

Université de Montréal

CONTRIBUTION DE L'HYPOXIE ET DU FACTEUR HIF1A À LA GUÉRISON
CUTANÉE CHEZ LE CHEVAL

par

KARINE DESCHENE

Département de biomédecine vétérinaire
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

Août 2011

© Karine Deschene, 2011

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée

CONTRIBUTION DE L'HYPOXIE ET DU FACTEUR HIF1A À LA GUÉRISON
CUTANÉE CHEZ LE CHEVAL

présentée par
KARINE DESCHENE

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean Sirois, président-rapporteur
Christine Theoret, directrice de recherche
Derek Boerboom, codirecteur
Francis Beaudry, membre du jury
Danielle Malo, examinatrice externe
Younes Chorfi, représentant du doyen

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Le cheval est souvent victime de plaies traumatiques, dont la guérison est fréquemment problématique, et ce, principalement quand la plaie survient sur le membre. Il est courant de voir chez le cheval le développement d'un tissu de granulation exubérant ou « bouton de chair », qui mène à une cicatrisation excessive due à la surproduction de tissu fibreux. Ce tissu cicatriciel, non épithélialisé, est caractérisé par une occlusion au niveau de la microcirculation due à l'hypertrophie des cellules endothéliales, qui laisse supposer la présence d'hypoxie tissulaire. Une hypoxie relative a effectivement été mesurée par spectroscopie dans le proche infrarouge au niveau des plaies appendiculaires prédisposées au développement de tissu de granulation exubérant, par rapport aux plaies corporelles. De plus, une étude thermographique a révélé un patron spatial similaire de la perfusion. Au niveau moléculaire, la littérature rapporte que le facteur de transcription «hypoxia inducible factor» (HIF) est à l'origine de plusieurs changements dans les niveaux d'expression de divers gènes régulés par l'hypoxie.

L'objectif du présent projet de recherche était de définir la contribution de l'hypoxie à la guérison cutanée chez le cheval. Le premier volet (*in vivo*) du projet visait à mesurer l'expression protéique temporelle du HIF1A dans des échantillons tissulaires en provenance de plaies cutanées guérissant normalement et d'autres développant une cicatrisation excessive, selon divers sites anatomiques (tronc, membre). Les résultats obtenus suggèrent que la mesure de HIF1A, dans les échantillons pluricellulaires de cette étude, reflète l'épithélialisation de la plaie plutôt que les niveaux d'oxygène tissulaire. En effet, le HIF1A semble réguler l'homéostasie et la prolifération des kératinocytes. Le second volet (*in vitro*), consistait en la mise en culture de fibroblastes dermiques équins provenant du tronc ou du membre, en condition de normoxie ou d'hypoxie (à 1% d'O₂ ou à l'aide d'un mimétique, le CoCl₂) afin d'en étudier le

comportement (capacités de prolifération et de synthèse protéique). Les résultats obtenus soutiennent une contribution de l'hypoxie à la cicatrisation extensive chez le cheval puisque l'hypoxie favorise la prolifération des fibroblastes en plus d'encourager la synthèse de collagène de type 1 et de diminuer la synthèse de la métalloprotéinase de type 2. Les changements observés semblent dépendre de facteurs extrinsèques (environnementaux) car les fibroblastes dermiques se comportent de façon similaire indépendamment de la provenance anatomique.

En somme, les deux volets de l'étude ont permis d'élucider une part des mécanismes sous-jacents à la formation du tissu de granulation exubérant lors de guérison cutanée chez le cheval. La poursuite des recherches dans ce domaine mènera à une meilleure compréhension de la pathologie et ainsi, permettra de développer des méthodes de traitement spécifiques à la condition.

Mots clés : cheval, guérison tissulaire, hypoxie, HIF1A, fibroblaste, kératinocyte, matrice extracellulaire.

RÉSUMÉ EN ANGLAIS

The horse is often victim of traumatic wounds for which healing can be problematic, mainly when the wound occurs on the limb. The development of exuberant granulation tissue, also known clinically as “proud flesh”, leads to extensive scarring characterized by overproduction of fibrous tissue and the absence of an epithelial cover. This scar tissue suffers from occlusion of the microcirculation within the residual granulation tissue, due to endothelial cell hypertrophy, suggesting tissue hypoxia. The presence of relative hypoxia in limb wounds of horses was recently confirmed using near infrared spectroscopy. Additionally, thermography showed decreased perfusion in limb wounds. Abundant literature incriminates “hypoxia inducible factor” (HIF) in the regulation of expression of a number of genes in response to hypoxia.

The overall objective of this research project was to define the contribution of hypoxia to problematic wound healing in horses. The first phase of the project (*in vivo*) aimed to measure the temporal expression of HIF1A protein in tissue samples taken from skin wounds healing normally and others developing exuberant granulation tissue and subsequent extensive scarring, according to various anatomical sites (trunk, limb). Results suggest that the expression of HIF1A within the pluricellular tissue samples of this study reflects wound epithelialization rather than tissue oxygen levels. Indeed, HIF1A appears to regulate the homeostasis and proliferation of skin keratinocytes. The second phase of the project (*in vitro*) consisted in the culture of equine dermal fibroblasts from the body or the limb, under conditions of normoxia or hypoxia (1% O₂ or using a mimetic, CoCl₂) in an effort to study their behavior (proliferation and protein synthesis). Results corroborate the contribution of hypoxia to over-scarring in the horse since hypoxia promotes both the proliferation of dermal fibroblasts and the synthesis of collagen type 1 while

decreasing the synthesis of matrix metalloproteinase 2. Extrinsic factors (environmental) appear to govern the behavior of equine dermal fibroblasts since these cells behave similarly regardless of their anatomic origin (body or limb).

In summary, the two phases of the study contributed to the elucidation of a portion of the mechanisms underlying the development of exuberant granulation tissue during wound healing in horses. Further research in this area will provide a better understanding of the pathology and thus aid in the design and development of targeted therapies.

Key words : horse, wound healing, hypoxia, HIF1A, fibroblast, keratinocyte, extracellular matrix.

Table des matières

Résumé en français	iii
Résumé en anglais	v
Liste des abréviations	xiii
Dédicace	xv
Remerciements	xvi
Introduction	1
1 Recension de la littérature	4
1.1 Guérison normale; les différentes phases	5
1.1.1 Phase inflammatoire.....	7
1.1.1.1 L'hémostase	8
1.1.1.2 La réponse cellulaire.....	9
1.1.2 Phase de prolifération cellulaire	11
1.1.2.1 L'épithélialisation	12
1.1.2.2 La fibrose	13
1.1.2.3 L'angiogénèse	14
1.1.2.4 La contraction	15
1.1.3 Synthèse matricielle et remodelage	17
1.1.3.1 Maturation du collagène	17
1.1.3.2 Apoptose	21
1.2 Types de guérison pathologique.....	23
1.2.1 Pathologie fibroproliférative	25
1.2.2 Plaie chronique	28
1.3 Guérison tissulaire spécifique au cheval.....	29
1.3.1 Distinctions au niveau des différentes étapes de guérison.....	32
1.3.1.1 La contraction	32
1.3.1.2 La phase inflammatoire	33

1.3.1.3	La fibrose	34
1.3.1.4	L'épithélialisation	35
1.3.2	Distinctions anatomiques de la guérison : Corps versus membre .	35
1.3.2.1	La contraction	36
1.3.2.2	La phase inflammatoire	37
1.3.2.3	La fibrose	38
1.3.2.4	L'épithélialisation	39
1.3.3	Qu'est-ce que le bouton de chair?	40
1.3.4	Prévention et traitement des plaies développant un TGE	43
1.3.5	Modèle expérimental	45
1.3.5.1	Modèle <i>in vivo</i>	45
1.3.5.2	Modèle <i>in vitro</i>	46
1.4	Contribution de l'oxygène à la guérison de plaie	48
1.4.1	L'oxygène dans les différentes phases de la guérison cutanée et la contribution de l'hypoxie	49
1.4.1.1	Phase inflammatoire	50
1.4.1.2	Phase proliférative	53
1.4.1.3	Phase de remodelage	55
1.4.2	Marqueur moléculaire d'hypoxie; facteur de transcription : HIF1A	56
1.4.2.1	Structure de la protéine	56
1.4.2.2	La régulation de HIF1A	58
1.4.2.2.1	La régulation oxygène-dépendante	59
1.4.2.2.2	La régulation oxygène-indépendante	63
1.4.2.2.3	Expression constitutive de la protéine HIF1A	63
1.4.2.3	Le rôle de la protéine HIF-1	64
1.4.3	Expériences <i>in vivo</i> impliquant l'hypoxie dans la guérison cutanée ..	67

1.4.4	Expériences <i>in vitro</i> montrant l'interaction entre les fibroblastes dermiques et l'hypoxie	68
2	Problématique, hypothèses et objectifs	70
3	Résultats.....	74
3.1	Article 1 : Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1 α in keratinocytes during the repair of skin wounds in horses	74
3.2	Article 2 : Hypoxia regulates the expression of extracellular matrix associated proteins in equine dermal fibroblasts via HIF1	106
4	Discussion générale	134
4.1	HIF1A est constitutivement exprimé dans les kératinocytes.....	134
4.2	Effet de l'hypoxie ou d'un mimétique sur divers comportements des fibroblastes dermiques équins.....	137
4.3	HIF1A, marqueur d'hypoxie dans le tissu de granulation.....	141
4.4	Limites, problèmes rencontrés et méthodes alternatives.....	142
4.5	Perspectives	146
	Conclusions	150
	Bibliographie	152
	Annexe : Résultats supplémentaires.....	xvii

Liste des tableaux

Tableau I : Effets autocrines et paracrines de diverses cytokines.....	6
Tableau II : Table 1 de l'article 2 : Mortality of EDF in normoxia and hypoxia.	129
Tableau III : Nombre de cellules dans les diverses conditions au temps initial, c'est-à-dire 24h après l'ensemencement	xvii

Liste des figures

Figure 1 : Apparence de la peau intacte versus celle de la cicatrice.....	5
Figure 2 : Schéma de la cicatrisation de plaie (temps approximatif chez l'Homme)	7
Figure 3 : Phase inflammatoire	8
Figure 4 : Phase de prolifération cellulaire.....	12
Figure 5 : Différenciation du fibroblaste en myofibroblaste	16
Figure 6 : Synthèse du collagène.....	18
Figure 7 : Apparition et disparition des divers types cellulaires durant la guérison tissulaire.....	21
Figure 8 : Les deux voies menant à l'apoptose.....	23
Figure 9 : Diagramme représentant les divers types de guérison	25
Figure 10 : Patron temporel des phases de la guérison de plaie	31
Figure 11 : Schéma situant le bouton de chair entre les pathologies fibroprolifératives et les plaies chroniques	41
Figure 12 : Rôle de l'oxygène et de ses dérivés durant la guérison cutanée	50
Figure 13 : Activation et signalisation des ROS	52
Figure 14: Structure et site de régulation de HIF1A et de ARNT	58
Figure 15: Régulation oxygène dépendante et indépendante de HIF1A.....	59
Figure 16: Régulation oxygène dépendante de HIF1A	60
Figure 17: Réaction enzymatique des prolyl hydroxylases	61
Figure 18: Fonctions de HIF-1	65
Figure 19: Hypothèses du projet.....	72
Figure 20 : Figure 1 de l'article 1: HIF1A Protein Expression During Wound Repair in the Horse	101
Figure 21 : Figure 2 de l'article 1: Immunolocalization of HIF1A Protein During Wound Repair in the Horse.....	102
Figure 22 : Figure 3 de l'article 1: CDKN1A Protein Expression During Wound Repair in the Horse	103

Figure 23 : Figure 4 de l'article 1: Co-localization of CDKN1A and ki67 in Intact Skin of the Horse	104
Figure 24 : Figure 5 de l'article 1: VEGFA mRNA Expression During Wound Repair in the Horse	105
Figure 25 : Figure 1 de l'article 2: Proliferation of EDF in normoxia and hypoxia.	130
Figure 26 : Figure 2 de l'article 2: Cleaved caspase-3 (CASP3) protein expression in EDF cultured in CoCl ₂ hypoxia.....	131
Figure 27 : Figure 3 de l'article 2: Vascular endothelial growth factor A (VEGF A) and solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 1 (SLC2A1) mRNA expression in EDF exposed to 6h treatment of CoCl ₂ hypoxia, with or without echinomycin.....	131
Figure 28 : Figure 4 de l'article 2: Precursor collagen α1 type I (COL1A1) and matrix metalloproteinase 2 (MMP2) protein expression in EDF cultured in CoCl ₂ hypoxia.	132
Figure 29 : Figure 5 de l'article 2: Precursor collagen α1 type I (COL1A1) and matrix metalloproteinase 2 (MMP2) protein expression in EDF exposed to 6h treatment of CoCl ₂ hypoxia, with or without echinomycin.	133
Figure 30 : Figure 6 de l'article 2: Col1A1 and MMP2 under HIF1A regulation.	133

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTB : β -actine

ADN : acide désoxyribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

ARD1 : ADP-ribosylation factor domain protein 1

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNT : aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator

bHLH : domaine basique «helix-loop-helix»

CDKN1A : cyclin-dependant kinase inhibitor 1A (p21^{WAF1/Cip1})

CH : cicatrice hypertrophique

c-IAP : protéine inhibitrice de l'apoptose

CoCl₂ : chlorure de cobalt

DISC : complexe de signalisation induisant la mort

EGF : facteur de croissance épidermique

EGLN1 : HIF1 α -associated prolyl hydroxylase encoding gene

FDE : fibroblastes dermiques équins

FGF : facteur de croissance fibroblastique

FIH : facteur inhibiteur du HIF

HIF1A : facteur induit par l'hypoxie-1 α

HRE : élément de réponse à l'hypoxie

IF : immunofluorescence

NOS2 : monoxyde d'azote syntase induit

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MMP : métalloprotéinase matricielle

n : nombre

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF κ B : facteur nucléaire kappa B

NO : monoxyde d'azote

ODDD : domaine de dégradation dépendant de l'oxygène

PAS : Per, ARNT, Sim

PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes

PHD : prolyl hydroxylase

PMN : neutrophile polymorphonucléaire

pVHL : protéine Von Hippel Lindau

qRT-PCR : réaction en chaine par polymérase quantitative – transcription inverse

ROS : espèce réactive oxygénée

SLC2A : solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter (GLUT)) member

SLN : signal de localisation nucléaire

SMA : actine des muscles lisses

TAD : domaine de transactivation

TGE : tissu de granulation exubérant, en anglais EGT pour «exuberant granulation tissu»

TGF : facteur de croissance transformant

TIMP : inhibiteur tissulaire des MMP

TNF : facteur de nécrose tumorale

TRAF : facteur associé au récepteur du TNF

VEGF : facteur de croissance vasculaire de l'épithélium

DÉDICACE

*J'aimerais dédier ma thèse à mon grand-père, **Julien Pellerin**, de qui j'ai hérité l'amour inconditionnel pour les chevaux.*

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier ma directrice de recherche, Dre. Christine Theoret, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir permis de réaliser mon doctorat sur un sujet de recherche qui est très proche de mes intérêts; le bien-être des chevaux. Je voudrais aussi la remercier, elle et mon co-directeur Dr. Derek Boerboom, pour leur supervision et le partage de leurs connaissances et de leur savoir scientifique tout au long de mes études doctorales. Par ailleurs, je voudrais remercier les autres membres de mon jury : Jean Sirois (président-rapporteur), Francis Beaudry (membre du jury) et Danielle Malo (examinatrice externe).

Je voudrais, également, remercier les gens qui ont collaboré de près ou de loin à mon projet de doctorat. Premièrement, j'aimerais remercier Christophe Céleste, mon collègue au PhD, qui m'a grandement aidée dans l'obtention des résultats qui seront présentés. Je le remercie également pour sa grande générosité en conseils de toutes sortes, autant en lien avec la recherche que personnels. Par ailleurs, je remercie également Céline Forget (assistante de recherche), Julie Ferland (stagiaire) et Geneviève Carpentier (stagiaire) pour leur assistance, ainsi que Dr. Jacques Lussier pour son aide technique durant l'ensemble de mes études doctorales. De plus, j'aimerais remercier tous les étudiants du laboratoire du Dr. Derek Boerboom pour les échanges fructueux sur des techniques, des notions ou des articles scientifiques.

