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6:389-395
- Cassavaugh J, Lounsbury KM. Hypoxia-mediated biological control. *J Cell Biochem* 2011; 112: 735 – 744
- Catala M,** André JM, Katsanis G, Poirier J. Histologie: organes, systèmes et appareils PCEM2 – DCEM1. Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie. Université Pierre et Marie Curie, Paris, France 2008: 1 – 102
- Caufield RH,** Tyler MP, Austyn JM, Dziewulski P, McGrouther DA. The relationship between protease / antiprotease profile, angiogenesis and re-epithelialisation in acute burn wounds. *Burns* 2008; 34: 474 – 486
- Celeste CJ,** Deschene K, Riley CB, Theoret CL. Kinetics of blood flow and anatomical-site differences in tissue perfusion during wound healing in an equine model of cutaneous fibroproliferative disorder. Submitted to *Vet Surgery* 2011 (b)
- Celeste CJ,** Deschene K, Riley CB, Theoret CL. Regional differences in wound oxygenation during normal healing in an equine model of cutaneous fibroproliferative disorder. *Wound Repair Regen* 2011(a); 19:89 – 97
- Cha J,** Falanga V. Stem cells in cutaneous wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 25: 73 – 78
- Chan EC,** Jiang F, Peshavariya HM, Dusting GJ. Regulation of cell proliferation by NADPH oxidase-mediated signaling: potential roles in tissue repair, regenerative medicine and tissue engineering. *Pharmacol Ther* 2009; 122: 97 – 108
- Chandel NS,** McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumaker PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 2000; 275: 25130 – 25138
- Chang HY,** Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *PNAS* 2002; 99: 12877 – 12822
- Chao CYL,** Cheing GLY. Microvascular dysfunction in diabetic foot disease and ulceration. *Diabetes Metab Res Rev* 2009; 25: 604 – 614
- Chapman HA. Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis. *Annu Rev Physiol* 2011 ; 73 : 413 – 435
-

Chen W, Fu X, Ge S, Sun T, Zhou G, Jiang D, Sheng Z. Ontogeny of expression of transforming growth factor- β and its receptors and their possible relationship with scarless healing in human foetal skin. *Wound Repair Regen* 2005; 13: 68 – 75

Chipev CC, Simman R, Hatch G, Katz AE, Siegel DM, Simon M. Myofibroblast phenotype and apoptosis in keloid and palmar fibroblasts in vitro. *Cell Death Differ* 2000; 7: 166 – 176

Chodon T, Sugihara T, Igawa HH, Funayama E, Furukawa H. Keloid-derived fibroblasts are refractory to Fas-mediated apoptosis and neutralization of autocrine transforming growth factor-beta1 can abrogate this resistance. *Am J Pathol* 2000; 157: 1661 – 1669

Chou NY, Winchester LW. Retinal blood velocity measurements using laser speckle imaging. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2005; 2: 1716 – 1719

Christ F, Bauer A, Brugger D. Different optical methods for clinical monitoring of the microcirculation. *Eur Surg Res* 2002; 34: 145 – 151

Cimsit M, Uzun G, Yildiz S. Hyperbaric oxygen therapy as an anti-infective agent. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 1015 – 1026

Ciofu O, Riis B, Pressler T, Poulsen HE, Hoiby N. Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by lung chronic inflammation. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2276 – 2282

Clutterburck AL, Cochrane CA, Dolman J, Percival SL. Evaluating antibiotics for use in medicine using a poloxamer biofilm model. *Ann clin Microbiol Antimicrob* 2007 (b); 6:2 1 – 10

Clutterburck AL, Woods EJ, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA, Percival SL. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol* 2007 (a); 121: 1 – 17

Cochrane CA, Freeman KL, Knottenbelt DC. Effect of growth factors on the characteristics of cells associated with equine wound healing and sarcoid formation. *Wound Repair Regen* 1996; 4: 58 – 65

Colacino JM, Grubb B, Jobsis FF. Infra-red technique for cerebral blood flow: comparison with $^{133}\text{Xenon}$ clearance. *Neurol Res* 1981; 3: 17 – 31

- Colwell AA**, Longaker MT, Peter Lorenz H. Identification of differentially regulated genes in foetal wounds during regenerative repair. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 450 – 459
- 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
- Cornelisse CJ**, Robinson NE, Berney CA, Eberhart S, Hauptman JE, Derksen FJ: Thermographic study of in vivo modulation of vascular responses to phenylephrine and endothelin-1 by dexamethasone in the horse. *Equine Vet J* 2006; 38:119-126
- Costerton JW**, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappinscott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711 – 745
- Costerton JW**, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms : a common cause of persistent infections. *Science* 1999 ; 21 : 1318 – 1322
- Costerton JW**, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Erlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 2003; 112: 1466 – 1477
- Covello KL**, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC, Keith B. HIF-2alpha regulates Oct-4 : effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 2006 ; 20 : 557 – 570
- Craig SS**, DeBlois G, Schwartz LB. Mast cells in human keloid, small intestine, and lung by immunoperoxidase technique using a murine monoclonal antibody against tryptase. *Am J Pathol* 1986; 124: 427 – 435
- Cramer T**, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003; 112: 645 – 657
- Crickx B**. Histologie et histophysiologie de la peau et de ses annexes. *Ann Dermatol Venereol* 2005; 132: 8S5 – 48
- D'Souza J**, Goru J, Goru S, Brown J, Wughan ED, Rogers SN. The influence of hyperbaric oxygen on the outcome of patients treated for osteoradionecrosis: 8 year study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007; 36: 783 – 787
-

da Costa MA, Campos AC, Coelho JC, de Barros AM, Matsumoto HM. Oral glutamine and the healing of colonic anastomoses in rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2003; 27: 182 – 185

Das M, Dempsey EC, Reeves JT. Selective expansion of fibroblast subpopulations from pulmonary artery adventitia in response to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002 ; 282: L976 – 986

Davis SC, Cazzaniga AL, Ricotti C, Zalesky P, Hsu LC, Creech J, Eaglstein WH, Mertz PM: Topical oxygen emulsion: a novel wound therapy. *Arch Dermatol* 2007; 143:1252-1256

Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A, Welsh E, Eaglstein WH, Mertz PM. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 23 – 29

DeBacker D, Creteur J, Dubois MJ, Sakr Y, Roch M, Verdant C, Vincent JL. The effects of dobutamine on microcirculatory alterations in patients with septic shock are independent of its systemic effects. *Crit Care Med* 2006; 34: 403 – 408

DeBacker D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am j Respir Crit Care Med* 2002; 166: 98 – 104

DeBacker D, Hollenberg S, Boerma C, Goedhart P, Buchele G, Ospina-Tascon G, Dobbe I, Ince C. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit Care* 2007; 11: R101

DeMartin I, Theoret CL. Spatial and temporal expression of types I and II receptors for transforming growth factor beta in normal equine skin and dermal wounds. *Vet Surg* 2004; 33:70-76

Deschene K, Celeste CJ, Boerboom D, Theoret CL: Constitutive expression of HIF1A in keratinocytes during the repair of skin wounds in horses. *Wound Repair Regen* 2011; 19: 250 – 259

Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 2005; 13: 7 – 12

Desmouliere A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodelling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest* 2003; 83: 1689 – 1707

Bibliographie

- Desmouliere A**, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122: 103 – 111
- Desmouliere A**, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995; 146: 56 – 66
- Desmouliere A**, Rubbia-Brandt L, Abdiu A. Alpha-smooth muscle actin is expressed in a subpopulation of cultured and cloned fibroblasts and is modulated by gamma-interferon. *Exp Cell Res* 1992 ; 201: 64 – 73
- Dimitrijevic SD**, Paranjape S, Wilson JR, Gracy RW, Mills JG. Effect of hyperbaric oxygen on human skin cells in culture and in human dermal and skin equivalents. *Wound Repair Regen* 1999; 7: 53 – 64
- Dimitrijevic SD**, Paranjape S, Wilson JR, Gracy RW, Mills JG. Effect of hyperbaric oxygen on human skin cells in culture and in human dermal and skin equivalents. *Wound Repair Regen* 1999; 7: 53 – 64
- Direkze NC**, Forbes SJ, Brittan M, Hunt T, Jeffery R, Preston SL. Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice. *Stem cells* 2003; 21: 514 – 520
- Donlan RM**, Costerton JW. Biofilms : survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002 (a) ; 15 : 167 – 193
- Donlan RM**. Biofilms : microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002 (b) ; 8 : 881 – 890
- Douglass A**, Wallace K, Parr R, Park J, Durward E, Broadbent I, Barelle C, Porter AJ, Wright MC. Antibody-targeted myofibroblast apoptosis reduces fibrosis during sustained liver injury. *J Hepatol* 2008; 49: 88 – 98
- Driffield K**, Miller K, Bostock M, O'Neill AJ, Chopra I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1053 – 1056
- Dubuc V**, Lepault E, Theoret CL. Endothelial cell hypertrophy is associated with microvascular occlusion in horse wounds. *Can J Vet Res* 2006; 70:206-210
-

- Ducharme-Desjarlais M**, Celeste C, Lepault L, Theoret CL. Effect of a silicone-containing dressing on exuberant granulation tissue formation and repair in horses. *Am J Vet Res* 2005; 66:1133-1139
- Duffield JS**, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R, Iredale JP. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 2005; 115: 56 – 65
- Dugina V**, Alexandrova A, Chaponnier C. Rat fibroblasts cultured from various organs exhibit differences in alpha-smooth muscle actin expression, cytoskeletal pattern, and adhesive structure organization. *Exp Cell Res* 1998 ; 238: 481 – 490
- Duncan MR**, Berman B. Differential regulation of glycosaminoglycan, fibronectin, and collagenases production in cultured human dermal fibroblasts by interferon-alpha, -beta, and -gamma. *Arch Dermatol* 1990; 126: 1295 – 1302
- Edwards AD**, Wyatt JS, Richardson C, Delpy DT, Cope M, Reynolds EO. Cotside measurement of cerebral blood flow in ill newborn infants by near infrared spectroscopy. *Lancet* 1988; 2: 770 – 771
- Edwards R**, Harding KG. Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17: 91 – 96
- Elton TS**, Oparil S, Taylor GR, Hicks PH, Yang RH, Jin H, Chen YF. Normobaric hypoxia stimulates endothelin-1 gene expression in the rat. *Am J Physiol* 1992; 263: R1260 – 1264
- Emery CF**, Kiecolt-Glaser JK, Glaser R, Malarkey WB, Frid DJ. Exercise accelerates wound healing among healthy older adults: a preliminary investigation. *J Gerontol Med Sci* 2005; 60(A): 1432 – 1436
- English RS**, Shenefelt PD. Keloids and hypertrophic scars. *Dermatol Surg* 1999; 25: 631 – 638
- Erler JT**, Bennewith KL, Cox TR, Lang G, Bird D, Koong A, Le QT, Giaccia AJ. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer cell* 2009 ; 15 : 35 – 44
- Eskes AM**, Ubbink DT, Lubbers MA, Lucas C, Vermeulen H. Hyperbaric oxygen therapy: solution for difficult to heal acute wound? Systematic review. *World J Surg* 2011; 35: 535 – 542
-