Finalement, un énorme merci à ma famille, Linda, Richard, Jean-Philippe et tous les autres, ainsi qu'à mes précieux amis (spécialement Julie, Marie-Hélène, Audrée et Léa), pour leur support, leurs encouragements durant les dernières années.

INTRODUCTION

La guérison cutanée est un processus qui diffère peu d'un mammifère à l'autre. La guérison mène à une réparation plutôt qu'à une régénération du tissu lésé; ce dernier sera donc dépourvu de certaines de ses caractéristiques originales (Gurtner *et al.*, 2008). Le processus de réparation tissulaire se déroule en trois phases qui se chevauchent et qui sont interdépendantes; phase inflammatoire, phase de prolifération et phase de synthèse matricielle et de remodelage (Broughton *et al.*, 2006a).

Les différentes phases sont étroitement régulées par une panoplie de cellules, d'enzymes et de facteurs de croissance. La complexité de l'enchaînement de toutes ces réactions entraîne parfois une irrégularité qui peut mener à des retards de guérison. Les principales pathologies rencontrées en médecine humaine se répartissent en deux grandes catégories; les pathologies fibroprolifératives et les plaies chroniques (Diegelmann and Evans, 2004). Parmi les pathologies fibroprolifératives se retrouvent les cicatrices hypertrophiques (CH) et les chéloïdes. Ces deux pathologies présentent une phase proliférative exacerbée qui occasionne un surplus de dépôt matriciel sous l'épithélium. Par ailleurs, un dérèglement dans l'apoptose ainsi que la présence d'un environnement hypoxique (expression du facteur induit par l'hypoxie – HIF1A) sont souvent incriminés. À l'inverse, les plaies chroniques semblent être figées dans la phase inflammatoire. Ces plaies ne parviennent pas à former un derme adéquat à la migration des kératinocytes, ce qui entrave l'épithélialisation de la plaie. Les plaies chroniques résultent d'un défaut de production des médiateurs régulant la prolifération et la migration cellulaires, tel que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Par ailleurs, un excès de certaines métalloprotéinases (MMP) favorise la dégradation excessive de la matrice

extracellulaire. Plusieurs études incriminent également une pénurie de HIF1A dans le développement de cette pathologie (Mace *et al.*, 2007; Botusan *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008).

Chez le cheval, l'irrégularité la plus couramment remarquée lors de guérison cutanée est la formation d'un tissu de granulation exubérant (TGE), aussi connu sous le nom de « bouton de chair ». Cette pathologie subvient principalement sur la partie distale du membre et peut sérieusement compromettre la carrière sportive de l'animal ou même mener à son euthanasie (Knottenbelt, 1997; Perkins *et al.*, 2005; Wilmlink and van Weeren, 2005). Les plaies chez le poney ainsi que les plaies à d'autres emplacements anatomiques chez le cheval guérissent habituellement sans complications. Le TGE équin présente des similitudes avec chacun des deux groupes de pathologie de la guérison retrouvés chez l'Homme. En fait, le TGE est une pathologie fibroproliférative en raison de la fibrose excessive qui s'y développe par contre, tout comme la plaie chronique de l'Homme, cette masse n'est pas épithélialisée. De récentes études rapportent un dérèglement au niveau de l'apoptose, en plus d'une microcirculation occluse par l'hypertrophie de cellules endothéliales au niveau des plaies appendiculaires du cheval, prédisposées au développement du TGE (Lepault *et al.*, 2005; Dubuc *et al.*, 2006).

Ces études vétérinaires, ainsi que des études sur les pathologies de la guérison chez l'Homme, sont les fondements de l'hypothèse des travaux de recherche présentés dans cette thèse. L'hypothèse centrale est que les plaies appendiculaires du cheval sont soumises à une hypoxie locale prolongée qui contribuerait au développement du TGE. Des études de mesure de l'oxygénation des tissus lésés ont été publiées parallèlement et montrent que les plaies appendiculaires présentent une hypoxie relative plus importante que les plaies corporelles, en plus de souffrir d'une moindre perfusion (Céleste *et al.*, 2011; Céleste *et al.*, In press). Les études décrites dans cette thèse ont

été réalisées dans le but de confirmer la présence d'hypoxie sur une base moléculaire. Pour ce faire, le HIF1A, facteur régulant l'homéostasie de l'oxygène et l'adaptation cellulaire à l'hypoxie, a été mesuré. D'une part, des analyses à partir d'échantillons tissulaires récoltés tout au long du processus de guérison ont été réalisées. D'autre part, des fibroblastes dermiques équins (FDE) ont été extraits et mis en culture dans le but d'étudier leur comportement en présence d'hypoxie induite expérimentalement. Pour les deux études, les plaies de membre ou les FDE de membre sont comparés à ceux du corps, considérés comme référence d'une guérison normale chez le cheval.

1 RECENSION DE LA LITTÉRATURE

L'organisme utilise diverses stratégies pour se défendre contre l'invasion de microorganismes. La première ligne de défense mise en œuvre implique des barrières physiques, dont fait partie la peau. Une des fonctions premières de la peau est de fournir une barrière protégeant l'organisme de diverses attaques de l'environnement (Tizard, 2004). Lorsqu'un dommage survient à la peau, l'organisme doit rapidement y remédier afin de refermer l'accès aux intrus et limiter l'infection aux tissus sous-jacents. La guérison tissulaire est un processus essentiel au maintien d'une défense adéquate.

Le mécanisme employé pour la guérison tissulaire en est un de réparation. C'est une réponse qui vise à rétablir la continuité du tissu lésé, menant à une cicatrice qui diffère physiquement et fonctionnellement des tissus initiaux (Theoret, 2006). La capacité de régénération chez les animaux supérieurs est rarissime, seulement quelques espèces telles que l'axolotl (salamandre aquatique du Mexique) en sont dotées (Li *et al.*, 2007a; Gurtner, Werner *et al.*, 2008); l'axolotl peut régénérer un membre entier en environ 2 à 3 mois. Le fœtus d'un mammifère, durant le premier trimestre de gestation, bénéficie de la régénération complète d'un tissu dermique endommagé, et ce, sans le développement de fibrose. Toutefois, cette capacité est perdue à la naissance (Bullard *et al.*, 2003; Broughton *et al.*, 2006b; Li, Chen *et al.*, 2007a; Gurtner, Werner *et al.*, 2008). Chez le mammifère adulte, le foie est l'un des rares organes qui peut se régénérer, et ce, seulement jusqu'à 70% (Gurtner, Werner *et al.*, 2008), ce qui prend environ une semaine (Taub, 2004). Mis à part quelques exceptions, le processus de réparation tissulaire chez l'adulte conduit au développement d'un tissu fibreux non fonctionnel, appelé cicatrice. Cette dernière aura des caractéristiques distinctes de la peau intacte; elle sera caractérisée par un amas de cellules (principalement les fibroblastes) et une

matrice extracellulaire (collagène) désorganisée (Broughton, Janis *et al.*, 2006b; Gurtner, Werner *et al.*, 2008) (Figure 1). Un remodelage maximal de la cicatrice lui permettra d'atteindre environ 70% à 80% de la résistance de la peau intacte (Li, Chen *et al.*, 2007a) par contre, les annexes cutanées ne seront pas régénérées (Li, Chen *et al.*, 2007a). Les mécanismes impliqués dans la réparation tissulaire, permettant une guérison maximale, sont regroupés en trois phases cruciales (Broughton, Janis *et al.*, 2006a; Li, Chen *et al.*, 2007a; Gurtner, Werner *et al.*, 2008).

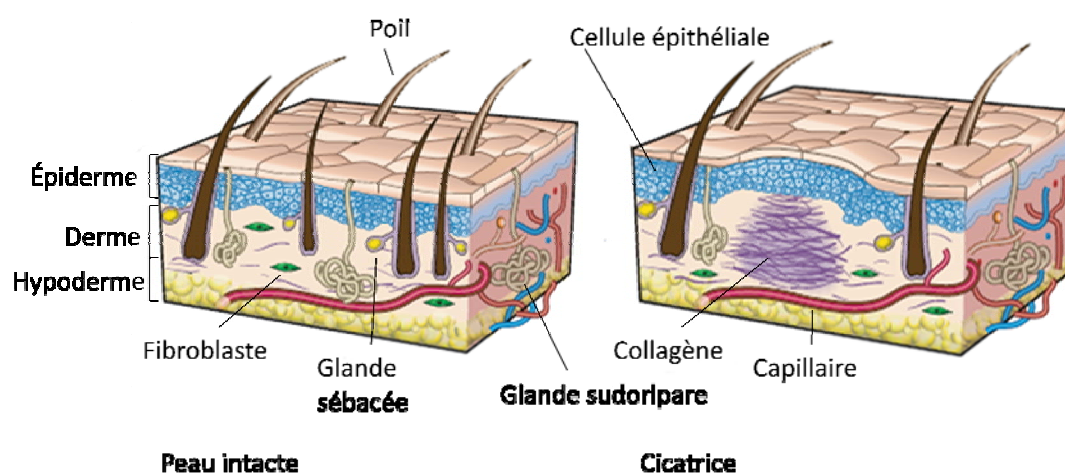


Figure 1 : Apparence de la peau intacte versus celle de la cicatrice

Le processus de réparation s'étale sur plus d'une année et ne permet pas la régénération tissulaire, mais plutôt la réparation. La cicatrice formée ne présente pas les mêmes caractéristiques que la peau intacte; elle n'a pas de poils ni d'annexes cutanées et elle possède une résistance diminuée.

Adaptée de : Gurtner, Werner *et al.*, 2008

1.1 Guérison normale; les différentes phases

La guérison cutanée se divise en trois phases distinctes les unes des autres, mais toutes indispensables à une réparation tissulaire adéquate. Sur l'échelle du temps, les phases apparaissent dans un ordre prédéterminé et se chevauchent, bien que la délimitation temporelle des phases varie (Clark, 1996; Witte and Barbul, 1997; Broughton, Janis *et al.*, 2006a; Li, Chen *et al.*, 2007a; Gurtner, Werner *et al.*, 2008; Guo and Dipietro, 2010). Dans chaque

phase, une myriade de réactions sont orchestrées et il existe un grand nombre d'interactions entre cellules et molécules (Tableau I) (Broughton, Janis *et al.*, 2006a). Vu la complexité de la guérison, ce processus est vulnérable à des altérations qui affectent la réponse physiologique et prolonge le temps requis pour la réparation complète (Broughton, Janis *et al.*, 2006b; Li, Chen *et al.*, 2007a; Guo and Dipietro, 2010).

Tableau I : Effets autocrines et paracrines de diverses cytokines

Cytokine	Sources majeures	Cellules cibles et effets principaux
Facteur de croissance épidermique (EGF)	Plaquettes	Prolifération et migration de plusieurs types cellulaires
Facteur de croissance transformant- α (TGF- α)	Macrophages et cellules épithéliales	Prolifération et migration de plusieurs types cellulaires
Facteur de croissance fibroblastique (FGF)	Macrophages et cellules endothéliales	Angiogénèse et prolifération des fibroblastes
Facteur de croissance des kératinocytes (KGF)	Fibroblastes	Prolifération et migration des cellules épithéliales
Facteur de croissance transformant- β 1 et 2 (TGF- β)	Plaquettes et macrophages	Migration des cellules épithéliales, chimioattraction des macrophages et fibroblastes, remodelage et synthèse matricielle
Facteur de croissance transformant- β 3	Macrophages	Effets anti-cicatrisation
Facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)	Plaquettes, macrophages et cellules épithéliales	Prolifération et chimioattraction des fibroblastes, Activation et chimioattraction des macrophages
Facteur de croissance vasculaire de l'épithélium (VEGF)	Cellules épithéliales et macrophages	Angiogénèse augmentation de la perméabilité vasculaire
Facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α)	Neutrophiles	Expression pléiotropique de facteur de croissance
Interleukine-1 (IL-1)	Neutrophiles	Expression pléiotropique de facteur de croissance

Adaptée de : Singer et Clark, 1999

La première phase de la guérison est la phase inflammatoire. Certains auteurs la divisent en deux, séparant l'hémostase de l'inflammation proprement dite. Par la suite survient la phase de prolifération cellulaire qui est caractérisée par l'épithélialisation, la reconstruction du derme et la contraction de la plaie. La dernière phase en est une de synthèse matricielle et de

remodelage où la matrice se réorganise pour optimiser l'intégrité structurelle et augmenter les compétences fonctionnelles du tissu cicatriciel (Li, Chen *et al.*, 2007a). Une grande similarité entre mammifères caractérise le processus de guérison (Gurtner, Werner *et al.*, 2008). La figure 2 illustre l'enchaînement des phases et les types cellulaires impliqués.

Figure 2 : Schéma de la cicatrisation de plaie (temps approximatif chez l'Homme)

La courbe de progression (en %) de la résistance cicatricielle (_ . _ .) est superposée au schéma illustrant le chevauchement entre les phases de la guérison tissulaire et énumérant les mécanismes et les types cellulaires impliqués dans chacune d'elles. La superposition permet de visualiser la résistance par rapport aux phases de guérison. La résistance initiale de la peau correspond à 100%, suite au trauma, elle se trouve à 0, et durant la guérison, elle augmente pour atteindre près de 80%. La majorité de la résistance s'acquiert durant la dernière phase.

© Karine Deschene

1.1.1 Phase inflammatoire

La phase inflammatoire est la première à survenir suite à une blessure. Elle débute dès les premiers instants et dure normalement entre sept et dix jours (Gurtner, Werner *et al.*, 2008; Toriseva and Kahari, 2009). Elle permet d'éliminer les intrus et les cellules mortes, et assure la libération de médiateurs pour amplifier et soutenir les phases subséquentes (Broughton,

Janis *et al.*, 2006a; Theoret, 2006). La phase inflammatoire comprend deux volets : l'hémostase et la réaction inflammatoire (Li, Chen *et al.*, 2007a). Plusieurs types cellulaires sont impliqués dans cette phase, tels que les neutrophiles (PMN) et les macrophages pour la défense de l'organisme et les plaquettes pour le maintien de l'hémostase (Clark, 1996; Broughton, Janis *et al.*, 2006a; Li, Chen *et al.*, 2007a) (Figure 3).

Figure 3 : Phase inflammatoire

La phase inflammatoire est caractérisée par un environnement qui est hypoxique pendant laquelle se forme un caillot de fibrine (hémostase). Un nombre élevé de neutrophiles et de plaquettes se trouvent au niveau de la plaie durant cette phase (réponse cellulaire) et plusieurs cytokines sont impliquées et plusieurs ont des actions paracrines.

Adaptée de : Gurtner, Werner *et al.*, 2008 et Singer and Clark, 1999

1.1.1.1 L'hémostase

Immédiatement suite au traumatisme, il y a un saignement occasionné par la rupture des vaisseaux sanguins. Ceci déclenche une réponse vasculaire afin de permettre la formation d'un caillot sanguin et ainsi assurer

l'hémostase. Les plaquettes sont les premières cellules à se présenter au site de la plaie et jouent un rôle crucial dans l'hémostase normale (Broughton, Janis *et al.*, 2006a; Li, Chen *et al.*, 2007a). Il y a vasoconstriction, puis activation des plaquettes par la matrice extracellulaire des parois vasculaires. L'adhésion interplaquettaire et le relâchement simultané de médiateurs et de protéines adhésives provoquent l'agrégation plaquettaire (Figure 3). Par la suite, un caillot de fibrine se forme, la coagulation s'amorce assurant l'arrêt des saignements. Le caillot est formé de collagène, de plaquettes, de thrombine et de fibronectine (Broughton, Janis *et al.*, 2006b). Les plaquettes sont essentielles à l'hémostase, mais également impliquées dans les processus subséquents de la guérison, telles que la réponse inflammatoire, l'épithélialisation, la fibroplasie et l'angiogenèse (Tableau I). Le caillot de fibrine sert d'échafaud pour la migration des leucocytes, des kératinocytes, des fibroblastes et des cellules endothéliales, en plus d'être un réservoir de facteurs de croissance (Li, Chen *et al.*, 2007a; Gurtner, Werner *et al.*, 2008).

1.1.1.2 La réponse cellulaire

La réponse cellulaire (Figure 3) de la phase inflammatoire est initiée par l'arrivée au site de la plaie des neutrophiles attirés par les facteurs chimiotactiques relâchés durant l'hémostase. Ils atteignent un nombre maximal vers 24 heures suivant le trauma. Par la suite, les monocytes migrent à partir des capillaires ou des tissus avoisinants et se différencient en macrophages dans le lit de la plaie entre le 2^e et le 3^e jour post-traumatique (Broughton, Janis *et al.*, 2006a; Gurtner, Werner *et al.*, 2008). Les neutrophiles interagissent avec la matrice via les récepteurs intégrines, ce qui leur permet de phagocyter et éliminer les bactéries et les tissus endommagés au site de la plaie. Une fois le corps étranger phagocyté, les neutrophiles possèdent deux moyens pour le détruire, soit la genèse des espèces réactives oxygénées (ROS) soit en libérant des enzymes lytiques depuis leurs granules (Tizard, 2004; Guo and Dipietro, 2010). Les neutrophiles ont la possibilité

d'effectuer une seule action phagocytaire. Leur présence ne dure habituellement que quelques jours avant qu'ils ne succombent à un signal d'apoptose et soient eux-mêmes phagocytés par les macrophages. Par contre, en présence de contamination leur activité est prolongée, ce qui retarde la guérison (Li, Chen *et al.*, 2007a). De plus, l'influx de neutrophiles est plus important chez la femelle que chez le mâle en réponse aux hormones sexuelles (Gilliver and Ashcroft, 2007).

Les monocytes envahissent le lit de la plaie, puis se différencient en macrophages pour rapidement devenir le type cellulaire prédominant. Le recrutement des monocytes se fait via des facteurs chimiotactiques (Li, Chen *et al.*, 2007a). Les macrophages phagocytent les organismes pathogènes, les tissus endommagés et détruisent les neutrophiles suivant leur apoptose. Les macrophages, tout comme les neutrophiles, peuvent détruire les bactéries via un mécanisme oxydatif ou non, par contre le macrophage peut phagocyter plus d'un organisme (Tizard, 2004). La relâche de molécules oxygénées, telles le monoxyde d'azote (NO), ou d'enzymes protéolytiques permet l'initiation de l'angiogenèse et de la formation du tissu de granulation, deux processus de la phase proliférative de la guérison. De plus, les macrophages libèrent des facteurs chimiotactiques pour les fibroblastes, tel que la fibronectine. Ils produisent également des facteurs de croissance, tels que le VEGF et le facteur de croissance transformant (TGF)- β , qui jouent un rôle important dans la migration et la prolifération cellulaires, ainsi que la synthèse matricielle (Tableau I et Figure 3). De cette façon, le macrophage joue un rôle crucial dans la transition entre la phase inflammatoire et la phase proliférative (Broughton, Janis *et al.*, 2006a; Li, Chen *et al.*, 2007a; Guo et DiPietro, 2010).

Fait important, la réaction inflammatoire du fœtus (avant le dernier trimestre de gestation) est très faible et ce dernier guérit par régénération plutôt que par réparation / cicatrisation (Clark, 1996). En fait, les plaies fœtales ne montrent aucune infiltration neutrophilique et durant la guérison seul un

faible nombre de macrophages sont présents au site de la plaie (Bullard, Longaker *et al.*, 2003). Ces faits suggèrent que la phase inflammatoire n'est pas nécessaire à la guérison et qu'elle serait même en partie responsable de la formation d'un tissu cicatriciel. À l'état néonatal, la souris knockout PU.1, qui ne possède ni neutrophiles ni macrophages bénéficie d'une guérison qui se déroule dans un laps de temps normal, mais dont la cicatrisation est significativement réduite par rapport à celle documentée chez la souris sauvage (Martin *et al.*, 2003; Stramer *et al.*, 2007). D'autres études récentes ont cependant montré que la délétion spécifique des macrophages nuit à la guérison cutanée en retardant l'épithélialisation et en détériorant la guérison du derme (Goren *et al.*, 2009; Mirza *et al.*, 2009). De plus, chez l'adulte et dans des conditions non expérimentales, l'inflammation est essentielle pour prévenir la contamination des tissus environnant la plaie et pour orchestrer les mécanismes de réparation tissulaire (Gauldie, 2007; Stramer, Mori *et al.*, 2007). En effet, la phase inflammatoire est initiatrice de la phase de prolifération.

1.1.2 Phase de prolifération cellulaire

La phase de prolifération cellulaire se déroule environ du quatrième au quatorzième jour post-trauma (Broughton, Janis *et al.*, 2006a). Cette phase vise à remplacer les tissus endommagés par le traumatisme et à créer une barrière perméable en refermant la plaie. Cette phase rassemble trois processus principaux : l'épithélialisation, la reconstruction du derme (par fibroplasie et angiogenèse) et la contraction (Broughton, Janis *et al.*, 2006a; Li, Chen *et al.*, 2007a; Gurtner, Werner *et al.*, 2008). Durant les trois processus de la phase de prolifération, les cellules qui prédominent sont, respectivement, les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales, puis les myofibroblastes (Figure 4).

Figure 4 : Phase de prolifération cellulaire

La phase de prolifération cellulaire est caractérisée par trois processus majeurs; épithélialisation, angiogenèse et fibrose.

Adaptée de : Gurtner, Werner *et al.*, 2008 et Singer et Clark, 1999

1.1.2.1 L'épithélialisation

Le processus d'épithélialisation consiste en la création, par les kératinocytes, d'une nouvelle barrière perméable sous la croûte formée lors de la phase inflammatoire (Figure 4). L'épithélialisation est lente et se fait en trois étapes; tout d'abord la migration des kératinocytes, puis leur prolifération et différenciation et finalement, la restauration de la membrane basale (Broughton, Janis *et al.*, 2006a). Les kératinocytes en bordure de plaie vont commencer à migrer dans les 24 premières heures en réponse à la perte de contact cellule-cellule. Les follicules pileux renferment les cellules souches épidermiques et servent de réservoir de kératinocytes durant la guérison cutanée (Li, Chen *et al.*, 2007a). Afin que les kératinocytes puissent migrer, ils doivent, tout d'abord, s'aplanir et s'allonger, développer des projections, perdre le contact avec les cellules et la matrice avoisinante et former des

filaments d'actine. Lorsqu'ils bénéficient d'une capacité migratoire, les kératinocytes n'ont plus le potentiel de proliférer (Li, Chen *et al.*, 2007a). Les kératinocytes peuvent migrer sur la matrice provisoire formée de fibrine, de fibronectine et de collagène de type V, et sous l'escarre, formant une langue de migration (épithélium migrant) (Clark, 1996). Pour ce faire, l'implication des récepteurs intégrines, des métalloprotéinases matricielles (dont MMP-1 et 9) et des facteurs de croissance est nécessaire afin que la plaie soit entièrement recouverte (Li, Chen *et al.*, 2007a). L'épithélialisation nécessite également la prolifération des kératinocytes localisés près des cellules de la langue migratrice. Lorsque la migration cesse, probablement dû à une inhibition de contact, les kératinocytes recréent les contacts cellule-cellule, reconstruisent la membrane basale et débutent le processus de différenciation qui mènera à un épiderme stratifié (Clark, 1996). La formation de la membrane basale est essentielle au rétablissement de l'intégrité et des fonctions de la peau; ce processus s'étend sur sept à neuf jours suivant les autres étapes de l'épithélialisation (Li, Chen *et al.*, 2007a).

1.1.2.2 La fibrose

Sous la membrane basale, le renforcement des tissus endommagés du derme se réalise par l'action des fibroblastes durant le processus de fibroplasie (Figure 4). Cette reconstruction débute entre le troisième et le quatrième jour suite au traumatisme (Li, Chen *et al.*, 2007a). Ceci est caractérisé par la formation de tissu de granulation, incluant la formation de nouveaux vaisseaux ainsi que l'accumulation de fibroblastes et de matrice extracellulaire. Le caillot de fibrine établi durant la phase inflammatoire favorise la formation du tissu de granulation en fournissant aux fibroblastes un échafaud pour migrer dans la plaie (Li, Chen *et al.*, 2007a). Rapidement suite au trauma, les fibroblastes en bordure de plaie commencent à proliférer et approximativement au quatrième jour, ils débutent leur migration vers le centre de la plaie. Une fois dans le lit de la plaie, les fibroblastes changent de

phénotype et deviennent des cellules synthétiques qui sécrètent une matrice riche en collagène (collagène de types I et III), protéoglycans et élastines (Broughton, Janis *et al.*, 2006b). La synthèse du collagène de type III commence après 48 à 72 heures et atteint son apogée entre le 5^e et le 7^e jour (Li, Chen *et al.*, 2007a). Le tissu de granulation comble la plaie et sert d'échafaud à la contraction de la plaie et à la migration de l'épithélium (Wilmink et van Weeren, 2005). Certains fibroblastes se différencieront en myofibroblastes pour réaliser la contraction de la plaie (Hinz *et al.*, 2007). La fibronectine est une glycoprotéine favorisant une activité accrue des fibroblastes; elle leur permet de lier la matrice extracellulaire et par la même occasion de migrer. La majorité des facteurs chimiotactiques au fibroblaste proviennent des macrophages présents dans la plaie (Tableau I). Par exemple, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le TGF- β stimulent la migration, tandis que le facteur de croissance épidermique (EGF) et le facteur de croissance fibroblastique (FGF) modulent autant la prolifération que la migration de ces cellules (Turck *et al.*, 1987; Clark, 1996; Li, Chen *et al.*, 2007a). De plus, la prolifération des fibroblastes est stimulée par de faibles niveaux d'oxygène tel que retrouvés au centre de la plaie avant qu'il n'y ait eu angiogenèse (Li, Chen *et al.*, 2007a). Chez le fœtus, la prolifération des fibroblastes et le dépôt de collagène sont faibles ce qui peut contribuer à la guérison sans cicatrice à ce stade de l'évolution (Sempowski *et al.*, 1995).

1.1.2.3 L'angiogenèse

La formation du tissu de granulation nécessite l'angiogenèse, un processus de genèse de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants en bordure de plaie (Folkman et Shing, 1992). Chez l'adulte, les vaisseaux sanguins de la peau sont normalement quiescents, par contre en réponse à un trauma, les cellules endothéliales des microvaisseaux initient l'angiogenèse (Li, Chen *et al.*, 2007a). Ce processus inclut l'activation des

cellules endothéliales, la dégradation de leur membrane basale, la germination dans le lit de la plaie, la prolifération cellulaire, la formation de structures tubulaires et finalement la reconstruction de la membrane basale (Liekens *et al.*, 2001). Des pseudopodes de cellules endothéliales peuvent être visualisés à partir de la deuxième journée post-trauma. La migration dans l'espace périvasculaire des pseudopodes de cellules endothéliales augmentera avec la sécrétion des MMPs (Li, Chen *et al.*, 2007a). Tout comme les kératinocytes, les cellules endothéliales qui migrent ne peuvent simultanément proliférer. Les cytokines relâchées par les macrophages vont favoriser l'angiogenèse (Tableau I), tout comme le fait une tension faible en oxygène. Plusieurs facteurs de croissance contribuent à l'angiogenèse, tels que VEGF, FGF et le TGF- β (Folkman et Shing, 1992; Li, Chen *et al.*, 2007a; Kisseleva et Brenner, 2008). Le VEGF, produit par les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales elles-mêmes, est le médiateur principal de l'angiogenèse (Kisseleva et Brenner, 2008). Il est faiblement exprimé dans la peau intacte, cependant son expression est augmentée durant la guérison cutanée en réponse à l'hypoxie tissulaire (Li *et al.*, 2003). La genèse de nouveaux vaisseaux est critique à la formation du tissu de granulation, car ils assurent la distribution des nutriments et de l'oxygène nécessaires à la réparation tissulaire (Broughton, Janis *et al.*, 2006b; Li, Chen *et al.*, 2007a).

1.1.2.4 La contraction

Le processus de contraction sous-tend le rapprochement des bords de plaie. La contraction de la plaie débute dès que les fibroblastes déjà établis au site de la plaie se différencient en myofibroblastes (environ sept jours suite à la blessure), mais elle est maximale à deux semaines (Moulin, 2001; Broughton, Janis *et al.*, 2006a; Li, Chen *et al.*, 2007a; Gurtner, Werner *et al.*, 2008). Elle survient lorsque la force exercée par les myofibroblastes excède la force centrifuge des tissus avoisinant la plaie et la résistance locale aux

mouvements (Wilmink et van Weeren, 2005). La contraction de la plaie est un facteur majeur qui détermine le temps de fermeture d'une plaie guérissant par seconde intention. En moyenne, la contraction d'une plaie pleine épaisseur est responsable de 40% de la fermeture de la plaie (Li, Chen *et al.*, 2007a). Les myofibroblastes, fibroblastes différenciés, sont les principaux médiateurs de la contraction grâce à leur capacité d'extension et de rétraction (Moulin *et al.*, 2004). Une augmentation de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes est observée à partir du 6^e jour et est maximale au 15^e jour. Les myofibroblastes sont caractérisés par leur contenu en microfilaments d'actine similaires à ceux observés dans les cellules musculaires lisses et ils expriment la protéine α -actine du muscle lisse (SMA) (Hinz, Phan *et al.*, 2007; Li, Chen *et al.*, 2007a) (Figure 5).

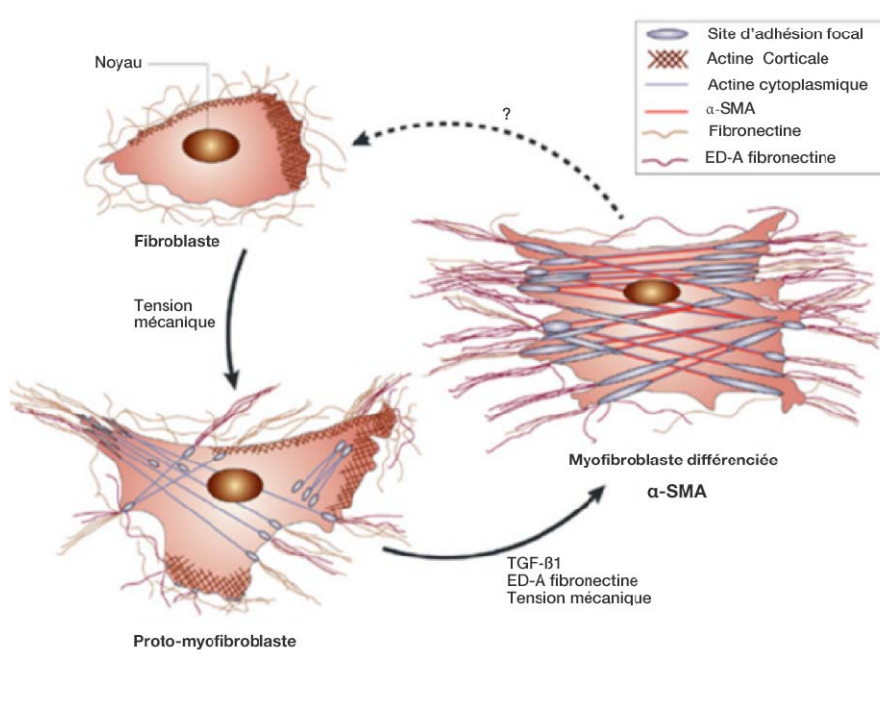


Figure 5 : Différenciation du fibroblaste en myofibroblaste

La différenciation du fibroblaste en myofibroblaste occasionne des changements au niveau de sa structure qui sont régulés par la présence de tension mécanique et du TGF- β 1.

Traduit de : Rotmans, 2011

Les myofibroblastes différenciés au site de la plaie s'alignent, lient la fibronectine extracellulaire attachée aux fibres de collagène, puis se rétractent, ce qui occasionne la contraction de la plaie. Le taux de contraction de la plaie est proportionnel au nombre de myofibroblastes présents (Li, Chen *et al.*, 2007a). Une fois la plaie refermée et le derme reconstruit, il ne reste plus que la phase de remodelage pour que la cicatrisation soit complète.