- Essex TJ**, Byrne PO. A laser Doppler scanner for imaging blood flow in skin. *J Biomed Eng* 1991; 13: 189 – 194
- Evans E**, Rendell M, Bartek J, Connor S, Bamisedun O, Dovgan D, Giiter M. Thermally induced cutaneous vasodilatation in aging. *J Gerontol Med Sci* 1993; 48:53-57
- Falabella AF**, Falanga V. Wound healing. In: Fienkel R, Woodley DT, editors. *The biology of the skin*. New York: The Pathenon Publishing Group; 2001: 281 – 297
- Falanga V**, Kirsner RS. Low oxygen stimulates proliferation of fibroblasts seeded as single cells. *J Cell Physiol* 1993 (a); 154:506-510
- Falanga V**, Qian SW, Danielpour D, Katz MH, Roberts AB, Sporn MB: Hypoxia upregulates the synthesis of TGF-beta 1 by human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1991; 97:634-637
- Falanga V**, Zhou L, Yufit T: Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF-beta1. *J Cell Physiol* 2002; 191:42-50
- Falanga V**. Chronic wounds: pathophysiologic and experimental considerations. *J Invest Dermatol* 1993 (b); 100: 721 – 725
- Falanga V**. Classification for wound bed preparation and stimulation of chornic wounds. *Wound Repair Regen* 2000; 8: 347 – 352
- Fandray J**, Gorr TA, Gassman M. Regulatngcellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 642 – 651
- Fang H**, Hughes R, Murdoch C, Coffelt SB, Biswas SK, Harris AL, Johnson RS, Élmitiyaz HZ, Simon MC, Fredlund E. Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia. *Blood* 2009; 114: 844 – 859
- Favazza CP**, Jassim O, Cornelius LA, Wang LV: In vivo photoacoustic microscopy of human cutaneous microvasculature and a nevus. *J Biomed Opt* 2011; 16: 15-19
- Fife CE**, Hopf H. Discussion: Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg* 2011; 127 (Suppl): 142S – 143S
- Fong EP**, Bay BH. Keloids – the sebum hypothesis revisited. *Med Hypotheses* 2002; 58: 264 – 269
- Fong GH**. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis* 2008; 11: 121 – 140
-

- Freeman K**, Woods E, Welsby S, Percival SL, Cochrane CA. Biofilm evidence and the microbial diversity of horse wounds. *Can J Microbiol* 2009; 55: 197 – 202
- Friedman DW**, Boyd CD, Mackenzie JW, Norton P, Olson RM, Deak SB. Regulation of collagen gene expression in keloids and hypertrophic scars. *J Surg Res* 1993; 55: 214 – 222
- Fries RB**, Wallace WA, Roy S, Kuppusamy P, Bergdall V, Gordillo GM, Melvin WS, Sen CK: Dermal excisional wound healing in pigs following treatment with topically applied pure oxygen. *Mutat Res* 2005; 579:172-181
- Friesel RE**, Maciag T. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *FASEB J* 1995; 9: 919 – 925
- Fu X**, Shen Z, Guo Z, Zhang M, Sheng Z. Healing of chronic cutaneous wounds by topical treatment with basic fibroblast growth factor. *Chin Med J (Eng)* 2002; 115: 331 – 335
- Fujiwara M**, Muragaki Y, Ooshima A. Upregulation of transforming growth factor-beta 1 and vascular endothelial growth factor in cultured keloid fibroblasts: relevance to angiogenic activity. *Arch Dermatol Res* 2005; 297: 161 – 169
- Gabbiani G**. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 2003; 200: 500 – 503
- Gailit J**, Clark RA. Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 717 – 725
- Gallant-Behm CL**, Du P, Lin SM, Marucha PT, DiPietro LA, Mustoe TA. Epithelial regulation of mesenchymal tissue behavior. *J Invest Dermatol* 2011; Advance Online Publication
- Gallucci RM**, Simeonova PP, Matheson JM, Kommineni C, Guried JL, Sugawara T, Luster MI. Impaired wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. *FASEB J* 2000; 14: 2525 – 2531
- Gawronska-Kozak B**, Bogacki M, Rim JS, Monroe WT, Manuel JA. Scarless skin repair in immunodeficient mice. *Wound Repair Regen* 2006; 14: 265 – 276
- Ghaffari A**, Kilani RT, Ghahary A. Keratinocyte-conditioned media regulate collagen expression in dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 340 – 347
-

- Ghaffari A**, Li Y, Karami A, Ghaffari M, Tredget EE, Ghahary A. Fibroblast extracellular matrix gene expression in response to keratinocyte-release stratifin. *J Cell Biochem* 2006; 98: 383 – 393
- Ghahary A**, Karimi-Busheri F, Marcoux Y, Li Y, Tredget EE, Taghi KR. Keratinocyte-releasable stratifin functions as a potent collagenase-stimulating factor in fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1188 – 1197
- Ghahary A**, Tredget EE, Shen Q, Kilani RT, Scott PG, Houle Y. Mannose-6-phosphate/IGF-II receptors mediate the effects of IGF-1-induced latent transforming growth factor beta 1 on expression of type I collagen and collagenase in dermal fibroblasts. *Growth factors* 2000; 17: 167 – 176
- Gilliver SC**, Ashcroft GS. Sex steroids and cutaneous wound healing: the contrasting influences of estrogens and androgens. *Climacteric* 2007 (b); 10: 276 - 288
- Gilliver SC**, Ashworth JJ, Ashcroft GS. The hormonal regulation of cutaneous wound healing. *Clin Dermatol* 2007 (a); 25: 56 – 62
- Gjodsbol K**, Christensen JJ, Karlsmark T, Jorgensen B, Klein BM, Krogfelt KA. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J* 2006; 3: 225 – 231
- Glaser R**, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 243 – 251
- Godbout JP**, Glaser R. Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006; 1: 421 – 427
- Gogia PP**. Physiology of wound healing. In: *Clinical wound management*. Gogia PP, editor. Thorofare, NJ: slack Incorporated, pp 8 – 12
- Goodson WH III**, Andrews WS. Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. *Surgery* 1984; 96: 48 – 54
- Gordan JD**, Thompson CB, Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell* 2007; 12: 108 – 113
- Gordillo GM**, Roy S, Khanna S, Schlanger R, Khandelwal S, Phillips G, Sen CK: Topical oxygen therapy induces vascular endothelial growth factor expression and
-

improves closure of clinically presented chronic wounds. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35:957-964

Gordillo GM, Sen CK. Revisiting the essential role of oxygen in wound healing. *Am J surg* 2003; 186: 259 – 263

Görlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, Kietzmann T, Busse R. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 2001; 89: 47 – 54

Gosain A, DiPietro LA. Aging and wound healing. *World J surg* 2004; 28: 321 – 326

Gottrup F. Oxygen in wound healing and infection. *World J Surg* 2004; 28: 312 – 315

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

Grief R, Akca O, Horn E-P, Kurz A, Sessler D. Supplemental perioperative oxygen to reduce the incidence of surgical wound infection. *N Engl J Med* 2000; 342: 161 – 167.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86: 494 – 501

Grinnell F, Zhu M, Parks WC. Collagenase-1 complexes with alpha2-macroglobulin in the acute and chronic wound environments. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 771 – 776

Groner W, Winkelman JW, Harris AG, Ince C, Bouma GJ, Messmer K, Nadeau RG. Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation. *Nat Med* 1999; 5: 1209 – 1212

Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010; 89:219-229

Gurtner GC, Callaghan MJ, Longaker MT. Progress and potential for regenerative medicine. *Annu Rev Med* 2007; 58: 299 – 312

Gurtner GC, Werner SW, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453: 314 – 321

Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Desmouliere A. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 135 – 151

Guyton AC, Hall JE: Local and humoral control of blood flow, in Guyton AC, Hall JE (eds): Textbook of medical physiology 11th ed; Philadelphia, PA, W.B. Saunders Company 2006 (c), pp 195 – 203

Guyton AC, Hall JE: Physical principles of gas exchange; diffusion of oxygen and carbon dioxide through the respiratory membrane, in Guyton AC, Hall JE (eds): Textbook of medical physiology 11th ed; Philadelphia, PA, W.B. Saunders Company 2000 (a), pp 491 – 501

Guyton AC, Hall JE: Transport of oxygen and carbon dioxide in blood and body fluids, in Guyton AC, Hall JE (eds): Textbook of medical physiology 11th ed; Philadelphia, PA, W.B. Saunders Company 2006 (b), pp 502 – 513

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

Häkkinen L, Koivisto L, Gardner H, Saarialho-Kere U, Carroll JM, Lakso M, Rauvala H, Laato M, Heino J, Larjava H. Increased expression of beta6-integrin in skin leads to spontaneous development of chronic wounds. *Am J Pathol* 2004; 164: 229 – 242

Häkkinen L, Westermarck J, Kähäri VM, Larjava H: Human granulation-tissue fibroblasts show enhanced proteoglycan gene expression and altered response to TGF-beta 1. *J Dent Res* 1996; 75:1767-1768

Hales JRS, Jessen C, Fawcett AA, King RB. Skin AVA and capillary dilation and constriction induced by local skin heating. *Pflug Archiv* 1985; 404:203-207

Hama Y, Matsumoto K, Murugesan R, Subramanian S, Devasahayam N, Koscielniak JW, Hyodo F, Cook JA, Mitchell JB, Krishna MC. Continuous wave EPR oximetric imaging at 300 MHz using radiofrequency power saturation effects. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 1709 – 1716

Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2009 ; 21 : 894 – 899

Handrey J, Gorr TA, Gassmann M. Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 642 – 651

Hardman MJ, Ashcroft GS. Estrogen, not intrinsic aging, is the major regulator of delayed human wound healing in the elderly. *Genome Biol* 2008; 9: R80

Bibliographie

- Harper RA, Grove G. Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis: differences in growth potential in vitro. *Science* 1979 ; 204: 526 – 527
- Harris AL.** Hypoxia – a key regulator in tumor growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 38 – 47
- Hart J.** Inflammation. 1: its role in the healing of acute wounds. *J Wound Care* 2002; 11: 548 – 556
- Head MJ,** Dyson S. Talking the temperature of equine thermography. *Vet J* 2001; 162:166 – 167
- Hecht N,** Woitzik J, Dreier JP, Vajkoczy P. Intraoperative monitoring of cerebral blood flow by laser speckle contrast analysis. *Neurosurg Focus* 2009; 27: E11
- Hentzer M.** *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, quorum sensing, and quorum sensing inhibitors. Thesis / Dissertation. Technical university of Denmark, 2001
- Herdrich BJ,** Danzer E, Davey MG, Bermudez DM, Radu A, Zhang L, Zhang Z, Soslowsky LJ, Liechty KW. Foetal tendon wound size modulates gene expression and subsequent wound phenotype. *Wound Repair Regen* 2010; 18: 543 – 549
- Higgins DF,** Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt KU, Iwano M, Haase VH. Hypoxia promotes fibrogenesis via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2007; 117: 3810 – 3820
- Higgins DF,** Kimura K, Iwano M, Haase VH. Hypoxia-inducible factor signalling in the development of tissue fibrosis. *Cell Cycle* 2008; 7: 1128 – 1132
- Hinz B,** Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 2001(a); 12: 2730 – 2741
- Hinz B,** Gabbiani G, Chaponnier C. The NH₂-terminal peptide of alpha-smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo. *J Cell Biol* 2002; 157: 657 – 663
- Hinz B,** Gabbiani G. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodelling. *Thromb Haemost* 2003 (a); 90: 993 – 1002
- Hinz B,** Gabbiani G. Fibrosis: recent advances in myofibroblast biology and new therapeutic perspectives. *F1000 Biol Rep* 2010 (a) Nov11; 2:78 1 – 5
-