1.1.3 Synthèse matricielle et remodelage

La phase de synthèse matricielle et de remodelage consiste en un dépôt de la matrice et à son évolution dans le temps. Elle se caractérise principalement par des changements de composition de la matrice extracellulaire. Elle survient à travers chacune des phases de la guérison et se poursuit jusqu'à un an suivant le trauma (Broughton, Janis *et al.*, 2006a; Guo et Dipietro, 2010). Dans un premier temps, il y a formation du caillot de fibrine durant la phase inflammatoire. Dans un second temps, ce caillot est remplacé, durant la phase proliférative, par le tissu de granulation riche en collagène III (forme immature), en fibroblastes et en vaisseaux sanguins. Dans un dernier temps, la maturation de la cicatrice mène à la prédominance de collagène de type I (forme mature) et à une diminution importante du nombre de myofibroblastes et de vaisseaux sanguins (Broughton, Janis *et al.*, 2006a; Li, Chen *et al.*, 2007a; Gurtner, Werner *et al.*, 2008).

1.1.3.1 Maturation du collagène

Le collagène est une glycoprotéine fibreuse dont le rôle peut être comparé à une armature. Sa synthèse est principalement faite par les fibroblastes, mais les cellules épithéliales peuvent en produire. La synthèse débute par la transcription de gènes associés à la formation de collagène; ils se dénombrent à plus de 30 (Figure 6, point 1).

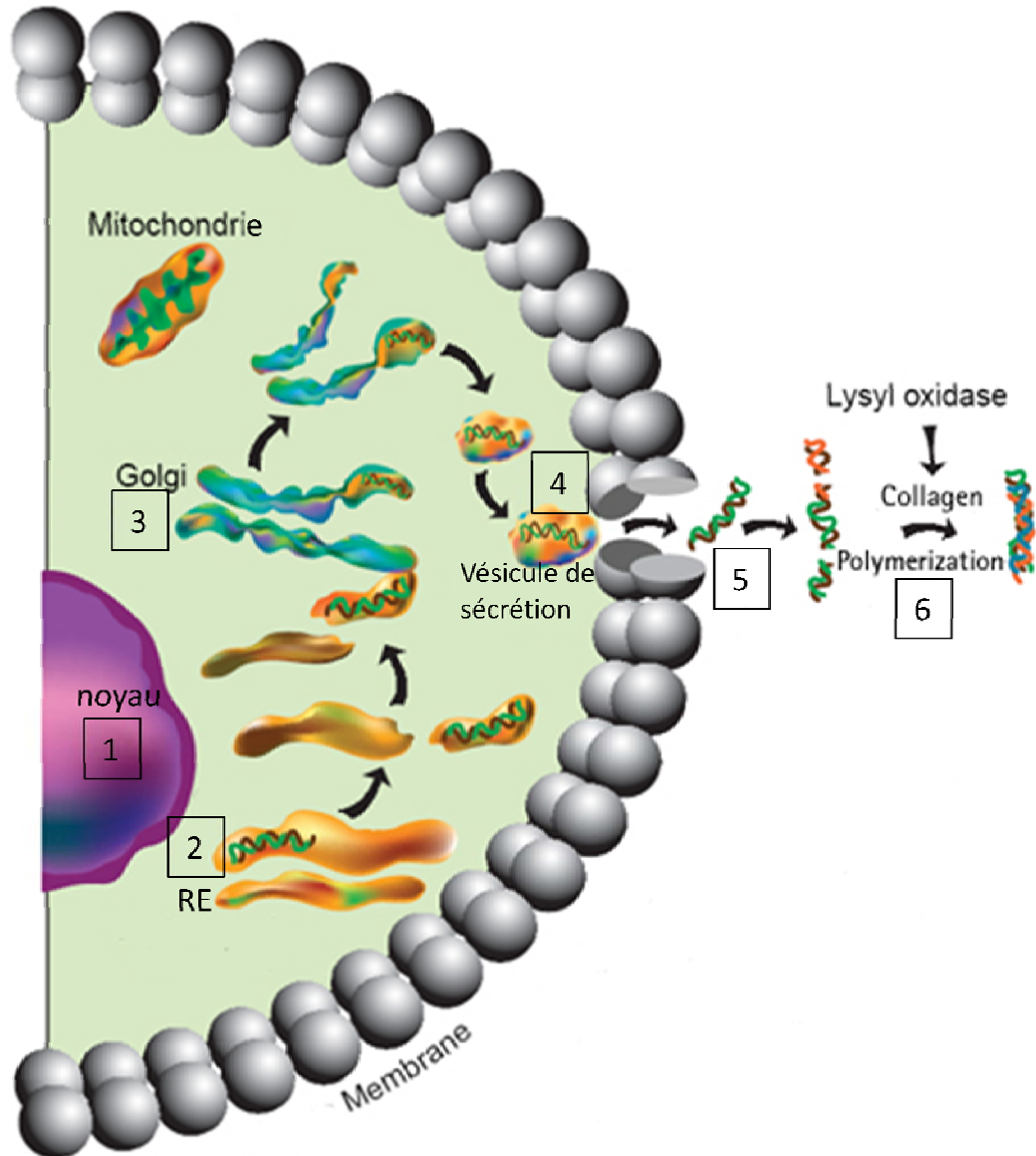


Figure 6 : Synthèse du collagène

1-La transcription des gènes liés au collagène a lieu dans le noyau. L'ARNm est traduit en pré-pro-peptide sur les ribosomes dans le cytosol. 2- Le pré-pro-peptide subit trois modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique (RE) avant de se rendre à l'appareil de Golgi sous forme de procollagène. 3- Une dernière modification post-traductionnelle a lieu, avant qu'il se retrouve à l'intérieur d'une vésicule de sécrétion. 4- La vésicule de sécrétion fusionne avec la membrane plasmique et le procollagène est sécrété dans l'espace extracellulaire. 5- Des protéases clivent les prodomaines, pour former le tropocollagène. 6- La polymérisation des tropocollagènes est réalisée à l'aide de la lysyl oxydase afin de former les fibres de collagène.

Figure adaptée de : **AbateAcne.com**

Par la suite, l'ARNm sort du noyau et se lie aux ribosomes pour procéder à la traduction en pré-pro-peptide. Ensuite, le peptide est dirigé vers le réticulum endoplasmique où ont lieu les trois modifications post-traductionnelles; perte de la région N-terminale (propeptide), hydroxylation des lysines et des prolines, glycosylation des groupes hydroxylysines (Figure 6, point 2). Ces modifications permettent la formation de la triple hélice nommée procollagène. Puis, le procollagène est transporté à l'intérieur d'une vésicule à l'appareil de Golgi. Une dernière modification post-traductionnelle subvient dans l'appareil de Golgi; c'est l'ajout d'oligosaccharides (Figure 6, point 3). Le procollagène est transporté dans l'espace extracellulaire via une vésicule de sécrétion (Figure 6, point 4). Dans l'espace extracellulaire, les collagènes peptidases clivent les extrémités de la molécule de procollagène; le résultat est nommé tropocollagène (Figure 6, point 5). La dernière étape de la synthèse du collagène nécessite les enzymes extracellulaires et la lysyl oxidase pour former des groupements aldéhydes sur les lysines et hydroxylysines (Figure 6, point 6). Ces groupements permettent la liaison covalente entre les molécules de tropocollagène, ce qui produit la fibre de collagène (Voet et Voet, 2002).

Les fibres de collagène sont les protéines principales de la peau normale et ils confèrent la structure, la force et la rigidité au derme. Chez un homme adulte en santé, le collagène de type I représente 80 - 90% de la composition totale en collagène alors que le collagène de type III comble les 10 - 20% résiduels (Broughton, Janis *et al.*, 2006a; Li, Chen *et al.*, 2007a). La quantité totale de collagène synthétisé augmente tôt durant la guérison et atteint un maximum vers la deuxième ou troisième semaine. Cette augmentation en collagène dure de 4 à 5 semaines et est liée à la présence plus importante de fibroblastes, mais également à l'augmentation individuelle de la production de collagène par chacune des cellules (Broughton, Janis *et al.*, 2006a). Le tissu de granulation présent durant la phase de prolifération est majoritairement formé de collagène de type III (environ 30%), cependant

durant le remodelage ce collagène sera dégradé et la synthèse du collagène de type I augmentera (Broughton, Janis *et al.*, 2006a; Li, Chen *et al.*, 2007a). La régulation étroite de ce changement est sous le contrôle d'un grand nombre de médiateurs solubles agissant en synergie pour assurer l'intégrité du tissu et l'homéostasie. Les protéines structurales et les glycoprotéines doivent être synthétisées et dégradées à des taux appropriés pour assurer une cicatrice normale et fonctionnelle (Atiyeh *et al.*, 2005). Les médiateurs principaux de ces changements sont les MMPs. Elles sont exprimées de façon non constitutive, mais elles sont induites durant la guérison cutanée par des cytokines, des facteurs de croissance et par les contacts cellules-matrice extracellulaire. Les MMPs sont synthétisées par les fibroblastes, les macrophages et les cellules endothéliales (Gurtner, Werner *et al.*, 2008). L'équilibre entre les cytokines anaboliques et cataboliques est fragile et un dérèglement peut mener à des pathologies (Atiyeh, Costagliola *et al.*, 2005).

Les fibres de collagène sont responsables d'une importante propriété biomécanique de la peau, c'est-à-dire la force de tension. L'orientation des fibres de collagène est initialement parallèle au bord de plaie, puis se réorganise le long des lignes de stress ce qui augmente la force de tension de la plaie (Broughton, Janis *et al.*, 2006a). La structure en triple hélices rigides du collagène lui confère sa résistance élastique, car ils convertissent une force de tension longitudinale en une force de compression latérale. Étant donné que les chaînes polypeptidiques et la triple hélice s'enroulent en direction opposée cela rend la fibre de collagène quasi incompressible et donc, très résistante (Voet et Voet, 2002). Les fibres de collagène sont stables grâce aux liaisons croisées covalentes intra et intermoléculaires créées par l'enzyme lysyl oxydase. Sur une période d'environ un an, le derme retrouvera progressivement un état semblable au derme intact, étant majoritairement composé de fibres de collagène de type I (plus fortes et plus longues que le collagène III) et ainsi, atteignant environ 70% à 80% de sa force de tension

initiale, sans jamais retrouver les propriétés exactes de la peau intacte (Li, Chen *et al.*, 2007a; Gurtner, Werner *et al.*, 2008).

1.1.3.2 Apoptose

Un processus clé de la régulation interphase et fortement impliqué durant la phase de remodelage est l'apoptose, une forme de mort cellulaire programmée. (Greenhalgh, 1998; Rai *et al.*, 2005).

L'apoptose est vitale au bon déroulement du processus de guérison tissulaire. Les différentes populations cellulaires prolifèrent rapidement durant la reconstruction du derme, alors l'apoptose conserve un équilibre cellulaire (Figure 7).

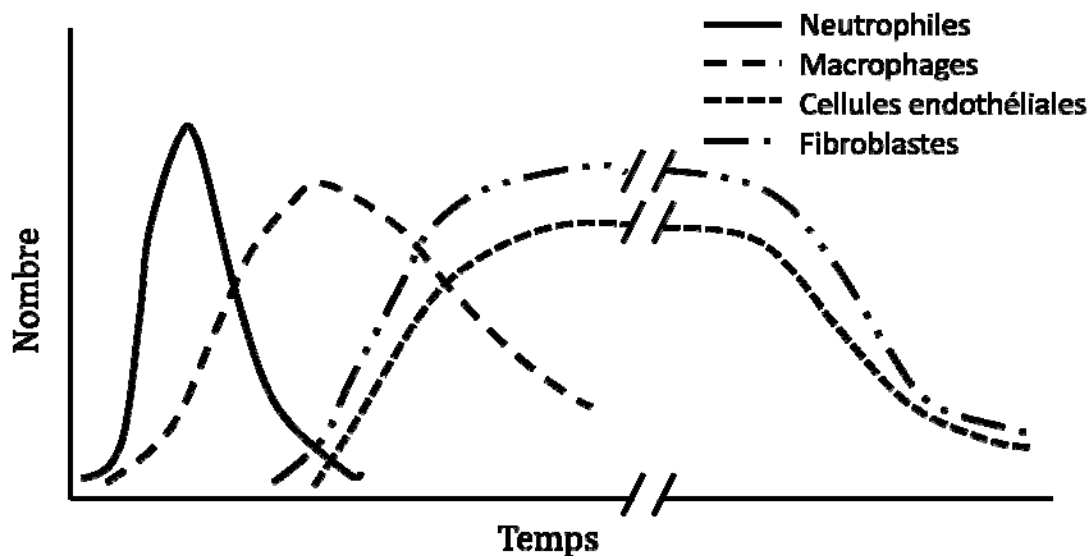


Figure 7 : Apparition et disparition des divers types cellulaires durant la guérison tissulaire

Durant la guérison, tous les types cellulaires arrivent rapidement au site de la plaie, par contre leur nombre doit diminuer à des niveaux négligeables pour que la plaie puisse mûrir de façon adéquate.
Adaptée de : Greenhalgh, 1998

Plusieurs cellules doivent quitter la plaie, par apoptose, pour permettre l'initiation de la prochaine phase de guérison. En fait, la majorité des macrophages, des cellules endothéliales et des myofibroblastes vont entrer en apoptose ou migrer hors du lit de la plaie (Gurtner, Werner *et al.*, 2008). Suite à ce processus, le derme contient un nombre restreint de cellules et est majoritairement constitué de protéines de la matrice extracellulaire, telles que le collagène (Greenhalgh, 1998).

L'apoptose peut être le résultat de deux voies majeures, soit la voie intrinsèque (dépendante de la mitochondrie), soit la voie extrinsèque (médiée par Fas) (Figure 8). Les deux voies vont mener à l'activation des caspases, à la fragmentation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et ultimement à la mort cellulaire (Tizard, 2004). La voie extrinsèque est activée par la liaison d'un ligand au récepteur Fas, puis par la formation du complexe de signalisation induisant la mort (DISC). DISC clive et active la caspase 8 et 10 (caspases initiatrices) qui elles pourront activer la caspase 3, une caspase effectrice. La voie intrinsèque est initiée par des signaux de dommages cellulaires, tels que l'entrée de granzymes, des dommages à l'ADN, etc. Le stress de la cellule mène à la relâche de cytochrome C par la mitochondrie et ainsi à la formation d'un apoptosome. L'apoptosome active la caspase 9 (caspase initiatrice) et mène à l'activation (clivage) de la caspase 3. La caspase 3 clivée a la capacité de fragmenter l'ADN et mène à l'apoptose (Gastman, 2001; Tizard, 2004). Via la voie intrinsèque, des familles de protéines qui sont dites pro-apoptotiques (Bax, Bak) ou anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, etc.) interviennent dans la cascade. De plus, lorsque la cellule est en présence d'un stress important, il y a arrêt de la dégradation du facteur de transcription p53 et son activation mène à l'apoptose. Cette protéine est inactivée dans un grand nombre de cancers.

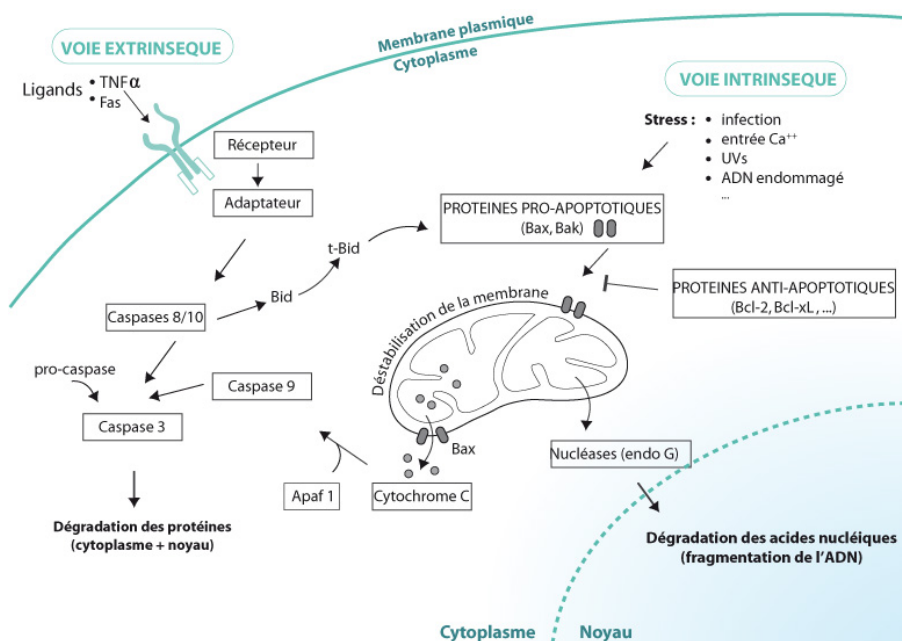


Figure 8 : Les deux voies menant à l'apoptose

Schématisation des deux voies majoritaires menant à l'apoptose.