- Hinz B**, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol* 2003 (b); 14: 538 – 546
- Hinz B**, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am j Pathol* 2001 (b); 159: 1009 – 1020
- Hinz B**, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 2007 (a); 170: 1807 – 1816
- Hinz B**, Pittet P, Smith-Clerc J, Chaponnier C, Meister JJ. Myofibroblasts development is characterized by specific cell-cell adherens junctions, *Mol Biol Cell* 2004; 15: 4310 – 4320
- Hinz B**. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 2007 (b); 127: 526 – 537
- Hinz B**. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech* 2010 (b); 43: 146 – 155
- Hoiby N**, Bjarnholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrobials Agents* 2010; 35: 322 – 332
- Holder TE, Schumacher J, Donnell RL, Rohrbach BW, Adair HS. Effects of hyperbaric oxygen on full-thickness meshed sheet skin grafts applied to fresh and granulating wounds in horses. *Am J Vet Res* 2008; 69: 144 – 147
- Hong YK**, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Hirakawa S, Kunstfeld R, Brown LF, Bohlen P, Senger DR, Detmar M. VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins *FASEB J* 2004; 18: 1111 – 1113
- Hongo K**, Kobayashi S, Okudera H, Hokama M, Nakagawa F. Noninvasive cerebral optical spectroscopy: depth-resolved measurements of cerebral haemodynamics using indocyanine green. *Neurol Res* 1995; 17: 89 – 93
- Hopf HW**, Gibson JJ, Angeles AP, Constant JS, Feng JJ, Rollins MD, Zamirul Hussain M, Hunt TK. Hyperoxia and angiogenesis. *Wound Repair Regen* 2005; 13: 558 – 564
- Hopf HW**, Hunt TK, Rosen N. Supplemental oxygen and risk of surgical site infection. *JAMA* 2004 ; 291: 1956 – author reply 58 – 59.
-

- Hopf HW**, Hunt TK, West JM, Blomquist P, Goodson WH 3rd, Jensen JA, Jonsson K, Paty PB, Rabkin JM, Upton RA, von Smitten K, Whitney JD. Wound tissue oxygen tension predicts the risk of wound infection in surgical patients. *Arch Surg* 1997; 132: 997 – 1004
- Hopf HW**, Hunt TK. Comparison of Clark electrode and optode for measurement of tissue oxygen tension. *Adv Exp Med Biol* 1994; 345: 841 – 847
- Hopf HW**, Rollins MD. Wounds: an overview of the role of oxygen. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9:1183-1192
- Hopf HW**. Development of subcutaneous wound oxygen measurement in humans: contributions of Thomas K Hunt, MD. *Wound Repair Regen* 2003; 11:424-430
- Hu CJ**, Wang L, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor-1-alpha and HIF-2-alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 9361 – 9374
- Huang LE**, Bunn HF. Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance. *J Biol Chem* 2003; 278: 19575 – 19578
- Humphreys BD**, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblast in kidney fibrosis. *Am J Pathol* 2010; 176: 85 – 97
- Hunt TK**, Hussain Z. wound microenvironment. In: Cohen IK, Diegelmann RF, Limblad WJ, editors *Wound healing: biochemical and clinical aspects*. Philadelphia: WB Saunders; 1992: 274 – 28
- Hunt TK**, Niinikoski J, Zederfeldt B. Role of oxygen in repair processes. *Acta Chir Scand* 1972; 138: 109 – 110
- Huss JM**, Levy FH, Kelly DP. Hypoxia inhibits the peroxisome proliferator-activated receptor alpha/retinoid X receptor gene regulatory pathway in cardiac myocytes : a mechanism for O₂-dependent modulation of mitochondrial fatty acid oxidation. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 27605 – 27612
- Imai T**, Horiuchi A, Wang C, Oka K, Ohira S, Nikaido T, Konishi I. Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am J Pathol* 2003 ; 163 : 1437 – 1447
-

- Imhof BA**, Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 432 – 444
- Imtiyaz HZ**, Williams EP, Hickey MM, Patel SA, Durham AC, Yuan LJ, Hammond R, Gimotty PA, Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest* 2010; 120: 2699 – 2714
- Ince M**, Sinasappel M. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Crit Care Med* 1999; 27: 1369 – 1377
- Isenberg JS**, Ridnour LA, Graham Espey M, Wink DA. Nitric oxide in wound-healing. *Microsurgery* 2005; 25: 442 – 451
- Ishii C**, Sangai T, Sugiyama K, Ito T, Hasebe T, Endoh Y, Magae J, Ochiai A. In vivo characterization of bone-marrow derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. *Stem Cells* 2005; 23: 699 – 706
- Ives CL**, Harrison DK, Stansby GS. Tissue oxygen saturation, measured by near-infrared spectroscopy, and its relationship to surgical-site infections. *British J Surg* 2007; 94: 87 – 91
- Jaap AJ**, Shore AC, Gartside IB, Gamble J, Tooke JE. Increased microvascular fluid permeability in young type I (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1993; 36: 648 – 652
- Jacinto A**, Martinez-Arias A, Martin P. Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat Cell Biol* 2001; 3: E117 – E123
- Jacobs KA**, Leach DH, Fretz PB, Barber SM. Comparative aspects of the healing of excisional wounds on the leg and body of horses. *Vet Surg* 1984; 13: 83 – 90
- Jameson J**, Havran WL. Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol Rev* 2007; 215: 114 – 122
- Jenkins RG**, Su X, Scotton CJ, Camere E, Laurent GJ, Davis GE, Chambers RC, Matthay MA, Sheppard D. Ligation of protease-activated receptor I enhances alpha(v)beta6 integrin-dependent TGF-beta activation and promotes acute lung injury. *J Clin Invest* 2006; 116: 1606 – 1614
-

- Jensen JA**, Hunt TK, Scheuenstuhl H, Banda MJ. Effect of lactate, pyruvate and PH on secretion of angiogenesis and mitogenesis factors by macrophages. *Lab Invest* 1986; 54: 574 – 578
- Jiang F**, Zhang Y, Dusting GJ. NADPH oxidase-mediated redox signalling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol Rev* 2011; 63: 218 – 242
- Jiang YL**, Dai AG, Li QF. Transforming growth factor-beta1 induces transdifferentiation of fibroblasts into myofibroblasts in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Acta Biochim Biophys Sin* 2006 ; 38: 29 – 36
- Jimenez SA**, Freundlich B, Rosenbloom J. Selective inhibition of human diploid fibroblast collagen synthesis by interferons. *J Clin Invest* 1984; 74: 1112 – 1116
- Jonsson K**, Jensen JA, Goodson WH. Tissue oxygenation, anemia, and perfusion in relation to wound healing in surgical patients. *Ann Surg* 1991; 214: 605 – 613
- Juckett G**, Hartman-Adams H. Management of keloids and hypertrophic scars. *Am Fam Physician* 2009; 80: 253 – 260
- Kaelin WG Jr.** How oxygen makes its presence felt. *Genes Dev* 2002; 16: 1441 – 1445
- Kaelin WG**, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 2008 (a); 30: 393 – 402
- Kaelin WG.** ROS: really involved in oxygen sensing. *Cell Metab* 2005; 1: 357 – 358
- Kaelin WG.** The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 865 – 873
- Kairuz E**, Upton Z, Dawson RA, Malda J. Hyperbaric oxygen stimulates epidermal reconstruction in human skin equivalents. *Wound Repair Regen* 2007; 15: 266 – 274
- Kalliainen LK**, Gordillo GM, Schlanger R, Sen CK: Topical oxygen as an adjunct to wound healing: a clinical case series. *Pathophysiology* 2003; 9:81-87
- Kelly BD**, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, Rowan A, Yan Z, Campochiaro PA, Semenza GL. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res* 2003; 93: 1074 – 1081
-

- Kemmling A**, Duning T, Lemcke L, Nierdstadt T, Minnerup J, Wersching H, Marziniak M: Case report of MR perfusion imaging in sinking flap syndrome: growing evidence for hemodynamic impairment. *BMC Neurol* 2010; 10:80
- Keren I**, Kaldalu N, Spoering A, Wang YP, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 230: 13 – 18
- Keylock KT**, Vieira VJ, Wallig MA, DiPietro LA, Schrementi M, Woods JA. Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294: R179 – R184
- Khaodhiar L**, Dinh T, Schomacker KT, Panasyuk SV, Freeman JE, Lew R, Vo T, Panasyuk AA, Lima C, Giurini JM, Lyons TE, Veves A. The use of medical hyperspectral technology to evaluate microcirculatory changes in diabetic foot ulcers and to predict clinical outcomes. *Diabetes Care* 2007; 30:903-910
- Khoo YT**, Ong CT, Mukhopadhyay A, Han HC, Do DV, Lim IJ, Phan TT. Upregulation of secretory connective tissue growth factor (CTGF) in keratinocyte-fibroblast coculture contributes to keloid pathogenesis. *J Cell Physiol* 2006; 208: 336 – 343
- Khoosal D**, Goldman RD. Vitamin E for treating children's scars. Does it help reduce scarring. *Can Fam Physician* 2006; 52: 855 – 856
- Kim KK**, Wei Y, Szekeres C, Kugler MC, Wolters PJ, Hill ML, Frank JA, Brumwell AN, Wheeler SE, Kreidberg JA, Chapman HA. Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2009 ; 119 : 213 – 224
- Kino-oka M**, Agatahama Y, Haga Y, Inoie M, Taya M. Long-term subculture of human keratinocytes under an anoxic condition. *J Biosci Bioeng* 2005 ; 100 : 119 – 122
- Kirketerp-Moller K**, Jensen PO, Fazli M, Madsen KG, Pedersen J, Moser C, Tolker-Nielsen T, Hoiby N, Givskov M, Bjarnsholt T. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2712 – 2722
- Kischer CW**, Thies AC, Chvapil M. Perivascular myofibroblasts and microvascular occlusion in hypertrophic scars and keloids. *Hum Pathol* 1982; 13: 819 – 824
- Kischer CW**. The microvessels in hypertrophic scars, keloids and related lesions: review. *Submicrosc Cytol Pathol* 1992; 24: 281 – 96
-

- Klapka N**, Müller HW. Collagen matrix in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2006; 23: 422 – 431
- Klein L**. Pharmacologic therapy for patients with chronic heart failure and reduced systolic function: review of trials and practical considerations. *Am J Cardiol* 2003; 91: 18F – 40F
- Klimova T**, Chandel NS. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ* 2008; 15: 660 – 666
- Knottenbelt DC**. Basic wound management, in Knottenbelt DC (ed): *Handbook of equine wound management*; London, UK, Saunders, 2003, pp 54-73
- Knotzer H**, Hasibeder WR. Microcirculatory function monitoring at the bedside – a view from the intensive care. *Physiol Meas* 2007; 28: R65 – 86
- Knowles HJ**, Harris AL. Macrophages and the hypoxic tumor environment. *Front Biosci* 2007; 12: 4298 – 4314
- Kohl R**, Zhou J, Brune B. Reactive oxygen species attenuate nitric-oxide-mediated hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 1430 – 1442
- Kohlenberg E**, Payette JR, Sowa MG, Levasseur MA, Riley CB, Leonardi L. Determining intestinal viability by near infrared spectroscopy: A veterinary application. *Vibration Spectroscopy*
- Kolpen M**, Hansen Cr, Bjarnsholt T, Moser C, Christensen LD, vanGennip m. Polymorphonuclear leucocytes consume oxygen in sputum from chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. *Thorax* 2010; 65: 57 – 62
- Krick S**, Hanze J, Eul B. Hypoxia-driven proliferation of human pulmonary artery fibroblasts: cross-talk between HIF-1alpha and an autocrine angiotensin system. *FASEB J* 2005 ; 19: 857 – 859
- Kukreja RC**, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986; 59: 612 – 619
- Kültz D**. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol* 2005; 67: 225 – 257
-