Provient de : Bragard *et al.*, 2011

La mort cellulaire programmée doit être très bien régulée. Un dérèglement dans l'activation ou l'inactivation d'une fonction cellulaire ou une présence accrue ou diminuée d'un type cellulaire particulier, durant une phase ou l'autre de la guérison cutanée peut entraîner diverses pathologies de la guérison (Rai, Tripathi *et al.*, 2005). Parmi les pathologies liées à l'apoptose en lien avec la guérison tissulaire se retrouvent la cicatrice hypertrophique et la chéloïde (Greenhalgh, 1998).

1.2 Types de guérison pathologique

Le déclenchement d'un processus de guérison pathologique peut être influencé par plusieurs facteurs locaux ou systémiques et peut entraîner des altérations dans la structure de la cicatrice ainsi qu'une perte de fonction de l'organe lésé (Li, Chen *et al.*, 2007a). Par exemple, la régulation de l'expression des MMPs et de leurs inhibiteurs est cruciale à la guérison; un déséquilibre peut entraîner soit un délai de guérison (plaie chronique)

(Medina, Scott *et al.*, 2005; Brem et Tomic-Canic, 2007; Menke *et al.*, 2007) ou, à l'opposé, une fibrose excessive (Sadick *et al.*, 2008; Imaizumi *et al.*, 2009). Par ailleurs, un dérèglement de l'apoptose est souvent incriminé dans les pathologies reliées à une fibrose excessive (Akasaka *et al.*, 2000; Atiyeh, Costagliola *et al.*, 2005; De Felice *et al.*, 2009). Le niveau d'oxygénation, l'infection de plaie et la présence de corps étrangers sont des facteurs locaux qui influencent le déroulement normal de la guérison et qui peuvent mener à une guérison altérée (Broughton, Janis *et al.*, 2006b; Guo et Dipietro, 2010). Le niveau d'oxygénation ou la présence d'ischémie est un élément très important, car le processus de guérison est énergie-dépendant; cet aspect de la guérison sera détaillé dans une section ultérieure. L'infection et la présence d'un corps étranger peuvent, pour leur part, prolonger la phase inflammatoire ce qui pourrait retarder la mise en place de la phase de prolifération (Broughton, Janis *et al.*, 2006b). Pour leur part, les facteurs systémiques qui influencent la guérison incluent l'âge, les hormones sexuelles, le stress, les maladies métaboliques et endocrines (diabète, maladie cardiovasculaire, etc.) et la nutrition (Broughton, Janis *et al.*, 2006b; Li, Chen *et al.*, 2007a; Guo et Dipietro, 2010).

Les pathologies de la guérison cutanée se répartissent en deux groupes distincts. À une extrémité du spectre se trouvent les plaies chroniques, tels les ulcères, tandis qu'à l'autre extrémité se trouvent les pathologies fibroprolifératives, notamment les chéloïdes et les cicatrices hypertrophiques (CH) (Figure 9) (Diegelmann et Evans, 2004).

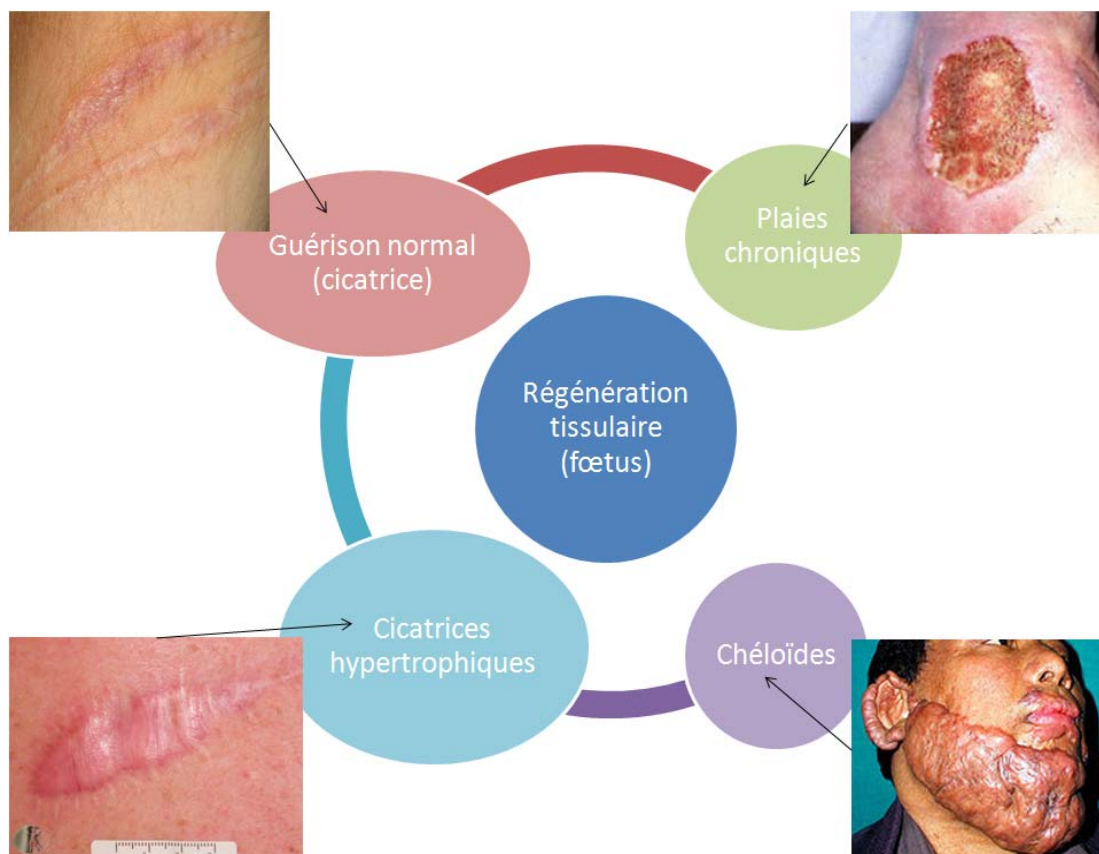


Figure 9 : Diagramme représentant les divers types de guérison
 Le centre représente la guérison idéale (régénération tissulaire), tandis que le cercle en haut à gauche représente la cicatrisation habituellement obtenue. Les trois autres cercles montrent les principales pathologies de la guérison cutanée.
 © Karine Deschene

1.2.1 Pathologie fibroproliférative

Deux principaux types de pathologie fibroproliférative sont observés cliniquement chez l'Homme; la chéloïde (Figure 9 en bas à droite) et la CH (Figure 9 en bas à gauche). La CH est une cicatrice surélevée confinée aux limites de la plaie initiale (Niessen *et al.*, 1999; Broughton, Janis *et al.*, 2006b). Pour sa part, la chéloïde est une tumeur dermique bénigne qui envahit les limites de la plaie au détriment des tissus adjacents (Broughton, Janis *et al.*, 2006b). L'incidence de la CH est certainement plus élevée que celle de la chéloïde, par contre cette dernière est plus envahissante et problématique à résoudre (Atiyeh, Costagliola *et al.*, 2005). Bien que ces deux pathologies se

ressemblent, elles démontrent des caractéristiques distinctes et requièrent une approche thérapeutique différente (Atiyeh, Costagliola *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010). En effet, contrairement à la CH, la chéloïde ne régresse pas et est très difficile à corriger chirurgicalement puisqu'elle tend à récidiver (Atiyeh, Costagliola *et al.*, 2005; Broughton, Janis *et al.*, 2006b). Pour les deux conditions, la prévalence chez l'homme et la femme est similaire, cependant elle varie selon l'âge et elle est maximale dans la vingtaine (English et Shenefelt, 1999; Niessen, Spauwen *et al.*, 1999; Atiyeh, Costagliola *et al.*, 2005; Broughton, Janis *et al.*, 2006b). La chéloïde est retrouvée chez toutes les races humaines, à l'exception des gens albinos, par contre elle survient plus fréquemment chez les gens ayant le teint foncé que chez ceux au teint pâle (Atiyeh, Costagliola *et al.*, 2005). De plus, il existe des régions anatomiques de susceptibilité pour la chéloïde. Elle est plus propice à survenir sur le devant de la poitrine, les épaules, le lobe de l'oreille, les bras et les joues (Niessen, Spauwen *et al.*, 1999).

De nombreuses études ont permis de déceler plusieurs mécanismes à la base du développement de ces pathologies. La fibrose résulte d'une série d'événements comprenant la relâche de TGF- β 1, le recrutement de cellules inflammatoires, la production de ROS, l'activation de fibroblastes dermiques synthétisant le collagène et l'activation des myofibroblastes favorisant une contraction de plaie excessive (Kisseleva et Brenner, 2008). Les deux formes de cicatrice pathologique diffèrent microscopiquement de la cicatrice normale par la densité accrue de cellules inflammatoires et de cellules du mésenchyme, en particulier le myofibroblaste, ainsi que par un fort épaissement de l'épithélium (Atiyeh, Costagliola *et al.*, 2005). Malgré une présence importante de vaisseaux sanguins (Ong *et al.*, 2007), une grande proportion de ceux-ci sont occlus dans la chéloïde, suggérant une hypoxie tissulaire locale qui pourrait stimuler la production excessive de collagène par les fibroblastes (Kischer, 1992). En effet, selon Falanga *et al.* une expression accrue de TGF- β 1 par les fibroblastes dermiques en milieu hypoxique serait à

l'origine de l'accumulation excessive de la matrice extracellulaire pathognomonique de la cicatrisation excessive, étant donné que ce facteur de croissance est un stimulant majeur de la synthèse du collagène et d'autres protéines constitutives de la matrice (Falanga *et al.*, 1991). L'équipe de Messadi a démontré que les chéloïdes expriment une concentration accrue de la protéine du facteur associé au récepteur du TNF (facteur de nécrose tumorale) (TRAF)-1, de TRAF-2, de l'inhibiteur de l'apoptose (c-IAP) et de facteur nucléaire κ dans les cellules-B (NF κ B) par rapport à la peau intacte (Messadi *et al.*, 2004). De plus, certaines protéines anti-apoptotiques, telles que Bcl-2, c-jun et c-fos, ont été décelées en quantité plus importante dans les fibroblastes de chéloïdes que dans ceux de peau intacte. De plus, une diminution de l'expression de p53 est aussi observée (Teofoli *et al.*, 1999).

En culture cellulaire, les fibroblastes dérivés de chéloïde produisent une quantité supérieure de collagène par cellule que le font les fibroblastes dermiques normaux (Atiyeh, Costagliola *et al.*, 2005; Broughton, Janis *et al.*, 2006b). Ils synthétisent également plus d'élastine, de fibronectine et de protéoglycan (Broughton, Janis *et al.*, 2006b). Le contrôle de la prolifération et de l'apoptose des fibroblastes est altéré dans les chéloïdes (Sayah *et al.*, 1999; De Felice, Garbi *et al.*, 2009); le taux d'apoptose, en culture cellulaire, est plus faible que pour les fibroblastes normaux (Ladin *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 2001; Atiyeh, Costagliola *et al.*, 2005; Broughton, Janis *et al.*, 2006b). Il est démontré en culture cellulaire que les kératinocytes provenant de chéloïde activent la prolifération et inhibent l'apoptose des fibroblastes dermiques sous-jacents (Funayama *et al.*, 2003). L'expression de facteurs pro-fibrotiques TGF- β 1 et 2 est augmentée dans les chéloïdes, tandis que le TGF- β 3 (anti-fibrotique) est exprimé de façon équivalente que ce soit dans la chéloïde ou dans une cicatrice cutanée normale (Broughton, Janis *et al.*, 2006b; Li, Chen *et al.*, 2007a). En somme, plusieurs changements au niveau cellulaire ou au niveau de l'environnement semblent contribuer au développement de la

chéloïde, que ce soit l'apoptose, la synthèse matricielle, l'expression des facteurs de croissance ou la présence d'hypoxie.

1.2.2 Plaie chronique

Les plaies chroniques (Figure 9 en haut à droite) n'ont pas franchi sereinement les trois phases de la guérison cutanée. Quelques zones de la plaie se retrouvent piégées à différentes phases, notamment la phase inflammatoire, entraînant une perte de synchronisme dans les événements menant à la guérison normale (Li, Chen *et al.*, 2007a). Contrairement aux pathologies fibroprolifératives, les plaies chroniques ne présentent aucune cicatrice (manque au niveau du derme et de l'épiderme) 6 semaines suite au trauma. Aux États-Unis, elles affectent 3 à 6 millions d'individus, dont 85% excèdent les 65 ans (Guo et Dipietro, 2010). Les trois principales formes de plaie chronique sont l'ulcère veineux, l'ulcération du pied du patient diabétique et l'ulcère de décubitus (Medina, Scott *et al.*, 2005; Guo et Dipietro, 2010). Dans les pays développés, 0,2 à 1% de la population est atteinte d'un ulcère veineux, à un moment ou l'autre, et la prévalence augmente avec l'âge (Medina, Scott *et al.*, 2005). Pour sa part, l'ulcération du pied affecte 15% des gens souffrant du diabète et précède 84% des amputations réalisées chez les individus diabétiques (Brem et Tomic-Canic, 2007). Les ulcères sont habituellement superficiels et leurs limites sont irrégulières (Medina, Scott *et al.*, 2005).

Certaines cellules peuplant une plaie chronique présentent un phénotype altéré. Les plaies chroniques exhibent une phase inflammatoire prolongée associée à une infiltration accrue de neutrophiles, à une activité protéolytique augmentée et à une présence importante de ROS. Certains facteurs de croissance présentent un dérèglement (réduction de leur expression) dû à des stimulations biochimiques ou à l'hypoxie locale (Medina, Scott *et al.*, 2005). Les kératinocytes en bordure de plaie prolifèrent

excessivement, présentent une différenciation incomplète et sont incapables de migrer adéquatement, ce qui empêche la plaie de se recouvrir (Brem et Tomic-Canic, 2007; Li, Chen *et al.*, 2007a). Pour leur part, les fibroblastes issus d'un ulcère diabétique démontrent une diminution de la migration et de la prolifération (Brem et Tomic-Canic, 2007). Leur expression du récepteur au TGF- β , ainsi que leur réponse au TGF- β 1 et à d'autres facteurs de croissance est diminuée (Medina, Scott *et al.*, 2005; Brem et Tomic-Canic, 2007; Li, Chen *et al.*, 2007a). Les fibroblastes de ces plaies produisent une quantité normale de matrice extracellulaire, par contre l'exsudat de la plaie est caractérisé par une concentration en MMPs significativement plus élevée que la normale, ce qui réprime la prolifération cellulaire et l'angiogenèse tout en augmentant la dégradation des protéines de la matrice (Medina, Scott *et al.*, 2005; Brem et Tomic-Canic, 2007). La diminution de l'angiogenèse favorise l'ischémie de la plaie et diminue le flux sanguin périphérique (Brem et Tomic-Canic, 2007).

Les caractéristiques des différentes phases de la guérison et les pathologies décrites précédemment sont propres à l'Homme. L'animal d'intérêt pour les études subséquentes est le cheval. Les prochaines pages vont mettre en évidence les diverses distinctions existant entre l'Homme et le cheval au niveau de la guérison tissulaire et des pathologies observées.

1.3 Guérison tissulaire spécifique au cheval

Le processus de guérison cutanée du cheval, tout comme celui des autres mammifères, suit un patron d'événements prédéterminés pouvant être séparés en trois phases; inflammation, prolifération et remodelage (Knottenbelt, 1997) (Figure 2). L'épaisseur de la peau est variable entre les mammifères; chez l'Homme elle est d'environ 2 mm selon la localisation (Laurent *et al.*, 2007), tandis que chez le cheval l'épaisseur moyenne est beaucoup plus importante (~4 mm) (Wong, June 2005). Pour une plaie de

surface et de profondeur similaires, le temps pour parvenir à la guérison complète chez l'Homme sera plus court que chez le cheval.

En raison de sa nature (proie), le cheval souffre fréquemment de plaies traumatiques, et malheureusement la guérison de ces dernières est souvent retardée et sujette à des complications (Wilmink et van Weeren, 2005). Les plaies chez le cheval doivent souvent guérir par seconde intention en raison de contamination importante, d'une grande perte de tissus ou de la présence de tissus dont l'état est compromis. Ces facteurs prolongent le temps de guérison et augmentent les complications possibles telles que l'infection ou le développement de TGE ou de CH (Wilmink et van Weeren, 2005). Ces complications vont survenir principalement sur des plaies localisées sur le bas du membre; les plaies sur le corps ou la tête du cheval guérissent avec plus de facilité (Bertone, 1989; Knottenbelt, 1997; Wilmink *et al.*, 2002). Chez les équidés, le poney bénéficie généralement d'une guérison plus rapide et de qualité supérieure à celle du cheval (Wilmink et van Weeren, 2005) (Figure 10a). Les prochaines sections vont présenter les distinctions qui existent entre le cheval et le poney pour chacune des phases de guérison puis celles qui existent, chez le cheval, entre les membres et le corps.

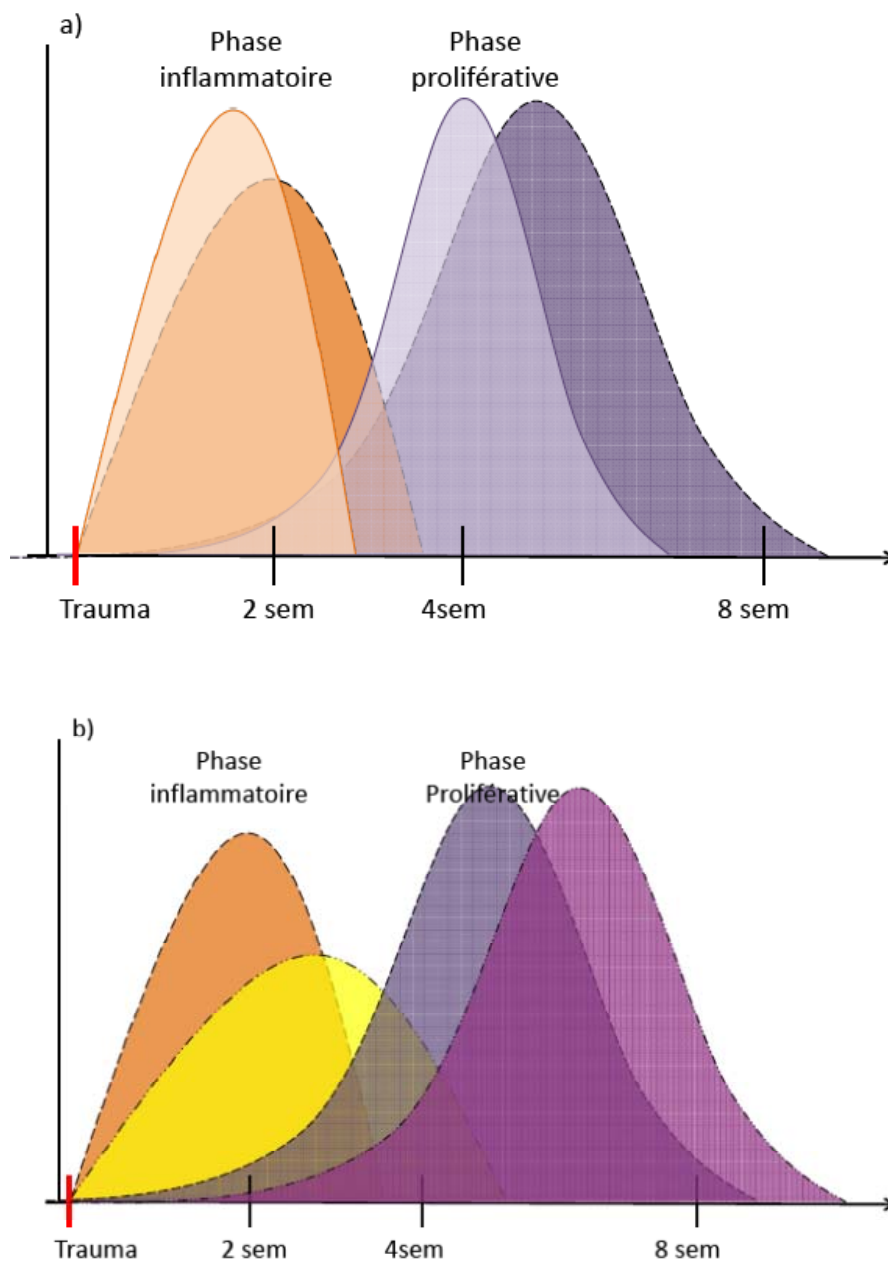


Figure 10 : Patron temporel des phases de la guérison de plaie

- Courbe comparant le poney et le cheval (temps approximatif). (Poney : ligne pleine, cheval : ligne pointillée).
 - Courbe comparant les différents sites anatomiques du cheval (plaie appendiculaire : (_ .._) jaune et violet, plaie corporelle : (_ _) orange et lavande) (temps approximatif).
- © Karine Deschene

1.3.1 Distinctions au niveau des différentes étapes de guérison

Les études de Wilmink *et al.* ont démontré plusieurs distinctions entre le cheval et le poney en réponse à un traumatisme créant une plaie de pleine épaisseur (épiderme et derme atteints) (Wilmink *et al.*, 1999a; Wilmink *et al.*, 1999b; Wilmink, Nederbragt *et al.*, 2001; Wilmink *et al.*, 2003; Wilmink et van Weeren, 2005). Ces études affirment que le poney guérit mieux et plus rapidement que le cheval, et que ceci est principalement lié à sa réponse inflammatoire et sa capacité de contraction de plaie (Figure 10a).

1.3.1.1 La contraction

Au cours de la première semaine de guérison, toutes les plaies augmentent de taille via un processus dénommé « rétraction » (Wilmink et van Weeren, 2005). Par la suite, les plaies localisées sur le corps du poney et du cheval ainsi que celles localisées sur le membre du poney diminuent rapidement de taille. En contraste, les plaies de membre chez le cheval continuent de prendre de l'expansion jusqu'à doubler de superficie deux semaines post-trauma. Par la suite, elles diminuent lentement de taille pour retrouver la taille de la plaie initiale seulement après 6 semaines. Dans une étude, les plaies corporelles et appendiculaires créées de façon expérimentale (20 X 35 mm) chez tous les poneys se sont refermées entre 7 et 9 semaines, cependant après 12 semaines d'observation seulement deux plaies corporelles sur cinq s'étaient refermées chez les chevaux (Wilmink, Stolk *et al.*, 1999a; Wilmink et van Weeren, 2005), confirmant que le processus de guérison est plus rapide chez le poney. La contraction de la plaie est un déterminant important de la vitesse de fermeture des plaies par seconde intention chez les équidés. Chez le poney, elle est beaucoup plus précoce et prononcée que chez le cheval (Wilmink, Stolk *et al.*, 1999a). La différence semble provenir de la force générée par les myofibroblastes en réponse aux facteurs environnants dans le tissu de granulation. *In vitro*, sur gel de

collagène ancré ou flottant, il n'y a pas de différence dans la force de contraction du myofibroblaste du cheval par rapport à celui du poney (Wilmink, Nederbragt *et al.*, 2001). En revanche, *in situ* les myofibroblastes de poney sont mieux organisés. Le patron est régulier; les cellules sont orientées de façon perpendiculaire aux vaisseaux sanguins et parallèle à la surface de la plaie (Wilmink, van Weeren *et al.*, 1999b). La contraction contribue positivement au processus de guérison chez l'équidé puisqu'elle augmente la rapidité de la guérison en plus d'améliorer l'apparence et la force de la cicatrice en limitant la surface devant être recouverte par un néoépithélium fragile (Wilmink, Nederbragt *et al.*, 2001). En somme, l'importante contraction des plaies chez le poney permet une fermeture considérablement plus rapide et plus forte que chez le cheval.

1.3.1.2 La phase inflammatoire

La phase inflammatoire présente également quelques distinctions. Le poney développe un tissu de granulation sain plus rapidement que le cheval (Wilmink, Stolk *et al.*, 1999a; Wilmink et van Weeren, 2005). L'influx leucocytaire est devancé chez le poney, occasionnant un nombre plus élevé de cellules polymorphonucléaires dans les trois premières semaines, puis chute radicalement (Wilmink, Veenman *et al.*, 2003). En revanche, l'arrivée des leucocytes au niveau de la plaie du cheval est plus lente, et bien que leur nombre soit moindre, ils persistent dans le temps (Wilmink, van Weeren *et al.*, 1999b; Wilmink, Veenman *et al.*, 2003; Wilmink et van Weeren, 2005). L'influx leucocytaire plus marqué chez le poney peut être expliqué en partie par une production accrue des médiateurs inflammatoires tels que TNF- α , interleukine-1, certaines cytokines chimioattractantes et le TGF- β . Ces médiateurs sont essentiels à la réponse inflammatoire, à l'initiation de la formation de tissu de granulation et surtout à la contraction de la plaie (van den Boom *et al.*, 2002; Wilmink, Veenman *et al.*, 2003; Wilmink et van Weeren, 2005). Une autre étude de Wilmink a démontré que les leucocytes de poney produisent plus de

ROS nécessaires à l'élimination des bactéries de la plaie (Wilmink, Veenman *et al.*, 2003; Wilmink et van Weeren, 2005). Une forte réponse inflammatoire aiguë prévient ainsi le développement d'une inflammation chronique et prépare plus rapidement la plaie à la phase subséquente de réparation tissulaire (Wilmink et van Weeren, 2005).

1.3.1.3 La fibrose

La seconde phase de la guérison cutanée est également la cible de plusieurs distinctions entre le poney et le cheval. Le tissu de granulation formé chez le cheval apparaît rapidement, par contre il présente une surface accidentée et purulente jusqu'à cinq semaines post-trauma. Pour sa part, le tissu de granulation formé sur les plaies du poney est lisse, régulier et prend une belle teinte rosée beaucoup plus tôt. Les fibroblastes présents dans les plaies du cheval continuent à proliférer même si le tissu de granulation a comblé le lit de la plaie, tandis que ceux localisés dans les plaies du poney cessent de proliférer à ce moment (Wilmink, van Weeren *et al.*, 1999b; Wilmink et van Weeren, 2005). Il semblerait y avoir une relation causale entre l'inflammation chronique chez le cheval et la prolifération continue des fibroblastes (Turck, Dohlman *et al.*, 1987; Wilmink, Veenman *et al.*, 2003). Les médiateurs inflammatoires tels que le PDGF, le TGF- β et bFGF induisent la fibrose (Kisseleva et Brenner, 2008). Chez le poney, la formation du tissu de granulation est moins abondante que chez le cheval, malgré que les médiateurs inflammatoires, qui promeuvent la migration et la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales, soient initialement plus concentrés. De plus, les fibroblastes dermiques du poney prolifèrent plus rapidement *in vitro* que ceux du cheval (Miller *et al.*, 2000; Wilmink, Nederbragt *et al.*, 2001). Selon ces données, l'environnement *in vivo* et la réponse inflammatoire sont déterminants pour le taux de prolifération fibroblastique. En somme, la formation du tissu de granulation chez le cheval se fait rapidement comparativement aux autres espèces et même au poney (Wilmink, Stolk *et al.*,

1999a; Wilmink et van Weeren, 2005). La réponse inflammatoire est vraisemblablement impliquée dans la formation du TGE.

1.3.1.4 L'épithélialisation

L'épithélialisation est l'étape la plus lente du processus de guérison cutanée. Ce processus se fait au rythme maximal de 1 mm par 10 jours pour les plaies appendiculaires du cheval (Stashak, 1991). Le taux de prolifération des cellules épithéliales est similaire entre cheval et poney durant les premières semaines de guérison. Toutefois, moins il y a de contraction de la plaie, comme c'est le cas chez le cheval, plus la surface à épithélialiser est grande (Wilmink, Stolk *et al.*, 1999a) retardant la fermeture et menant à une cicatrice plus importante. De plus, le néoépithélium est de qualité inférieure et est susceptible à un nouveau traumatisme (Wilmink, Stolk *et al.*, 1999a; Wilmink et van Weeren, 2005). Par ailleurs, l'épithélialisation est, elle aussi, influencée négativement par l'inflammation qui persiste au niveau de la plaie (Wilmink et van Weeren, 2005).

Somme toute, le poney présente une fermeture de plaie plus rapide en raison d'une contraction plus importante et du fait que le tissu de granulation cesse de proliférer lorsque le lit de la plaie est comblé. Le dérèglement de ces deux processus chez le cheval semble lié à la présence d'une réponse inflammation aiguë moins prononcée, mais persistante.

1.3.2 Distinctions anatomiques de la guérison : Corps versus membre

Les observations cliniques de la guérison cutanée chez le cheval montrent que les plaies appendiculaires présentent généralement une guérison retardée et souffrant de complications, alors que les plaies

corporelles guérissent mieux et plus rapidement (Figure 10b) (Jacobs *et al.*, 1984; Wilmink, van Herten *et al.*, 2002). Le faible apport sanguin ainsi que la localisation plus sujette aux infections et au mouvement sont souvent évoqués comme causes potentielles des complications notées sur les plaies appendiculaires. Cependant, ces facteurs ne sont certainement pas les seules causes de ce ralentissement et de ces complications (Knottenbelt, 1997; Schwartz *et al.*, 2002). La perfusion au niveau du membre est effectivement faible en raison de l'absence relative de tissus mous entre l'os et la peau, réduisant par le fait même l'approvisionnement en sang oxygéné. Une étude thermographique a démontré que la perfusion tissulaire au niveau des plaies de membre est significativement inférieure à celle des plaies corporelles tout au long du processus de guérison (Céleste, Deschene *et al.*, In press). De plus, la spectroscopie dans le proche infrarouge a démontré que les plaies appendiculaires souffraient d'une hypoxie plus importante que les plaies corporelles (Celeste, Deschene *et al.*, 2011). La température du membre est également affectée par ce manque de perfusion sanguine, ce qui nuit au processus de guérison (Knottenbelt, 1997).

1.3.2.1 La contraction

Une étude macroscopique a confirmé que les plaies corporelles se contractent et se referment plus rapidement que les plaies appendiculaires chez le cheval (Wilmink, Stolk *et al.*, 1999a). Cette différence est fort probablement liée à la résistance tissulaire locale, plus importante sur le membre, où la peau est solidement fixée au squelette (Wilmink, Stolk *et al.*, 1999a; Theoret, 2005). De plus, les plaies appendiculaires possèdent moins de fibroblastes différenciés en myofibroblastes, en plus d'être moins organisés, ce qui nuit grandement à la contraction (Wilmink, van Weeren *et al.*, 1999b; Schwartz, Wilson *et al.*, 2002).

1.3.2.2 La phase inflammatoire

À l'image des différences qui existent entre le poney et le cheval, la phase inflammatoire sous-tend les distinctions notées entre le corps et le membre chez le cheval. Le nombre de cellules inflammatoires (PMN) est plus important dans les plaies corporelles que dans les plaies appendiculaires durant les trois premières semaines de guérison, car l'influx leucocytaire y est plus rapide. Toutefois, le compte cellulaire diminue beaucoup plus rapidement dans les plaies corporelles qu'appendiculaires (Wilmink, van Weeren *et al.*, 1999b; Wilmink, Veenman *et al.*, 2003). Une étude de la réponse inflammatoire, implantant des cages de tissu polyoxyméthylène sous la peau, a montré un nombre accru de macrophages avant et durant la réponse inflammatoire, stimulée par l'injection de carrageenan, au niveau de l'encolure par rapport au membre (Wilmink, Veenman *et al.*, 2003). Dans cette étude, les niveaux de cytokines pro-inflammatoires restaient inchangés, par contre la production des cytokines chimioattractantes était plus importante au niveau du membre (Wilmink, Veenman *et al.*, 2003). D'autre part, le TGF- β , un facteur pro-fibrotique clé, présente une expression temporelle distincte entre le membre et le corps. Dans des échantillons tissulaires, il atteint une expression maximale durant les premiers jours pour les deux sites anatomiques, par contre au niveau du corps il retourne à des niveaux de base en 2 semaines tandis que pour le membre l'expression élevée perdure (Theoret *et al.*, 2001; van den Boom, Wilmink *et al.*, 2002). La réponse inflammatoire plus forte et plus courte observée pour les plaies corporelles ne semble pas liée à une différence dans la production des médiateurs inflammatoires par les leucocytes cependant elle est possiblement en lien avec des influences environnementales (Wilmink et van Weeren, 2005). Ces dernières incluent la température du membre, légèrement plus faible que celle du corps ainsi que la perfusion sanguine plus faible du membre en raison de l'absence relative de tissus mous sous-cutanés (Knottenbelt, 1997). L'hypothermie nuit à la guérison tissulaire et augmente la susceptibilité à l'infection en réduisant

l'activité des macrophages et réduisant l'apport en oxygène dû à une vasoconstriction (Frank, 2001). Une perfusion supérieure permet un approvisionnement rapide en nutriments, oxygène, médiateurs et leucocytes. Par ailleurs, la faible contraction des plaies contribue à prolonger la réponse inflammatoire puisqu'une surface plus grande est exposée aux stimuli environnementaux. Ceci constitue un cercle vicieux, car l'inflammation prolongée inhibe également la contraction des plaies et contribue à la formation du TGE qui représente un obstacle physique à la contraction (Wilmink et van Weeren, 2005).