- Kumari R**, Willing LB, Krady JK, Vannucci SJ, Simpson IA. Impaired wound healing after cerebral hypoxia-ischemia in the diabetic mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 710 – 718
- Kurz H**, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *New Physiol Sci* 2003; 18: 65 – 70
- Ladin DA**, Hou Z, Patel D, McPhail M, Olson JC, Saed GM, Fivenson DP. p53 and apoptosis alterations in keloids and keloid fibroblasts. *Wound Repair Regen* 1998; 6: 28 – 37
- Lambert AJ**, Brand MD. Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J* 2004; 382: 511 – 517
- Lambeth JD**, Kawahara T, Diebold B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 319 – 331.
- Landau Z**, David M, Aviezer D, Yayon A. Heparin-like inhibitory activity to fibroblast growth factor-2 in wound fluids of patients with chronic skin ulcers and its modulation during wound healing. *Wound Repair Regen* 2001; 9: 323 – 328
- Lando D**, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch. *Science* 2002; 295: 858 – 861
- Langer S**, Harris AG, Biberthaler P, von Dobschuetz E, Messmer K. Orthogonal polarization spectral imaging as a tool for the assessment of hepatic microcirculation: a validation study. *Transplantation* 2001; 71: 1249 – 1256
- Langer S**, Hatz R, Harris AG, Hernandez-Richter T, Maiwald G, Messmer K. Assessing the microcirculation in a burn wound by use of OPS imaging. *Eur J Med Res* 2001; 6: 231 – 234
- Le Poole I**, Boyce ST. Keratinocytes suppress transforming growth factor-beta 1 expression by fibroblasts in cultured skin substitutes. *Br J Dermatol* 1999; 140: 409 – 416
- Lee JS**, Semela D, Iredale J, Shah VH. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte ? *Hepatology* 2007; 45: 817 – 825
-

Lee TY, Chin GS, Kim WJ, Chau D, Gittes GK, Longaker MT. Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids. *Ann Plast Surg* 1999; 43: 179 – 184

Leibovitch SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 1975; 78: 71 – 100

Leiper J, Nandi M. The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10: 277 – 291

Lepault E, Céleste C, Doré M, Martineau D, Theoret CL. Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse. *Wound Repair Regen* 2005; 13:520-529

Leufgen H, Bihl MP, Rudiger JJ. Collagenase expression and activity is modulated by the interaction of collagen types, hypoxia, and nutrition in human lung cells. *J Cell Physiol* 2005 ; 204: 146 – 154

Levet T, Martens A, Devisscher L, Duchateau L, Bogaert L, Vlaminck L: Distal limb cast sores in horses: risk factors and early detection using thermography. *Equine Vet J* 2009; 41:18-23

Lewis CD, De Plama M, Naldini L. Tie2-expressinf monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2. *Cancer Res* 2007; 67: 8429 – 8432

Lewis JS, Lee JA, Underwood JCE, Harris AL, Lewis CE. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J. Leukoc Biol* 1999; 66: 889 – 900

Li Y, Fan J, Chen M, Li W, Woodley DT. Transforming growth factor-alpha: a major human serum factor that promotes human keratinocyte migration. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2096 – 2105

Liang Y, fortune B, Cull G, Cioffi GA, Wang L. Quantification of dynamic blood flow autoregulation in optic nerve head of rhesus monkeys. *Exp Eye Res* 2010; 90: 203 – 209

Liechty KL, Crombleholme TM, Adzick NS. Decreased IL-6 in scarless human foetal repair. *Cytokine* 2000 (a); 12: 671 – 676

Liechty KL, Crombleholme TM, Cass DL, Martin B, Adzick NS. Diminished interleukin-8 (IL-8) production in the foetal wound healing response. *J Surg Res* 1998; 77: 80 – 84

Liechty KL, Kim HB, Adzick NS, Crombleholme TM. Foetal wound repair results in scar formation in interleukin-10 (IL-10) deficient mice in a syngeneic murine model of scarless foetal wound repair. *J Pediatr Surg* 2000 (b); 35: 866 – 873

Lim IJ, Phan TT, Bay BH, Qi R, Huynh H, Tan WT, Lee ST, Longaker MT. Fibroblasts cocultured with keloid keratinocytes: normal fibroblasts secrete collagen in a keloidlike manner. *Am J Cell Physiol* 2002; 283: C212 – C222

Liu ZJ, Velazquez OC. Hyperoxia, endothelial cell mobilization, and diabetic wound healing. *Antiox Redox signal* 2008; 10: 1869 – 1882

Lobmann R, ambrosch A, Schultz G, Waldmann K, Shiweck S, Lehnert H. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and nondiabetic patients. *Diabetologia* 2002; 45: 1011 – 1016

Lokmic Z, Darby IA, Thompson EW, Mitchell GM. Time course analysis of hypoxia, granulation tissue and blood vessel growth, and remodeling in healing cutaneous incisional primary intention wounds. *Wound Repair Regen* 2006; 14: 277 – 288

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

Lyder CH, Preston J, Grady JN, Scinto J, Allman R, Bergstrom N, Rodeheaver G. Quality of care for hospitalized medicare patients at risk for pressure ulcers. *Arch Intern Med* 2001; 161: 1549 – 1554

Lynam EC, Xie Y, Loli B, Dargaville TR, Leavesley DI, George GA, Upton Z. The effect of amphiphilic siloxane oligomers on fibroblast and keratinocyte proliferation and apoptosis. *J Biomed Mater Res A* 2010 ; 95 : 620 – 631

Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular cell* 2010; 40: 294 – 295

Mak P, Leav I, Pursell B, Bae D, Yang X, Taglienti CA, Gouvin LM, Sharma VM, Mercurio AM. ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization : implications for Gleason grading. *Cancer Cell* 2010 ; 17 : 319 – 332

Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JGN, Semenza GL. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005; 105: 659 – 669

Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005; 15: 659 – 669

Manley DM, Xiang B, Kupriyanov VV. Visualization and grading of regional ischemia in pigs in vivo using near-infrared and thermal imaging. *Can J Physiol Pharmacol* 2007; 85:382-395

Manning TO, Monteiro-Riviere NA, Bristol DG, Riviere JE. Cutaneous laser-Doppler velocimetry in nine animal species. *Am J Vet Res* 1991; 52:1960-1964

Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M. Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia. *Kidney Int* 2004 ; 65: 871 – 880

Manothan K, Iwano M, Higgins DF, Yamaguchi Y, Nakatani K, Harada K, Kubo A, Akai Y, Rankin EB, Neilson EG, Haase VH, Saito Y. Stable expression of HIF-1alpha in tubular epithelial cells promotes interstitial fibrosis. *Am J Renal Physiol* 2008; 295: F1023 – F1029

Martin P, Feng Y. Inflammation: wound healing in zebrafish. *Nature* 2009; 459: 921 – 923

Massague J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 169 – 178

Mathieu DE, Linke JC, Wattel F. Non-healing wounds. In: *Handbook on hyperbaric medicine*, Mathieu DE, editor. Netherlands: Springer, 2006 pp: 401 – 427

Mathura KR, Bouma GJ, Ince C. Abnormal microcirculation in brain tumours during surgery. *Lancet* 2001; 358: 1698 – 1699

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

Medina A, Scott PG, Ghahary A, Tredget EE. Pathophysiology of chronic nonhealing wounds. *J Burns Care Rehab* 2005; 26: 306 – 319

Menendez D, Inga A, Snipe J, Krysiak O, Schonfelder G, Resnick MA. A single-nucleotide polymorphism in a half-binding site creates p53 and estrogen receptor control

of vascular endothelial growth factor receptor 1. *Molecular and Cellular Biology* 2007; 27: 2590 – 2600

Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelman RF. Impaired wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 25:19-25

Menzel M, Soukup J, Henze D, Engelbrecht K, Senderreck M, Scharf A, Rieger A, Grond S. Experiences with continuous intra-arterial blood gas monitoring: precision and drift of a pure optode-system. *Intensive Care Med* 2003; 29: 2180 – 2186

Meran S, Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Path* 2011 Epub ahead of print

Merla A, Di Romualdo S, Di Donato L, Proietti M, Salsano F, Romanii GL. Combined thermal and laser Doppler imaging in the assessment of cutaneous tissue perfusion. In *Proceedings of the 29th Annual International Conference of the IEEE EMBS, Cité Internationale, Lyon, France, August 23-26, 2007*, pp 2630-2633

Mescher AL, Nef AW. Regenerative capacity and the developing immune system. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005; 93: 39 – 66

Meszáros AJ, Recihner JS, Albina JE. Macrophage-induced neutrophil apoptosis. *J Immunol* 2000; 165: 435 – 441

Metinko AP, Kunkel SL, Standiford TJ, Strieter RM. Anoxia-hyperoxia induces monocyte-derived interleukin-8. *J Clin Invest* 1992; 90: 791 – 798

Metzen E, Ratcliffe PJ. HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing. *Biol Chem* 2004; 385: 223 – 230

Meyer LJ, Russel SB, Russel JD, Trupin JS, Egbert BM, Shuster S, Stern R. Reduced hyaluronan in keloid tissue and cultured keloid fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 953 – 959

Micera A, Vigneti E, Pickholtz D, Reich R, Pappo O, Bonini S. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role to this factor in tissue repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6162 – 6167

Mills RE, Taylor KR, Podshilova K, McKay DB, Jameson JM. Defects in skin γ delta T-cell function contribute to delayed wound repair in rapamycin-treated mice. *J Immunol* 2008; 181: 3974 – 3983

Milovanova TN, Bhopale VM, Sorokina EM, Moore JS, Hunt TK, Hauer-Jensen M, Velazquez OC, Thom SR. Lactate stimulates vasculogenic stem cells via the thioredoxin system and engages an autocrine activation loop involving hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 2008 ; 28 : 6248 – 6261

Miragliotta V, Lefebvre-Lavoie J, Lussier JG, Theoret CL. Equine CTNNB1 and PECAM1 nucleotide structure and expression analyses in an experimental model of normal and pathological wound repair. *BMC Physiol* 2008 (a); 8:1

Miragliotta V, Lefebvre-Lavoie J, Lussier JG, Theoret CL. OB-cadherin cloning and expression in a model of wound repair in horses. *Equine Vet J* 2008 (b); 40: 643 – 648

Miragliotta V, Lefebvre-Lavoie J, Lussier JG, Theoret CL. Equine ANXA2 and MMP-1 expression in an experimental model of normal and pathological wound repair. *J Dermatol Sci* 2008 (c); 5: 103 – 112

Miyata T, Takizawa S, van Ypersele de Strihou C. Hypoxia. 1. Intracellular sensors for oxygen and oxidative stress : novel therapeutic targets. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011 ; 300 : C226 – 231

Modaresi A, Pietramaggiore G, Godbout C, Vigato E, Pittet B, Hinz B. Hypoxia impairs skin myofibroblast differentiation and function. *J Invest Dermatol* 2010; 130:2818-2817

Molin S, Tolker-Nielsen T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* 2003; 14: 255 – 261

Mori L, Bellini A, Stacey MA, Schmidt M, Mattoli S. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from bone marrow. *Exp Cell Res* 2005; 304: 81 – 90

Mosimann W, Kolher T. *Zytologie, Histologie und mikroskopische anatomie der haussaegetiere*. Verlag Paul Parey 1990: 257 – 284

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 958 – 969

Moulin V, Tam BY, Castilloux G, Auger FA, O'Connor-McCourt MD, Philip A, Germain L. Fetal and adult human skin fibroblasts display intrinsic differences in contractile capacity. *J Cell Physiol* 2001; 188: 211 – 222