1.3.2.3 La fibrose

Durant la phase proliférative, le tissu de granulation se forme plus lentement sur les plaies corporelles que sur celles du membre, par contre la surface prend moins de temps à devenir régulière, rose et saine (Jacobs, Leach *et al.*, 1984; Wilmink, Stolk *et al.*, 1999a; Wilmink et van Weeren, 2005). La forte réponse inflammatoire des plaies corporelles exerce certainement un effet positif sur le développement d'un tissu de granulation sain. De plus, les fibroblastes cessent de proliférer plus tôt dans les plaies corporelles en réponse à une chute du niveau de TGF- β (Wilmink, van Weeren *et al.*, 1999b; Theoret, Barber *et al.*, 2001; van den Boom, Wilmink *et al.*, 2002). Ceci n'est toutefois pas intrinsèque aux fibroblastes issus de la peau du tronc, puisqu'en culture cellulaire les fibroblastes en provenance de la peau du membre présentent une croissance moindre (Miller, Wilson *et al.*, 2000). Par ailleurs, la matrice extracellulaire et les fibroblastes retrouvent plus rapidement une orientation ordonnée au niveau des plaies corporelles (Jacobs, Leach *et al.*, 1984; Wilmink, van Weeren *et al.*, 1999b). La persistance de niveaux élevés en TGF- β ainsi que des niveaux élevés de collagène de type 1 dans les plaies du membre sont des causes majeures dans le développement du TGE (Schwartz, Wilson *et al.*, 2002). Une plus forte expression des récepteurs RI et RII au TGF- β est observée dans les plaies du membre qui développent un

TGE (De Martin et Theoret, 2004). Le tissu de granulation des plaies appendiculaires présente un nombre accru de cellules inflammatoires et également de vaisseaux sanguins (Jacobs, Leach *et al.*, 1984; De Martin et Theoret, 2004). Par contre, les vaisseaux sanguins formés durant la guérison sur le membre sont plus souvent occlus que ceux formés dans le tissu de granulation de plaies corporelles (Lepault, Celeste *et al.*, 2005). Le nombre de cellules endothéliales et de péricytes est similaire entre les microvaisseaux occlus et les patents, la différence se trouve au niveau de l'aire des cellules endothéliales. Donc, l'occlusion semble être le résultat d'une hypertrophie des cellules endothéliales (Dubuc, Lepault *et al.*, 2006).

1.3.2.4 L'épithélialisation

L'épithélialisation est un autre processus qui diffère entre les plaies corporelles et appendiculaires. Comme les plaies du corps subissent une contraction plus importante, l'épithélialisation y est moindre, générant une cicatrisation étoilée. Pour les plaies du membre, une grande surface doit être recouverte par un néoépithélium de qualité inférieure; une cicatrice circulaire plus prononcée en résulte (Knottenbelt, 1997; Wilmink, Stolk *et al.*, 1999a; Wilmink et van Weeren, 2005). L'épithélialisation des plaies du membre est ralentie durant le processus de guérison par l'important tissu de granulation qui s'y forme; ce dernier inhibe, par voies chimique et physique, la migration de l'épithélium (Jacobs, Leach *et al.*, 1984). Par ailleurs, le taux d'épithélialisation des plaies corporelles (0,2mm/jour) est plus élevé que celui des plaies appendiculaires (0,09mm/jour) (Schwartz, Wilson *et al.*, 2002). La relâche incontrôlée et désorganisée de facteurs de croissance et autres médiateurs tels les MMPs dont les collagénases, semblent être en cause dans le ralentissement de l'épithélialisation au profit de l'angiogenèse et de la fibroplasie (Knottenbelt, 1997). Il semble aussi y avoir une différence au niveau du comportement intrinsèque des cellules selon la région anatomique puisqu'un greffon de peau pris sur le corps améliore la guérison d'une plaie de

membre, tandis qu'un greffon pris sur un membre n'améliore pas le sort de la plaie appendiculaire.

En somme, la guérison des plaies du membre chez le cheval est plus à risque de complication, car la phase inflammatoire est moins prononcée et elle persiste. De plus, la contraction est moindre, ce qui entraîne souvent la formation d'un TGE. Le déroulement normal de la phase inflammatoire semble être la clé d'une bonne guérison cutanée. Un délai ou un défaut dans la phase inflammatoire entraîne une inflammation inappropriée ou chronique occasionnant un manque d'organisation dans l'apoptose, la composition de la matrice extracellulaire ainsi que l'échec de l'épithélialisation (Knottenbelt, 1997).

1.3.3 Qu'est-ce que le bouton de chair?

Les chevaux présentent diverses complications durant le processus de guérison cutanée, que ce soit une boiterie, une enflure ou le développement d'un TGE, qui peuvent compromettre sérieusement la carrière athlétique de l'animal et occasionnellement mener à son euthanasie (Knottenbelt, 1997; Perkins, Reid *et al.*, 2005; Wilmink et van Weeren, 2005). Il a été démontré dans une étude rétrospective sur 422 chevaux présentant des plaies cutanées, dont 60% étaient situées sur les membres, que seulement 24% des plaies se cicatrisaient par première intention (Wilmink, van Herten *et al.*, 2002). Le TGE, ou bouton de chair dans le langage clinique, est une complication fréquente qui survient quasi exclusivement sur les plaies guérissant par seconde intention et qui sont localisées sur la portion distale du membre (Jacobs, Leach *et al.*, 1984). Même des plaies profondes et de grandes tailles localisées sur le corps, présentant de l'infection / contamination importante, développent très rarement un TGE (Knottenbelt, 1997). La pathologie présente des caractéristiques similaires aux pathologies humaines décrites dans la section 1.2 de cette thèse. En fait, le bouton de chair est une

masse fibreuse, tout comme la chéloïde, mais elle se distingue de celle-ci par l'absence de couverture épithéliale. Cette dernière caractéristique l'apparente aux plaies chroniques (Figure 11).

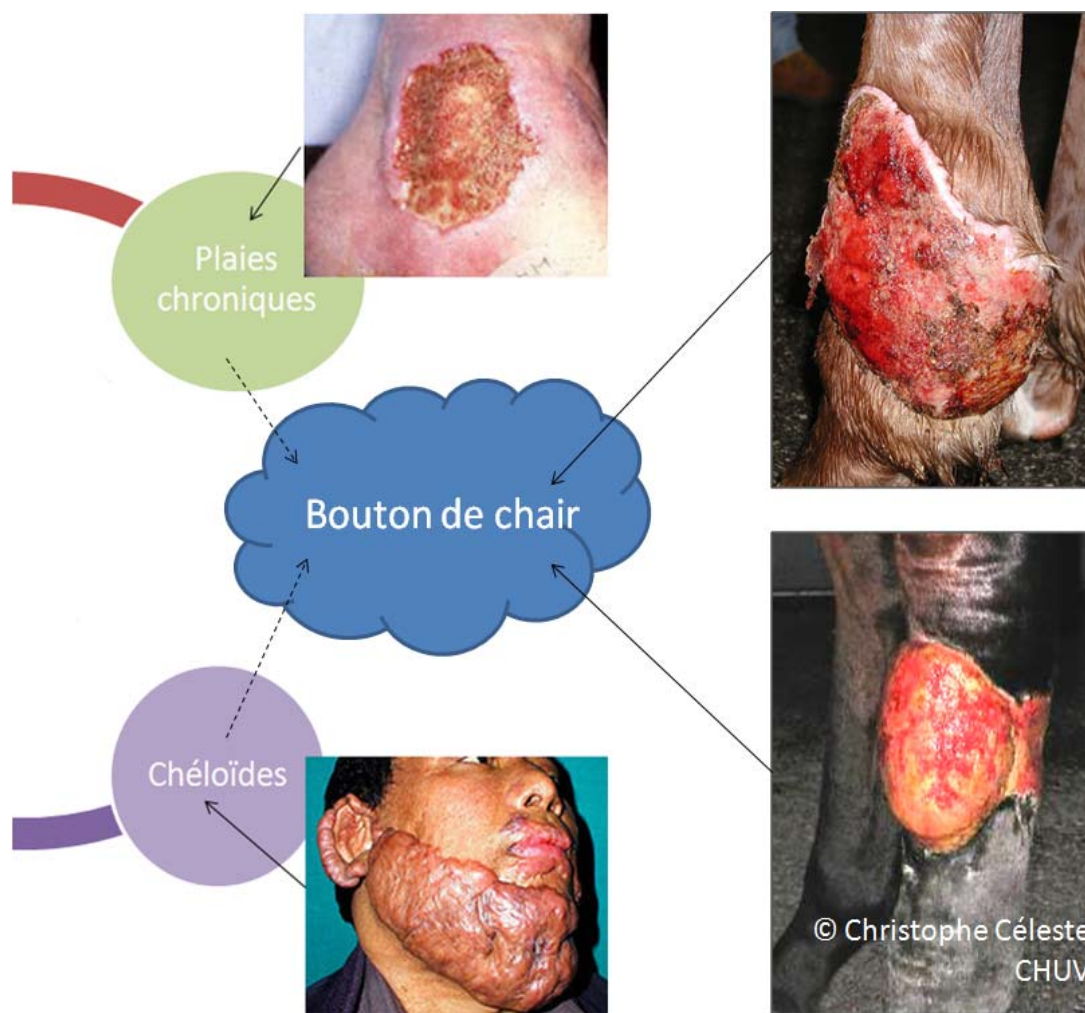


Figure 11 : Schéma situant le bouton de chair entre les pathologies fibroprolifératives et les plaies chroniques

Le bouton de chair, ou tissu de granulation exubérant (TGE), présente des similitudes avec les pathologies de guérison cutanée retrouvées chez l'Homme. C'est une pathologie fibroproliférative tout comme la chéloïde par contre, à l'image de la plaie chronique, il n'est pas épithélialisé. Se référer à la figure 4 pour le schéma des divers types de guérison.

© Karine Deschene

Le TGE présente une surface accidentée et fait saillie au-dessus des marges de la plaie (Wilmink et van Weeren, 2005). Les fissures à la surface contiennent un dépôt de fibrine qui n'a pas été éliminé par la réponse inflammatoire aiguë, ce qui entraîne une inflammation chronique et une prolifération cellulaire active (Wilmink et van Weeren, 2005). Histologiquement, le TGE a une apparence cellulaire chaotique et désorganisée (Wilmink, van Weeren *et al.*, 1999b). Le tissu synthétise possiblement plus de TGF- β et plusieurs de ses fibroblastes expriment davantage de RI et RII au TGF- β ce qui augmente la production de matrice extracellulaire (Theoret *et al.*, 2002; De Martin et Theoret, 2004). Une étude a démontré que les plaies du membre présentent un nombre plus important de vaisseaux occlus (Lepault, Celeste *et al.*, 2005; Dubuc, Lepault *et al.*, 2006). Ce phénomène corrèle bien avec les observations réalisées au niveau de la chéloïde, montrant également un nombre plus important de microvaisseaux occlus (Kischer, 1984; Atiyeh, Costagliola *et al.*, 2005; Broughton, Janis *et al.*, 2006b). L'hypoxie aiguë est un facteur qui stimule la production excessive de matrice extracellulaire (Siddiqui *et al.*, 1996; Wilmink et van Weeren, 2005). De plus, tout comme la chéloïde, le TGE équin souffre d'une déficience en apoptose (Atiyeh, Costagliola *et al.*, 2005; Lepault, Celeste *et al.*, 2005; Broughton, Janis *et al.*, 2006b). Ce dérèglement entraîne la persistance d'un nombre excessif de fibroblastes dans le lit de la plaie, au lieu d'une élimination telle qu'observée dans les processus de guérison normale.

L'incidence du bouton de chair est élevée pour les plaies de membre en raison, notamment, de l'inflammation chronique qui s'y installe (Wilmink, Veenman *et al.*, 2003; Wilmink et van Weeren, 2005). Les traitements communément appliqués aux plaies semblent malheureusement contribuer au développement de cette pathologie. L'utilisation de bandage sur les plaies du membre augmente l'incidence du TGE en limitant les échanges en oxygène entre la plaie et l'environnement (Berry et Sullins, 2003; Lepault, Celeste *et al.*, 2005; Wilmink et van Weeren, 2005). En fait, les bandages augmentent le

gradient d'oxygène entre les tissus et la surface de la plaie, ce qui stimule l'angiogenèse. De plus, ils réduisent la tension en oxygène de la plaie augmentant la prolifération des fibroblastes. Par ailleurs, le bandage crée un milieu chaud, humide et acide qui favorise la migration et la prolifération cellulaire. Les bandages peuvent également irriter la plaie et causer une accumulation d'exsudat à la surface de celle-ci. Tous ces facteurs favorisent la formation d'un TGE (Theoret et Wilmink, 2008).

1.3.4 Prévention et traitement des plaies développant un TGE

La protection d'une plaie contre le développement d'un TGE passe par un contrôle des facteurs de risque, particulièrement ceux liés à l'infection et à l'inflammation. Les plaies doivent être débridées de tout corps étranger et de parcelle osseuse, de tendons ou de ligaments nécrosés. Les plaies ne doivent pas être enduites de substances irritantes. Le bandage joue un rôle mitigé. Son utilisation est importante pour prévenir la contamination et pour protéger contre de nouveaux traumatismes et peut réduire le mouvement des tissus au niveau de la plaie, ce qui diminue la formation de TGE. Toutefois, le bandage provoque un microclimat favorable à la prolifération cellulaire et à la synthèse matricielle. Lorsqu'utilisé, un bandage devrait être retiré, au moins temporairement, au moment où la cavité formée par la plaie est remplie d'un tissu de granulation sain (Theoret et Wilmink, 2008). En revanche, l'absence de bandage peut favoriser la contamination et la sécheresse des tissus lésés, engendrant un retard de guérison. Une étude a démontré que l'usage de bandage ne prolonge pas la durée de guérison lorsque le TGE qui se développe est excisé dès sa formation (Berry et Sullins, 2003). Pour des plaies de taille plus importante, l'utilisation de greffes cutanées est une façon très efficace d'inhiber la formation d'un TGE. La présence de greffons limite la prolifération des cellules endothéliales et des fibroblastes, ainsi que la synthèse matricielle par ces derniers, en plus d'apporter de nouveaux kératinocytes capables d'initier l'épithélialisation. L'effet des kératinocytes sur

les fibroblastes serait occasionné par un produit soluble dérivé des cellules épithéliales qui serait responsable de l'apoptose des fibroblastes sous-jacents et également de leur différenciation en myofibroblaste permettant la contraction (Desmouliere *et al.*, 1995; Greenhalgh, 1998; Werner *et al.*, 2007). Lorsque la technique de greffe est utilisée, il est recommandé que les greffons soient prélevés d'une région qui normalement guérit adéquatement et où la contraction est importante, telle que l'abdomen ou le poitrail du cheval.