Bibliographie

- Murakami M**, Lopez-Garcia B, Braff M, Dorschner RA, Gallo RL. Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. *J Immunol* 2004; 172: 3070 – 3077
- Murari K**, Li N, Rege A, Jia X, All A, Thakor N. Contrast-enhanced imaging of cerebral vasculature with laser speckle. *Appl Opt* 2007; 46: 5340 – 5346
- Murdoch C**, Muthana M, Lewis CE. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J Immunol* 2005; 175: 6257 – 6263
- Murohara T**, Witzenbichler B, Spyridopoulos I et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1999; 19: 1156 – 1161
- Murray AK**, Moore TL, Manning JB, Taylor C, Griffiths CE, Herrick AL. Noninvasive imaging techniques in the assessment of scleroderma spectrum disorders. *Arthritis Rheum* 2009; 61:1103-1111
- Mustoe TA**, O'Shaughnessy KO, Kloeters O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117:35S-41S
- Myllyla R**, Tuderman L, Kivirikko KI. Mechanism of the prolyl hydroxylase reaction. 2. Kinetic analysis of the reaction sequence. *Eur J Biochem* 1977; 80: 349 – 357
- Nagase H**, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPS. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 562 – 573
- Namiki A**, Brogi E, Kearney M et al. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol chem* 1995; 270: 31189 – 31195
- Nassiri M**, Woolery-Lloyd H, Ramos S, Jacob SE, Gugic D, Viciano A, Romanelli P, elgart G, Berman B, Vincek V. Gene expression profiling reveals alteration of caspase 6 and 14 transcripts in normal skin of keloid-prone patients. *Arch Dermatol Res* 2009; 301: 183 – 188
- Neilson EG**. Plasticity, nuclear diapause, and a requiem for the terminal differentiation of epithelia. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1995 – 1998
- Nicosia RF**, Nicosia SV, Smith M. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* 1994; 145: 1023 – 1029
-

- Niessen, F**, Spauwen P, Schalkwijk J, Kon M. On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review. *Plast Reconstr Surg* 1999; 104: 1435 – 3458
- Niethammer P**, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 2009; 459: 996 – 999
- Nivens DE**, Ohman DE, Williams J, Franklin MJ. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J Bacteriol* 2001; 183: 1047 – 1057
- Nonomura Y**, Mizoguchi F, Suzuki A, Nanki T, Kato H, Miyasaka N, Kohsaka H. Hypoxia-induced abrogation of contact-dependent inhibition of rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation. *J Rheumatol* 2009 ; 36 : 698 – 705
- Nordsmark M**. Direct measurements of tumor-tissue pO₂. A way of selecting patients for hyperoxic treatment. *Strahlenther Onkol* 1996: 172 (Suppl2): 8 – 9
- Nouvong A**, Hoogwerf B, Mohler E, Davis B, Tajaddini A, Medenilla E. Evaluation of diabetic foot ulcer healing with hyperspectral imaging of oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin. *Diabetes Care* 2009; 32:2056-2061
- O’Kane S**, Ferguson MW. Transforming growth factors beta and wound healing. *Int J Biochem Cell Biology* 1997; 29: 63 – 78
- O’Sullivan ST**, O’Shaughnessy M, O’Connor TP. Aetiology and management of hypertrophic scars and keloids. *Ann R Coll Surg Engl* 1996; 78 (Part1): 168 – 175
- O’Toole EA**, Goel M, Woodley DT. Hydrogen peroxide inhibits human keratinocyte migration. *Dermatol Surg* 1996; 22: 525 – 529
- O’Toole EA**, Marinkovitch P, Peavey CL, Amieva MR, Furthmayr H, Mustoe TA, Woodley DT. Hypoxia increases human keratinocyte motility on connective tissue. *J Clin Invest* 1997; 100: 2881 – 2891
- Okada H**, Danoff TM, Kalluri R. Early role of FSP1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol* 1997; 273: F563 – 574
- Orgill DP**, Bayer LR. Update on negative-pressure wound therapy. *Plast Reconstr Surg* 2011; 127 (Suppl): 105S – 115S
- Otto K**. Biophysical approaches to study the dynamic process of bacterial adhesion. *Res Microbiol* 2008; 159: 415 – 422
-

- Pallet N**, Anglicheau D. Transition épithélio-mésenchymateuse: aspects fondamentaux. *Actualités Néphrologiques* 2008; 87 – 98
- Pappert D**, Rossaint R, Lewandowski K, Kuhlen R, Gerlach H, Falke KJ. Preliminary evaluation of a new continuous intra-arterial blood gas monitoring device. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1995; 107: 67 – 70
- Parameswaran N**, Patial S. Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2010; 20: 87 – 103
- Park JE**, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg* 2004; 187: 11 – 16
- Park JE**, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 1317 – 1326
- Pascoe DD**, Mercer JB, deWeerd L. Physiologies of thermal signals, in Diakides NA, Bonzimo JD (eds): *The Biomedical Engineering Handbook 3rd edition*; New York, NY, CRC press Taylor & Francis, 2006, pp 1-20
- Patel VA**, Logan A, Watkinson JC, Uz-Zaman S, Sheppard MC, Ramsden JD, Eggo M. Isolation and characterization of human thyroid endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metabolism* 2003, 284: E168 – E176
- Payne WG**, Ochs DE, Meltzer DD, Hill DP, Mannari RJ, Robson LE, Robson MC. Long-term outcome study of growth factor-treated pressure ulcers. *Am J Surg* 2001; 181: 81 – 86
- Peinado H**, Olmeda D, Cano A. Snail Zeb and bHLH factors in tumor progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 415 – 428
- Peled ZM**, Phelps ED, Updike DL, Chang J, Krummel TM, Howard EW, Longaker MT. Matrix metalloproteinases and the ontogeny of scarless repair: the other side of the wound healing balance. *Plast Reconstr Surg* 2002; 110: 801 – 811
- Perkins NR**, Reid SW, Morris RS. Profiling the New Zealand Thoroughbred racing industry. 2. Conditions interfering with training and racing. *N Z Vet J* 2005; 53: 69 – 76
- Peysonnaux C**, Boutin AT, Zinkernagel AS, Datta V, Nizet V, Johnson RS. Critical role of HIF-1alpha in keratinocyte defense against bacterial infection. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 1964 – 1968
-

- Peyssonnaud C**, Cejudo-Martin P, Doedens A, Zinkemagel AS, Johnson RS, Nizet V. Cutting edge: essential role of hypoxia inducible factor 1-alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Immunol* 2007; 178: 7516 – 7519
- Peyssonnaud C**, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, Hurtado-Ziola N, Nizet V, Johnson RS. HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest* 2005; 115: 1806 – 1815
- Philips PG**, Birnby LM, Narendran A. Hypoxia induces capillary network formation in cultured bovine pulmonary microvessels endothelial cells. *Am J Physiol* 1995; 268: L789 – L800
- Pilcher B**, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, Parks WC. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol* 1997; 137: 1445 – 1447
- Pivarsci A**, Kemeny L, Dobozy A. Innate immune functions of the keratinocytes. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2004; 51: 303 – 310
- Pokharel RP**, Maeda K, Yamamoto T, Noguchi K, Yasuhiro I, Nakamura H, Iijima K. Expression of vascular endothelial growth factor in exuberant tracheal granulation tissue in children. *J Pathol* 1999; 188: 82 – 86
- Popoff N**. The digital vascular system. *Arch Pathol* 1934; 18:295-330
- Pou S**, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992; 267: 24173 – 24176
- Poulios E**, Trougakos IP, Chondrogianni N, Gonos ES. Exposure of human diploid fibroblasts to hypoxia extends proliferative life span. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1119: 9 – 19
- Pugh CW**, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003; 9: 677 – 684
- Puntarulo S**, Cederbaum AI. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 1324 – 1330
- Rabkin JM**, Hunt TK. Local heat increases blood flow and oxygen tension in wounds. *Arch Surg* 1987; 122: 221 – 225
-

- Rajkumar VS**, Howell K, Csiszar K, Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblast to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R1113 – 1123
- Rankin EB**, Rha J, Selak MA, Unger TL, Keith B, Liu Q, Haase VH. Hypoxia-inducible factor 2 regulates hepatic lipid metabolism. *Mol Cell Biol* 2009 ; 29 : 4527 – 4538
- Rao CN**, Ladin DA, Liu YY, Chilukuri K, Hou ZZ, Woodley DT. Alpha 1-antitrypsin is degraded and non-functional in chronic wounds but intact and functional in acute wounds: the inhibitor protects fibronectin from degradation by chronic wound fluids. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 572 – 578
- Raval RR**, Lau KW, Tran MGB, Sowter HM, Mandriota SJ, Li J, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe PJ. Contrasting properties of hypoxia inducible factor 1- and 2- α in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 5675 – 5686
- Rea S**, Giles NL, Webb S, Adcroft KF, Evill LM, Strickland DH, Wood FM, Fear MW. Bone marrow-derived cells in the healing burn wound – more than just inflammation. *Burns* 2009; 35: 356 – 364
- Rendell MS**, Bamisedun O: Diabetic cutaneous microangiopathy. *Am J Med* 1992; 93:611-618
- Rendell MS**, Johnson ML, Smith D, Finney D, Capp C, Lammers R, Lancaster S: Skin blood flow response in the rat model of wound healing: expression of vasoactive factors. *J Surg Res* 2002; 107:18-26
- Rendell MS**, Milliken BK, Finnegan MF, Finney DA, Healy JC: The skin blood flow response in wound healing. *Microvasc Res* 1997; 53:222-234
- Ribatti D**, Nico B, Crivellato E, Vacca A. Macrophages and tumor angiogenesis. *Leukemia* 2007; 21: 2085 – 2089
- Ridgway PF**, Ziprin P, Heck DH, Darzi AW. Hypoxia increases reepithelialization via an α 6-dependent pathway. *Wound Repair Regen* 2005; 13: 158 – 164
- Rizk M**, Witte MB, Barbul A. Nitric oxide and wound healing. *World J Surg* 2004; 28: 301 – 306

- Robles DT**, Moore E, Draznin M, Berg D. Keloids: pathophysiology and management. *Dermatol Online J* 2007; 13: 9
- Rodriguez PG**, Felix FN, Woodley DT, Shim EK. The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatol Surg* 2008; 34:1159-1169
- Rolfe P**. In vivo near-infrared spectroscopy. *Annu Rev Biomed Eng* 2000; 2: 715 – 754
- Ronnov-Jessen L**, Petersen OW. Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab Invest* 1993; 68: 696 – 707
- Rosmorduc O**, Housset C. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Semin Liver Dis* 2010; 30: 258 – 270
- Rosmorduc O**, Wendum D, Corpechot C, Galy B, Sebbagh N, Raleigh J, Housset C, Poupon R. Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. *Am J Pathol* 1999; 155: 1065 – 1073
- Rossiter H**, Barresi, Pammer J, Rendl M, Haigh J, Wagner EF, Tschachler E. Loss of vascular endothelial growth factor A activity in murine epidermal keratinocytes delays wound healing and inhibits tumor formation. *Cancer Res* 2004; 64: 3508 – 3516
- Rowell L**. Reflex control of the cutaneous vasculature. *J Invest Dermatol* 1959; 69:154-166
- Roy P**, Roy SK, Mitra A, Kulkarni AP. Superoxide generation by lipoxygenase in the presence of NADH and NADPH. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1214: 171 – 179
- Roy S**, Khanna S, Azad A, Schnitt R, He G, Weigert C, Ichijo H, Sen CK. Fra-2 mediates oxygen-sensitive induction in transforming growth factor beta in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 2010; 87: 647 – 655
- Roy S**, Khanna S, Bickerstaff AA, Subramanian SV, Atalay M, Bierl M, Pendyala S, Levy D, Sharma N, Venojarvi M, Strauch A, Orosz CG, Sen CK. Oxygen sensing by primary cardiac fibroblasts: a key role for p21(Waf1/Cip1/Sdi1). *Circ Res* 2003; 92: 264 – 271
-

Saed GM, Collins KL, Diamond MP. Transforming growth factor beta1, beta2 and beta3 and their receptors are differentially expressed in human peritoneal fibroblasts in response to hypoxia. *Am J Reprod Immunol* 2002(b); 48: 387 – 393

Saed GM, Diamond MP. Apoptosis and proliferation of human peritoneal fibroblasts in response to hypoxia. *Fertil Steril* 2002; 78: 137 – 143

Sahgren C, Gustafsson MV, Poellinger L, Lendahl U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 6392 – 6397

Said HK, Hijawi J, Roy N, Mogford J, Mustoe T: Transdermal sustained-delivery oxygen improves epithelial healing in a rabbit ear wound model. *Arch Surg* 2005; 140:998-1004.

Sakr Y, Chierago M, Piagnerelli M, Verdant C, Dubois MJ, Roch M, Creteur J, Gullo A, Vincent JL, DeBacker D. Microvascular response to red blood cell transfusion in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2007; 35: 1639 – 1644

Sakr Y, Dubois MJ, DeBacker D, Creteur J, Vincent JL. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2004; 32: 1825 – 1831

Sakr Y. Techniques to assess tissue oxygenation in the clinical setting. *Transfus Apher Sci* 2010; 43: 79 – 94

Sandulache VC, Parekh A, Li-Korotky H, Dohar JE, Hebda PA. Prostaglandin E2 inhibition of keloid fibroblast migration, contraction and transforming growth factor (TGF)-beta1-induced collagen synthesis. *Wound Repair Regen* 2007; 15: 122 – 133

Sarkhosh K, Tredget EE, Karami A, Uludag H, Iwashina T, Kilani RT, Ghahary A. Immune cell proliferation is suppressed by the interferon-gamma-induced indoleamine 2,3-dioxygenase expression of fibroblasts populated in collagen gel (FPCG) *J Cell Biochem* 2003; 90: 206 – 217

Schäfer M, Werner S. Transcriptional control of wound repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 69 – 92

Scheid A, Wenger RH, Christina H, Camenisch I, Ferenc A, Stauffer UG, Gassman M, Meuli M. Hypoxia-regulated expression in fetal wound regeneration and adult wound repair. *Pediatr Surg Int* 2000; 16: 232 – 236

Bibliographie

- Scheid A**, Wenger RH, Schäffer L, Camenish I, Distler O, Ferenc A, Cristina H, Ryan HE, Johnson RS, Wagner KF, Stauffer UG, Bauer C, Gassmann M, Meuli M. Physiologically low oxygen concentrations in fetal skin regulate hypoxia-inducible factor 1 and transforming growth factor-beta3. *FASEB J* 2002; 16: 411 – 413
- Schierle CF**, De la Garza M, Mustoe TA, Galiano RD. Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialisation in a murine cutaneous wound model. *Wound Repair Regen* 2009; 17: 354 – 359
- Schildemeyer LA**, Braun R, Taffet G, Debiassi M, Burns AE, Bradley A, Schwartz RJ. Impaired vascular contractility and blood pressure homeostasis in the smooth muscle alpha-actin null mouse. *Faseb J* 2000; 14: 2213 – 2220
- Schiller M**, Javelaud D, Mauviel A. TGF- β induced SMAD signalling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodelling and wound healing. *J Dermatol Sci* 2004; 35: 83 – 92
- Schlager O**, Gschwandtner ME, Herberg K, Forhner T, Schillinger M, Koppensteiner R, Mlekusch W. Correlation of infrared thermography and skin perfusion in Raynaud patients and in healthy controls. *Microvasc Res* 2010; 80:54-57
- Schnaper HW**, Hayashida T, Hubchak SC. TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F243 – 252
- Schreml S**, Szeimies RM, Prantl L, Karrer S, Landthaler M, Babilas P. Oxygen in acute and chronic wound healing. *British J Dermatol* 2010; 163: 257 – 268
- Schultz GS**, Sibbald RG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C, Harding K, Romanelli M, Stacey MC, Teot L, Vanscheidt W. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair Regen* 2003; 11 (Suppl.1): S1 - S28
- Schutysse E**, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 409 – 426
- Schwartz AJ**, Wilson DA, Keegan KG, Ganjam VK, Sun Y, Weber KT, Zhang J. Factors regulating collagen synthesis and degradation during second-intention healing of wounds in the thoracic region and the distal aspect of the forelimb of horses. *Am J Vet Res* 2002; 63: 1564 – 1570
- Semenza G**. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov Today* 2007; 12: 853 – 859

- Semenza GL:** Regulation of hypoxia-induced angiogenesis: a chaperone escorts VEGF to the dance. *J Clin Invest* 2001; 108:39-40
- Semenza GL.** HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev* 2000; 14: 1983 – 1991
- Semenza GL.** Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology* 2004; 19: 176 – 182
- Semenza GL.** Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med* 2001; 7: 345 – 350
- Sen CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt TK, Gottrup F, Gurtner GC, Longaker MT.** Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen* 2009 (a) ; 17: 763 – 771
- Sen CK, Khanna S, Babior BM, Hunt TK, Ellison EC, Roy S.** Oxidant-induced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing. *J Biol Chem* 2002; 277: 33284 – 33290
- Sen CK, Roy S.** Oxygenation state as a driver of myofibroblast differentiation and wound contraction: hypoxia impairs wound closure. *J Invest Dermatol* 2010; 130 : 2701 – 2703
- Sen CK.** The general case for redox control of wound repair. *Wound Repair Regen* 2003; 11: 431 – 438
- Sen CK.** Wound healing essentials: Let there be oxygen. *Wound Repair Regen* 2009 (b); 17:1-18
- Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, Gabbiani G.** The fibronectin domain ED-A is crucial to myofibroblast phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol* 1998; 142: 873 – 881
- Sheffield CW, Sessler DI, Hopf HW, Schroeder M, Moayeri A, Hunt TK, West JM.** Centrally and locally mediated thermoregulatory responses alter subcutaneous oxygen tension. *Wound Repair Regen* 1996; 4:338-345
- Sheffield PJ.** Tissue oxygen measurements. In Davis JC, Hunt TK, editors, *Problem wounds: the role of oxygen*, New York, Elsevier, 1988: 17 – 52
- Shelton DN, Chang E, Whittier PS, Choi D, Funk WD.** Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol* 1999; 9: 939 – 945
-

- Shepperd AA.** Nutrition for optimum wound healing. *Nurs Stand* 2003; 18: 55 – 58
- Shi YF, Fong CC, Zhang Q.** Hypoxia induces the activation of human hepatic stellate cells LX-2 through TGF-beta signaling pathway. *FEBS Lett* 2007 ; 581: 203 – 210
- Shih B,** Garside E, McGruther DA, Bayat A. Molecular dissection of abnormal wound healing processes resulting in keloid disease. *Wound Repair Regen* 2010; 18: 139 – 153
- Shih SC,** Claffey KP: Role of AP-1 and HIF-1 transcription factors in TGF-beta activation of VEGF expression. *Growth Factors* 2001; 19:19-34
- Short M,** Nemenoff RA, Zawada WM. Hypoxia induces differentiation of pulmonary artery adventitial fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004 ; 286: C416 – 425
- Shukla A,** Dubey MP, Srivastava R, Srivastava BS. Differential expression of proteins during healing of cutaneous wounds in experimental normal and chronic models. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244: 434 – 439
- Sica A,** Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* 2007; 117: 1155 – 1166
- Siddiqui A,** Galliano RD, Connors D, Gruskin E, Wu L, Mustoe TA. Differential effects of oxygen on human dermal fibroblasts: acute versus chronic hypoxia. *Wound Repair Regen* 1996; 4: 211 – 218
- Siegemund M,** van Bommel J, Ince C. Assessment of regional tissue oxygenation. *Intensive Care Med* 1999; 25: 1044 – 1060
- Silver IA.** Cellular microenvironment in healing and non-healing wounds. In: *Soft and Hard tissue repair*, edited by Hunt TK, Heppenstall RB, Pines E. New-Oyrk: Praeger, 1984. pp 50 – 66
- Simmons SO,** Fan CY, Ramabhadran R. Cellular stress response pathway system as a sentinel ensemble in toxicological screening. *Toxicol Sci* 2009; 111: 202 – 225
- Simon EL,** Gaughan EM, Epp T, Spire M. Influence of exercise on thermographically determined surface temperatures of thoracic and pelvic limbs in horses. *J Am Vet Med Assoc* 2006; 15:1940-1944
- Simon MC.** Coming up for air. HIF-1 and mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 2006; 3: 150 – 151
-

- Simpson DM**, Ross R. The neutrophil leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. *J clin Invest* 1972; 51: 2009 – 2023
- Simpson JA**, Smith SE, Dean RT. Scavenging by alginate of free radicals released by macrophages. *Free Radic Biol Med* 1989; 6: 347 – 353
- Singer AJ**, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341: 738 – 746
- Sivamani RK**, Lam ST, Isseroff RR. Beta adrenergic receptors in keratinocytes. *Dermatol Clin* 2007; 25: 643 – 653
- Siwik DA**, Colucci WS. Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Fail Rev* 2004; 9: 43 – 51
- Skuli N**, Simon MC. HIF-1alpha versus HIF-2alpha in endothelial cells and vascular functions : is there a master in angiogenesis regulation ? *Cell Cycle* 2009 ; 8 : 3252 – 3253
- Smith JC**, Boone BE, Opalenik SR, Williams SM, Russell SB. Gene profiling of keloid fibroblasts shows altered expression in multiple fibrosis-associated pathways. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 1298 – 1310
- Soneja A**, Drews M, Malinski T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep* 2005; 57 (Suppl): 108 – 119
- Sorensen OE**, Cowland JB, Theilgaard-Monch K, Liu L, Ganz T, Borregaard N. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol* 2003; 170: 5583 – 5589
- Sorrell JM**, Caplan AI. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci* 2004 ; 117: 667 – 675
- Sowa MG**, Leonardi L, Payette JR, Cross KM, Gomez M, Fish JS. Classification of burn injuries using near-infrared spectroscopy. *J Biomed Opt* 2006; 11:054002
- Stichel CC**, Müller HW. The CNS lesion scar: ne vistas on an old regeneration barrier. *Cell Tissue Res* 1998; 294: 1 – 9
- Stoodley P**, Cargo R, Rupp CJ, Wilson S, Klapper I. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Int Microbiol Biotechnol* 2002 ; 29 : 361 – 367
-

- Strongin AY**, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 1995; 270: 5331 – 5338
- Strutz F**, Zeisberg M, Ziyadeh FN. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* 2002; 61: 1714 – 1728
- Stucker M**, Steinberg J, Memmel U, Avermaete A, Hoffmann K, Altemeyer P. Differences in the two-dimensionally measured laser Doppler flow at different skin localisations. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14: 44 – 51
- Sudarshan S**, Sourbier C, Kong HS, Block K, Valera Romero VA, Yang Y, Galindo C, Mollapour M, Scroggins B, Goode N, Lee MJ, Gourlay CW, Trepel J, Linehan WM, Neckers L. Fumarate hydratase deficiency in renal cancer induces glycolytic addiction and hypoxia-inducible transcription factor 1 α stabilization by glucose-dependent generation of reactive oxygen species. *Mol Cell Biol* 2009 ; 29 : 4080 – 4090
- Sundaresan M**, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995; 270: 296 – 299
- Swift ME**, Burns AL, Gray KL, DiPietro LA. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1027 – 1035
- Swift ME**, Kleinman HK, DiPietro LA. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest* 1999; 79: 1479 – 1487
- Tagaki S**, Tagawa M. A cytological and cytochemical study of the sweat gland of the horse. *Jpn J Physiol* 1959; 9: 153 – 159
- Talukdar AH**, Calboun ML, Stinson AW. Microscopic anatomy of the skin of the horse. *Amer J Vet Res* 1972; 33: 2365 - 2390
- Tanaka A**, Hatoko M, Tada H, Lioka H, Niitsuma K, Miyagawa S. Expression of p53 family in scars. *J Dermatol Science* 2004; 34: 17 – 24
- Tandara AA**, Mustoe TA. Oxygen in wound healing – more than a nutrient. *World J Surg* 2004; 28: 294 – 300
- Temmesfeld-Wollbrück B**, Szalay A, Mayer K, Olschewski H, Seeger W, Grimminger F. Abnormalities of gastric mucosal oxygenation in septic shock: partial responsiveness to dopexamine. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1586 – 1592
-

Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, Gordon JR: Preliminary observations on expression of transforming growth factors beta1 and beta3 in equine full-thickness skin wounds healing normally or with exuberant granulation tissue. *Vet Surg* 2002; 31:266-273

Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, Gordon JR. Expression of transforming growth factor β 1, β 3 and basic fibroblast growth factor in full-thickness skin wounds of equine limbs and thorax. *Vet Surg* 2001; 30: 269 – 277

Theoret CL, Physiology of wound healing, in Stashak TD, Theoret CL (eds): *Equine wound management* 2nd ed; Ames, IO, Wiley-Blackwell 2008, pp 5 – 28

Theoret CL, Wound repair: problems in the horse and innovative solutions, in Stashak TD, Theoret CL (eds): *Equine wound management* 2nd ed; Ames, IO, Wiley-Blackwell 2008, pp 47-68

Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 131 – 142

Thom SR. Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg* 2011; 127: Suppl1: 131S – 141S

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

Thomsen TR, Aasholm MS, Rudkjøbing VB, Saunders AM, Bjarnsholt T, Givskov M, Kirketerp-Møller K, Nielsen PH. The bacteriology of chronic venous leg ulcer examined by culture-independent molecular methods. *Wound Repair Regen* 2010; 18: 38 – 49

Thomson SJ, Cowan ML, Forton DM, Clark SJ, Musa S, Grounds M, Rahman TM. A study of muscle oxygenation and peripheral microcirculatory dysfunction in cirrhosis using near infrared spectroscopy. *Liver Int* 2009; 13:463-471

Thorn CE, Matcher SJ, Meglinski IV, Shore AC. Is mean blood saturation a useful marker of tissue oxygenation? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296:1289-1295

Ting SB, Caddy J, Hislop N, Wilanowski T, Auden A. A homolog of *Drosophila grainy head* is essential for epidermal integrity in mice. *Science* 2005; 308: 411 – 413

Tokumaru S, Sayama K, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Yang L, Yoshimura A, Hashimoto K. SOCS3/CIS3 negative regulation of

STAT3 in HGF-induced keratinocyte migration. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 327: 100 – 105

Toledo-Pereyra LH, Lopez-Neblina F, Toledo AH. Reactive oxygen species and molecular biology of ischemia/reperfusion. *Ann Transplant* 2004; 9: 81 – 83

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:349 – 363

Tomasek JJ, Vaughan MB, Kropp BP, Gabbiani G, Martin MD, Haaksma CJ, Hinz B. Contraction of myofibroblast in granulation tissue is dependent on Rho/Rho kinase/myosin light chain phosphatase activity. *Wound Repair Regen* 2006; 14: 313 – 320

Tong BC, Barbul A. Cellular and physiological effects of arginine. *Mini Rev Med Chem* 2004; 4: 823 – 832

Tong X, Zhao F, Thompson CB. The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19: 32 – 37

Trengrove NJ, Stacey MC, MacAuley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, Murphy G, Schultz G. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and inhibitors. *Wound Repair Regen* 1999; 7: 442 – 452

Trent JT, Kirsner RS. Wounds and malignancy. *Adv Skin Wound Care* 2003; 16: 31 – 34

Tuan TL, Hwu P, Ho W, Yiu P, Chang R, Wysocki A, Benya PD. Adenoviral overexpression and small interfering RNA suppression demonstrate that plasminogen activator inhibitor-1 produces elevated collagen accumulation in normal and keloid fibroblasts. *Am J Pathol* 2008; 173: 1311 – 1325

Tunley BV, Henson FM: Reliability and repeatability of thermographic examination and the normal thermographic image of the thoracolumbar region in the horse. *Equine Vet J* 2004; 36:306-312

Uskio-Fukai M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci STKE* 2006; 22: re8

Van den Boom R, Wilmink JM, O’Kane S, Wood J, 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 Regen* 2002; 10: 188 – 194

Vikatmaa P, Juutilainen V, Kuukasjarvi P, Malmivaara A. Negative pressure wound therapy: a systematic review on effectiveness and safety. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008; 36: 438 – 448

Vikram DS, Zweier JL, Kuppisamy P. Methods for noninvasive imaging of tissue hypoxia. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 1745 – 1756

Vileikyte L. Stress and wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 25: 49 – 55

Vincent AS, Phan TT, Mukhopadhyay A, Lim HY, Halliwell B, Wong KP. Human skin keloid fibroblasts display bioenergetics of cancer cells. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 702 – 709

Vujaskovic Z, Anscher MS, Feng QF, Rabbani ZN, Amin K, Samulski TS, Dewhirst MW, Haroon ZA. Radiation-induced hypoxia may perpetuate late normal tissue injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 50: 851 – 855

Wakuri H, Mutoh K, Ichiwaka H, Liu B. Microscopic anatomy of the equine skin with special reference to the dermis. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1995; 72: 177 – 184

Wall IB, Moseley R, Baird DM. Fibroblast dysfunction is a key factor in the non-healing of chronic venous leg ulcers. *J Invest Dermatol* 2008 ; 128: 2526 – 2540

Walmsley SR, Cadwallader KA, Chilvers ER. The role of HIF-1alpha in myeloid cell inflammation. *Trends Immunol* 2005 ; 26 : 434 – 439

Wang C, Schwaitzberg S, Berliner E, Zarin DA, Lau J. Hyperbaric oxygen for treating wounds: a systematic review of the literature. *Arch Surg* 2003; 138: 272 – 279

Wang J, Zohar R, McCulloch CA. Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res* 2006; 312: 205 – 214

Wang Q, Eusinger W, Nichols B, Gray J, Xu L, Seeley TW, Brenner M, Guo G, Zhang W, Oliver N, Lin A, Yeowell D. Cooperative interaction of CTGF and TGF-beta in animal models of fibrotic disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011; 4: 4

Ward KR, Ivatury RR, Barbee RW, Terner J, Pittman R, Filho IP, Spiess B. Near infrared spectroscopy for evaluation of the trauma patient: a technology review. *Resuscitation* 2006; 68:27-44

Watsky MA, Weber KT, Sun Y, Postlethwaite A. New insights into the mechanism of fibroblast to myofibroblast transformation and associated pathologies. *Int Rev Cell Mol Biol* 2010; 282: 165 – 193

Weingarten MS, Neidrauer BS, Mateo A, Mao X, McDaniel JE, Jenkins L, Bouraee S, Zubkov L, Pourrezaei K. Prediction of wound healing in human diabetic foot ulcers by diffuse near-infrared spectroscopy: a pilot study. *Wound Repair Regen* 2010; 18: 180 – 185

Weingarten MS, Papazoglou ES, Zubkov L, Zhu L, Neidrauer M, Savir G, Peace K, Newby JG, Pourrezaei K. Correlation of near infrared absorption and diffuse reflectance spectroscopy scattering with tissue neovascularization and collagen concentration in a diabetic rat wound healing model. *Wound Repair Regen* 2008; 16:234-242

Welch WJ. Mammalian stress response: cell physiology, structure / function of stress proteins and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 1992; 72: 1063 – 1081

Welch WJ. The mammalian heat shock (or stress) response: a cellular defense mechanism. *Adv Exp Med Biol* 1987; 225: 287 – 304

Weljie AM, Jirik FR. Hypoxia-induced metabolic shifts in cancer cells: Moving beyond the Warburg effect. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; Epub ahead of print

Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G, Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* 2005; 2005:re12

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003 ; 83 : 835 – 870

Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 998 – 1008

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

Westgate SJ, Percival SL, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA. Microbiology of equine wounds and evidence of bacterial biofilms. *Vet Microbiol* 2011 Epub ahead of print

Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 2002; 295: 1487

White JR, Harris RA, Lee SR, Craigon MH, Binley K, Price T, Beard GL, Mundy CR, Taylor S. Genetic amplification of the transcriptional response to hypoxia as a novel means of identifying regulators of angiogenesis. *Genomics* 2004; 83: 1 – 8

White SD, Affolter VK, Dewey J, Kass PH, Outerbridge C, Ihrke PJ. Cutaneous vasculitis in equines: a retrospective study of 72 cases. *Vet Dermatol* 2009; 20:600-606

Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell population of different organs. *FASEB J* 2003 (a); 17: 271 – 273

Wiesener MS, Maxwell PH. Hif and oxygen sensing: as important to life as the air we breathe? *Ann Med* 2003 (b); 35: 183 – 190

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

Wilmink JM, van Herten J, van Weeren PR, Barneveld A. Retrospective study of primary intention healing and sequestrum formation in horses compared to ponies under clinical circumstances. *Equine Vet J* 2002; 34: 270 – 273

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

Wilmink JM, van Weeren PR. Second-intention repair in the horse and pony and management of exuberant granulation tissue. *Vet Clin north Am Equine Pract* 2005; 21:15-32

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

Wilmink JM. Differences in wound healing between horses and ponies, in Stashak TD, Theoret CL (eds): *Equine wound management* 2nd ed; Ames, IO, Wiley-Blackwell 2008, pp 29 – 46

- Wingender J**, Strathmann M, Rode A, Leis A, Flemming HC. Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Enzymol* 2001; 336: 302 – 314
- Winning S**, Splettstoesser F, Fandrey J, Frede S. Acute hypoxia induces HIF-independent monocyte adhesion to endothelial cells through increased intercellular adhesion molecule-1 expression: the role of hypoxic inhibition of prolyl hydroxylase activity for the induction of NF-kappa B. *J Immunol* 2010 ; 185: 1786 – 1793
- Wipff PJ**, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 2007; 179: 1311 – 1323
- Woods EJ**, Cochrane CA, Percival SL. Prevalence of silver resistance genes in bacteria isolated from human and horse wounds. *Vet Microbiol* 2009; 138: 325 – 329
- Wrobel LK**, Fray TR, Molloy JE, Adams JJ, Armitage MP, Sparrow JC. Contractility of single human dermal myofibroblasts and fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton* 2002; 52: 82 – 90
- Wu L**, Xia YP, Roth SI, Gruskin E, Mustoe TA. Transforming growth factor-beta 1 fails to stimulate wound healing and impairs its signal transduction in an aged ischemic ulcer model: importance of oxygen and age. *Am J Pathol* 1999; 154: 301 – 309
- Wu Y**, Wang J, Scott PG, Tredget EE. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair Regen* 2007; 15: S18 – S26
- Xia YP**, Zhao Y, Tyrone JW, Chen A, Mustoe TA. Differential activation of migration by hypoxia in keratinocytes isolated from donors of increasing age: implication for chronic wounds in the elderly. *J Invest Dermatol* 2001; 116: 50 – 56
- Xu RX**, Huang K, Qin R, Huang J, Xu JS, Ding L, Gnyawali US, Gordillo GM, Gnyawali SC, Sen CK. Dual-mode imaging of cutaneous tissue oxygenation and vascular function. *J Vis Exp* 2010; 8:1-8
- Yager D**, Chen SJ, Ward S, Olutoye O, Diegelmann R, Chohen K. Ability of chronic wound fluids to degrade peptide growth factors associated with increased levels of elastase activity and diminished levels of proteinase inhibitors. *Wound Repair Regen* 1997; 5: 23 – 32
- Yager D**, Nwomeh BC. The proetolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair Regen* 1999; 7: 433 – 441
-

Zakharov P, Wolker AC, Wyss MT, Haiss F, Calcinaghi N, Zunzunegui C, buck A, Scheffold F, Weber B. Dynamic laser speckle imaging of cerebral blood flow. *Opt Express* 2009; 17: 13904 – 13917

Zaman RT, Parthasarathy AB, Vargas G, Chen B, Dunn AK, Rylander III HG, Welch AJ. Perfusion in hamster skin treated with glycerol. *Lasers Surg Med* 2009; 41: 492 – 503

Zaproudina N, Varmavuo V, Airaksinen O, Närhi M. Reproducibility of infrared thermography measurements in healthy individuals. *Physiol Meas* 2008; 29:515-524

Zeisberg M, Kalluri R. the role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med* 2004; 82: 175 – 181

Zhang B, Liang X, Shi W. Role of impaired peritubular capillary and hypoxia in progressive interstitial fibrosis after 56 subtotal nephrectomy of rats. *Nephrology* 2005 ; 10: 351 – 357

Zhang Q, Oh CK, Messadi DV, Duong HS, Kelly AP, Soo C, Wang L, Le AD. Hypoxia-induced HIF-1 alpha is augmented in co-culture of keloid fibroblasts and human mast cells: involvement of ERK1/2 and PI-3K/Akt. *Exp Cell Res* 2006; 312: 145 – 155

Zhao F, Mancuso A, Bui TV, Tong X, Gruber JJ, Swider CR, Sanchez PV, Lum JJ, Sayed N, Melo JV. Imatinib resistance associated with BCR-ABL upregulation is dependent on HIF-1alpha induced metabolic reprogramming. *Oncogene* 2010; 29: 2962 – 2972

Zollinger A, Spahn DR, Singer T, Zalunardo MP, Stoehr S, Weder W, Pasch T. Accuracy and clinical performance of a continuous intraarterial blood-gas monitoring system during thoracoscopic surgery. *Br J Anaesth* 1997; 79: 47 – 52

Zweifach BW, Lipowsky HH. Pressure-flow relations in blood and lymph microcirculation, in Renkin EM, Miche CC, Geiger SR (eds): *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System*. Oxford, UK, Oxford Univ Press, 1987, pp 251 – 308

ANNEXES

ANNEXE I

Tableau I : Les cellules inflammatoires : facteurs de recrutement, facteurs sécrétés, fonctions principales :

Cellules	Fonctions principales dans une plaie cutanée	Principaux facteurs de croissance / cytokines sécrétés	Facteurs de recrutement / activation
Plaquettes	Formation du caillot sanguin Sécrétion de facteurs de croissance / cytokines	EGF, FGF-2, IGF-1, IL-1, PDGF, TGF- β , TNF- α	Fibrine
Mastocytes	Sécrétion de facteurs de croissance / cytokines Production de la matrice extracellulaire	Histamine, IL-4, IL-13, TGF- β , TNF- α , tryptase	Voie du complément, blessure
Granulocytes / Polymorphonucléaires neutrophiles	Retrait des débris cellulaires, des corps étrangers et des bactéries Dégradation de la matrice extracellulaire Activation des macrophages Angiogenèse	IL-1, IL-6, protéases, TNF- α , substances antimicrobiennes (enzymes, ROS), VEGF	IFN- γ , IL-8, PDGF, voie du complément, produits bactériens
Monocytes / Macrophages	Phagocytose des PMNN, débris cellulaires, des corps étrangers et des bactéries Production de la matrice Remodelage de la matrice Angiogenèse Ré-épithélialisation	FGF-2, PDGF, TGF- α , TGF- β , VEGF	IGF-1, PDGF, TGF- α , TGF- β , TNF- α , VEGF

Adapté de *Shih, 2010*

ANNEXE II

Tableau II : Facteurs activant la NADPH – oxydase :

Facteurs de stress cellulaires	Principales cellules de la peau / de la guérison cutanée impliquées
<p>Facteurs chimiques :</p> <ul style="list-style-type: none"> - métaux lourds : plomb, zinc, cadmium - produits non métalliques : arsenic - solvants organiques : alcool éthylique ou butylique - molécules cytotoxiques endogènes : - lysophosphatidylcholine - molécules cytotoxiques environnementales : - fumée de cigarette - dérivés actifs de l'oxygène : ROS 	<p>Cellules endothéliales et musculaires lisses péri vasculaires Monocytes / Macrophages, Fibroblastes, Cellules endothéliales et musculaires lisses péri vasculaires</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cellules endothéliales et musculaires lisses péri vasculaires Cellules endothéliales et musculaires lisses péri vasculaires, Kératinocytes Cellules inflammatoires, Fibroblastes, Cellules endothéliales et musculaires lisses péri vasculaires, Kératinocytes
<p>Facteurs physiques :</p> <ul style="list-style-type: none"> - irradiations ionisantes - radiations ultraviolettes - forces physiques de stress, de pression, de torsion, de tension - températures environnementales - pression osmotique - pH : acidose intracellulaire 	<p>Fibroblastes Kératinocytes Cellules endothéliales et musculaires lisses péri vasculaires Toutes les cellules nucléées Toutes les cellules nucléées Toutes les cellules nucléées</p>
<p>Changements de l'environnement / des apports cellulaires : altération des apports nutritionnels (oxygène, glucose, acides aminés, acides gras, potassium, vitamines du groupe B ...)</p>	<p>Cellules endothéliales et musculaires lisses péri vasculaires principalement Toutes les cellules nucléées</p>
<p>Facteurs inflammatoires :</p> <ul style="list-style-type: none"> - LPS - Cytokines : TNF-α, IL-1, INF-γ - Angiotensine II - Métabolites des membranes lipidiques : thromboxane A₂, leucotriène B₄ 	<p>Cellules inflammatoires, Fibroblastes, Cellules endothéliales et musculaires lisses péri vasculaires, Kératinocytes Cellules inflammatoires, Fibroblastes, Cellules endothéliales et musculaires lisses péri vasculaires, Kératinocytes Cellules endothéliales et musculaires lisses péri vasculaires, Fibroblastes, Kératinocytes Cellules endothéliales et musculaires lisses péri vasculaires</p>

Adapté de Jiang2011 et Shih2010

ANNEXE III

Tableau III : Cytokines & facteurs de croissance, leurs fonctions principales et les principales cellules productrices :

Cytokines & Facteurs de croissance	Fonctions principales dans la guérison d'une plaie cutanée	Principales cellules sources
CTGF	Médiateur de l'activité du TGF- β Prolifération des fibroblastes Synthèse de la matrice extracellulaire Angiogenèse	Fibroblastes
EGF	Motilité cellulaire Prolifération des fibroblastes Ré-épithélialisation	Plaquettes Salive
FGF	Motilité et prolifération des fibroblastes, des kératinocytes Synthèse de la matrice extracellulaire Angiogenèse	Cellules inflammatoires Fibroblastes Cellules endothéliales
KGF	Motilité et prolifération des fibroblastes, des kératinocytes	Fibroblastes
IGF-1	Prolifération des fibroblastes Migration et prolifération des cellules endothéliales Synthèse, maturation et remodelage de la matrice extracellulaire Ré-épithélialisation	Plaquettes
INF-Y	Recrutement des granulocytes / polymorphonucléaires neutrophiles Diminution de la synthèse de collagène par les fibroblastes	Monocytes / Macrophages Lymphocytes Fibroblastes Cellules endothéliales Kératinocytes
IL-1	Synthèse des cytokines et facteurs de croissance / Pro-inflammatoire Ré-épithélialisation	Toutes les cellules nucléées, en particulier les monocytes / macrophages et les lymphocytes
IL-6	Recrutement des granulocytes / polymorphonucléaires neutrophiles Prolifération des kératinocytes Ré-épithélialisation	Toutes les cellules nucléées, en particulier les monocytes / macrophages et les lymphocytes
PDGF	Recrutement et activation des monocytes / macrophages Recrutement, motilité et prolifération des fibroblastes Synthèse, maturation et remodelage de la matrice extracellulaire Transformation myofibroblastique Ré-épithélialisation	Plaquettes

TGF-α	Motilité cellulaire Prolifération des fibroblastes Synthèse, maturation et remodelage de la matrice extracellulaire Angiogenèse Ré-épithélialisation	Monocytes / Macrophages Kératinocytes
TGF-β1	Recrutement des monocytes / macrophages Motilité & prolifération des fibroblastes Synthèse, maturation et remodelage de la matrice extracellulaire Transformation myofibroblastique	Plaquettes Monocytes / macrophages, lymphocytes et mastocytes Fibroblastes Cellules endothéliales Kératinocytes
TGF-β2	Recrutement des monocytes / macrophages Motilité & prolifération des fibroblastes Synthèse, maturation et remodelage de la matrice extracellulaire Transformation myofibroblastique	Plaquettes Monocytes / macrophages, lymphocytes et mastocytes Fibroblastes Cellules endothéliales Kératinocytes
TGF-β3	Effets anti-cicatriciels / régénération tissulaire	Plaquettes Monocytes / macrophages, lymphocytes et mastocytes Fibroblastes Cellules endothéliales Kératinocytes
TNF-α	Recrutement des monocytes / macrophages Synthèse des cytokines et facteurs de croissance / Pro-inflammatoire Angiogenèse Ré-épithélialisation Diminution de la synthèse de collagène par les fibroblastes	Monocytes / Macrophages Lymphocytes Mastocytes
VEGF	Angiogenèse Perméabilité vasculaire Synthèse, maturation et remodelage de la matrice extracellulaire	Monocytes / macrophages Fibroblastes Cellules endothéliales Kératinocytes

Adapté de Shih2010, Barrientos2008 & Theoret2008

ANNEXE IV

Figure 31 : Évolution clinique des plaies étudiées



Aspect macroscopique et évolution clinique des plaies cutanées étudiées. Les 3 groupes sont représentés (thorax, membre sans bandage, membre avec bandage) aux temps suivants : 48 heures, 96 heures et 1 semaine post chirurgie.

ANNEXE IV (suite)



Aspect macroscopique et évolution clinique des plaies cutanées étudiées. Les 3 groupes sont représentés (thorax, membre sans bandage, membre avec bandage) aux temps suivants : 1, 2 et 4 semaines. A 4 semaines, seules les plaies cutanées appendiculaires les plus proximales sont à considérer. Les plaies appendiculaires moyennes et distales sont hors projet.

ANNEXE V

Figure 32 : Comparaison de la multiplication des fibroblastes cutanés équinaux appendiculaires (canon) et corporels (thorax), dans des conditions de normoxie (20% O₂) et d'hypoxie (1% O₂) :