Une fois installé, le TGE doit être pris en charge et les traitements vont dépendre de l'âge de la plaie et du type de tissu de granulation. Dans un premier temps, le TGE doit être examiné avec attention, dans le but de déceler la cause de cette fibrose. Par exemple, la présence de corps étranger ou de tissus nécrosés peut entretenir une inflammation chronique ou si le TGE est situé au niveau ou près d'une articulation, le mouvement peut stimuler la formation excessive de tissu de granulation. Dans le cas de mouvement trop important, l'immobilisation est bénéfique. Elle peut être réalisée à l'aide d'un plâtre dans le cas d'un TGE récent et d'apparence saine, sinon l'immobilisation à l'aide d'une attèle est préférable afin de pouvoir apporter des soins répétés à la plaie. Parfois la cause n'est pas apparente; dans ces cas, le coupable est souvent l'inflammation chronique. Dans ces cas, l'application de corticostéroïdes topiques, restreints à une ou deux applications est suffisante pour calmer l'inflammation et permettre la poursuite du processus de guérison. Les corticostéroïdes doivent être utilisés avec prudence, car souvent ils vont inhiber la réponse inflammatoire en entier, et non pas être spécifiques à la diminution du TGF- β 1 et 2 qui sont responsables de la prolifération des fibroblastes et de la synthèse excessive de matrice extracellulaire. Leur action pourrait alors également restreindre l'angiogenèse, la contraction et l'épithélialisation, des étapes cruciales à la guérison (Theoret et Wilmink, 2008).

Dans la plupart des cas, le traitement du TGE nécessite la résection de celui-ci, afin d'éliminer le tissu de granulation chevauchant la bordure épithéliale et nuisant à la migration de kératinocytes. La résection permet d'enlever les tissus en excès et non-viables en plus d'enlever les contaminants et les leucocytes en surface de la plaie, ce qui aura pour effet de diminuer les stimuli responsables d'inflammation chronique. Lorsque la résection est réalisée de façon aseptique et suivie de la pose de bandages stériles, afin de limiter l'hémorragie, et d'antibiotiques topiques, la plaie reprend habituellement le cours normal de la guérison puisque la contraction et l'épithélialisation reprennent. Il est toutefois possible de devoir recourir à plusieurs résections avant que le processus de guérison ne soit rétabli (Theoret et Wilmink, 2008).

1.3.5 Modèle expérimental

1.3.5.1 Modèle *in vivo*

Le modèle expérimental utilisé pour étudier *in vivo* la pathologie du « bouton de chair » est basé sur les observations précédentes concernant l'application des bandages sur les plaies. Les bandages sont utilisés dans le but de renforcer et soutenir la guérison tissulaire en diminuant les risques de contamination, l'œdème, l'exsudat et en protégeant contre les mouvements et d'autres traumatismes (Céleste, Deschene *et al.*, In press). Par contre, comme il a été mentionné précédemment, plusieurs caractéristiques des bandages perturbent la guérison normale et augmentent l'incidence de la formation du TGE au niveau des plaies appendiculaires. Plusieurs études antérieures sont basées sur ce modèle expérimental (Theoret, Barber *et al.*, 2001; Theoret, Barber *et al.*, 2002; De Martin et Theoret, 2004; Ducharme-Desjarlais *et al.*, 2005; Lepault, Celeste *et al.*, 2005; Dubuc, Lepault *et al.*, 2006), développé en 1996 par Theoret et al. Afin d'augmenter la puissance statistique des études utilisant ce modèle animal, tout en respectant les lignes directrices du Conseil

canadien de protection des animaux (remplacement, réduction et raffinement), trois plaies de 6,25 cm² sont créées chirurgicalement sur chacun des trois sites : le corps (paroi thoracique) et les deux membres thoraciques, dont un est mis sous bandage pour stimuler la formation du TGE. En procédant de cette façon, chaque cheval est son propre contrôle, ce qui limite l'effet des différences interindividuelles.

1.3.5.2 Modèle *in vitro*

Le second volet de l'étude en est un *in vitro* ayant recours à des cultures de fibroblastes dermiques équins (FDE). Ces derniers ont été ciblés puisqu'ils sont le type cellulaire prédominant dans le TGE. De plus, les fibroblastes synthétisent le collagène, composante majeure de la matrice extracellulaire lors de conditions fibroprolifératives. Les fibroblastes possèdent plusieurs phénotypes qui leur confèrent différentes fonctions (Mollenhauer et Bayreuther, 1986; Sempowski, Borrello *et al.*, 1995). Mollenhauer *et al.* ont établi qu'il existe trois phénotypes de fibroblastes. FI, de morphologie habituelle, c'est-à-dire ayant une forme longiligne, possède une activité proliférative importante, mais synthétise peu de collagène de types I et III. FII a un aspect épithélioïde et possède un taux de prolifération lent mais une capacité de synthèse supérieure à FI. FIII regroupe des cellules très larges, légèrement étoilées. Les FIII prolifèrent beaucoup moins rapidement que les deux autres phénotypes, mais synthétisent la plus grande quantité de collagène (Mollenhauer et Bayreuther, 1986). Un autre type de fibroblaste retrouvé durant la guérison cutanée est celui différencié en myofibroblaste. Le myofibroblaste se distingue des fibroblastes normaux par la présence de microfilaments similaires à ceux retrouvés dans les cellules musculaires lisses. De plus, les microfilaments expriment la protéine α -SMA (smooth muscle actine). Ces deux caractéristiques lui confèrent un rôle dans la contraction des plaies en raison de la forte capacité contractile (Clark, 1996; Sarrazy *et al.*, 2011). En conclusion, plusieurs caractéristiques permettent de

distinguer les phénotypes des fibroblastes: le taux de prolifération, la capacité migratoire et de synthèse protéique, le niveau d'apoptose ainsi que la contractilité.

Un nombre croissant d'études démontrent que les fibroblastes ont des caractéristiques distinctes selon leur localisation anatomique; ce sont des cellules différenciées hétérogènes (Chang *et al.*, 2002). Il a également été démontré que les fibroblastes peuplant les tissus pathologiques exhibent des caractéristiques particulières. Par exemple, les myofibroblastes provenant de CH expriment des niveaux plus élevés de Bcl-2, un facteur anti-apoptotique, que les fibroblastes dermiques de peau normale (Moulin, Larochelle *et al.*, 2004). Pour la présente étude, des fibroblastes dermiques de deux sites anatomiques (membre et corps) sont mis en culture. Certaines différences anatomiques sont connues chez le cheval. La prolifération de fibroblastes provenant du membre serait moindre que celle des fibroblastes cultivés à partir de peau de la région thoracique (Miller, Wilson *et al.*, 2000). Les fibroblastes provenant du membre auraient une capacité contractile plus précoce et plus forte que ceux provenant de la croupe (Wilmink, Nederbragt *et al.*, 2001). Cependant, l'auteure attribue cette différence au fait que les fibroblastes de membre prolifèrent moins rapidement et sont donc en culture plus longtemps, donnant naissance à des fibroblastes matures ayant une capacité contractile accrue.

Dans le cadre de la présente étude, les deux sources cellulaires sont soumises à des conditions d'hypoxie (induite par voie chimique ou physique), dans le but de reproduire les conditions retrouvées dans le TGE (Céleste, Deschene *et al.*, 2011; Céleste, Deschene *et al.*, In press). Les diverses expériences permettront de vérifier l'existence de différences intrinsèques du fibroblaste selon sa provenance anatomique ainsi que des différences liées à sa réponse à l'hypoxie.

1.4 Contribution de l'oxygène à la guérison de plaie

L'oxygène est un élément chimique prépondérant de l'environnement (air, eau) et également dans la composition corporelle. L'oxygène est crucial à la survie cellulaire, car il est impliqué dans plusieurs mécanismes, tels que la chaîne respiratoire mitochondriale et la synthèse d'énergie et de protéines ainsi que la maturation des matrices extracellulaires (Tandara et Mustoe, 2004; Rodriguez *et al.*, 2008; Sen, 2009; Guo et Dipietro, 2010). En fait, plus de 90% de l'oxygène consommé est utilisé par les cellules pour la respiration mitochondriale permettant la production d'adénosine triphosphate (ATP), l'énergie cellulaire (Sen, 2009). De plus, l'oxygène produit des radicaux libres et des dérivés oxygénés qui, à de faibles niveaux, servent de messagers dans différentes cascades signalétiques (Sen, 2009).

L'oxygène respiré est acheminé aux cellules via la microcirculation. La diffusion de l'oxygène vers les cellules est nécessaire à la production et au maintien de niveaux adéquats en ATP. En absence de cette énergie, les cellules ne peuvent pas voir à leur propre fonction ni à la synthèse de protéines (Rodriguez, Felix *et al.*, 2008). Les tissus sous-cutanés possèdent un grand espace intercapillaire et sont des tissus qui, normalement, consomment peu d'oxygène (Gottrup, 2004). La guérison occasionne une augmentation de la demande énergétique, donc de la consommation en oxygène (Sen, 2009). Une distribution adéquate en oxygène est nécessaire pour assurer une guérison optimale et une résistance à l'infection (Gottrup, 2004). Une guérison retardée ou le développement d'infection est souvent le résultat d'une diminution de la perfusion qui, conséquemment, diminue l'oxygénation tissulaire (Gottrup, 2004). Un niveau d'oxygène tissulaire insuffisant à la demande est nommé hypoxie (Sen, 2009).

L'hypoxie, tout comme l'oxygène, contribue aux diverses phases de la guérison. La pression partielle en oxygène d'un tissu est influencée par la

distribution de l'oxygène des poumons vers les tissus, par le transport de l'oxygène depuis la circulation sanguine vers les cellules et par la consommation en oxygène des tissus, faisant de l'hypoxie un terme relatif et spécifique à chaque tissu (Sen, 2009). En fait, la fenêtre de normoxie est très étroite dû aux risques de dommages oxydatifs par excès d'O₂ (hyperoxie) ou de lacune métabolique par manque d'O₂ (hypoxie) (Sen, 2009). Les tissus sous-cutanés sont les premiers à être privés d'oxygène et les derniers à être réapprovisionnés lors d'un manque, bien que leurs besoins soient relativement minimes (Gottrup, 2004). En général, l'hypoxie aiguë de faible à modérée permettra une adaptation ainsi que la survie cellulaire, en plus d'être nécessaire au déclenchement de certains processus (Sen, 2009). En revanche l'hypoxie extrême, rapprochant l'anoxie telle que rencontrée dans certaines pathologies de la guérison, est non compatible avec la guérison tissulaire (Sen, 2009).

1.4.1 L'oxygène dans les différentes phases de la guérison cutanée et la contribution de l'hypoxie

L'oxygène est impliqué dans un grand nombre de processus durant la guérison tissulaire. Sa présence est cruciale à chacune des trois phases (Figure 12). Brièvement, il contribue grandement au contrôle de l'infection, à l'épithélialisation, à l'angiogenèse ainsi qu'à la synthèse et la maturation du collagène (Gordillo et Sen, 2003; Rodriguez, Felix *et al.*, 2008; Thackham *et al.*, 2008; Guo and Dipietro, 2010; Schreml *et al.*). Une enzyme très importante pour l'activité de l'oxygène est la NADPH oxidase; elle permet la production de O₂^{•-} qui est instantanément changé en H₂O₂ par la superoxyde dismutase (Figure 12) (Gordillo and Sen, 2003). Il existe plusieurs isoformes de l'enzyme NADPH oxidase qui sont exprimés selon le type cellulaire. L'isoforme présent dans les cellules phagocytaires (neutrophile et macrophage) permet la production de ROS à un taux trois fois supérieur à

celui des isoformes des cellules non phagocytaires (cellules endothéliales et fibroblastes) (Droge, 2002).

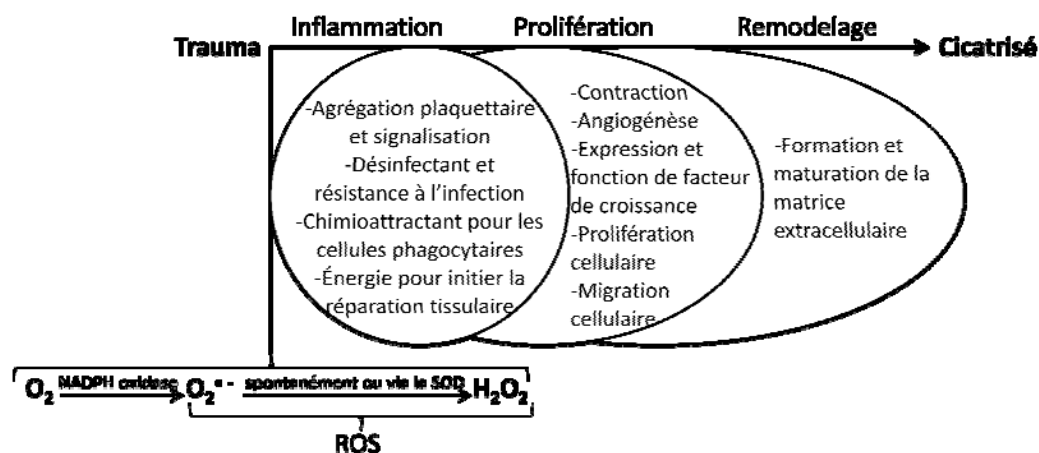


Figure 12 : Rôle de l'oxygène et de ses dérivés durant la guérison cutanée

En plus d'être crucial à la respiration cellulaire et à la synthèse d'énergie, l'oxygène contribue à chacune des trois phases de la guérison. (SOD : superoxyde dismutase)
Figure traduite de : Gordillo et Sen, 2003

1.4.1.1 Phase inflammatoire

Suivant une blessure, la microcirculation est endommagée et il y a contraction des vaisseaux. De surcroît, il y a une augmentation drastique de la consommation en oxygène par les cellules dermiques, rendant l'environnement de la plaie davantage hypoxique (Gottrup, 2004; Tandara et Mustoe, 2004; Rodriguez, Felix *et al.*, 2008; Guo et Dipietro, 2010; Schreml, Szeimies *et al.*). Notamment, le centre de la plaie est largement plus hypoxique que sa périphérie (Gordillo et Sen, 2003; Rodriguez, Felix *et al.*, 2008). Le transport de l'oxygène par les capillaires vers le site dépend de la diffusion, diminuée dans les plaies infectées (Tandara et Mustoe, 2004). L'hypoxie initie la guérison en augmentant la production des ROS, activant les plaquettes et les cellules endothéliales et en induisant la relâche de cytokines, telles que VEGF, TGF- β et TNF (Schreml, Szeimies *et al.*, 2010). Le système inflammatoire consommera plus d'oxygène dans le but de permettre aux

cellules phagocytaires d'éliminer les intrus (bactéries, cellules mortes, débris, etc.) présents au site de la plaie. La pression partielle en oxygène est un déterminant majeur de la susceptibilité à l'infection (Gordillo et Sen, 2003). Les intrus sont normalement éliminés par le mécanisme oxydatif intracellulaire (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase) des leucocytes, qui nécessite une grande quantité d'oxygène et produit un nombre important de ROS (Gottrup, 2004; Tandara et Mustoe, 2004; Rodriguez, Felix *et al.*, 2008; Sen, 2009). Par conséquent, pour prévenir l'infection, l'oxygénation tissulaire doit être suffisante pour permettre un métabolisme oxydatif, «respiratory burst», efficace (Tandara et Mustoe, 2004). Près de 98% de l'oxygène consommé par les neutrophiles de la plaie sert au métabolisme oxydatif (Allen *et al.*, 1997). La production des ROS est augmentée autant en présence d'hypoxie que d'hyperoxie (Tandara et Mustoe, 2004; Rodriguez, Felix *et al.*, 2008). Les ROS sont impliqués dans la cascade de coagulation et dans l'induction de plusieurs cytokines, telles que PDGF, TGF- β et VEGF (Rodriguez, Felix *et al.*, 2008; Schreml, Szeimies *et al.*). Ces cytokines contribuent à divers processus des différentes phases de la guérison, tels que la prolifération cellulaire, la chimiotaxie et la perméabilité vasculaire. Notamment, les ROS induisent la chimiotaxie des neutrophiles (Rodriguez, Felix *et al.*, 2008). La capacité des ROS à induire la transcription de divers gènes passe par leur aptitude à activer plusieurs cascades de signalisation, telles que MAPK et STAT (Figure 13).

Figure 13 : Activation et signalisation des ROS

La transcription de divers gènes nécessaires à la guérison est induite par l'activation de diverses cascades de signalisation par les ROS produits par les cytokines, l'hypoxie, les cellules phagocytaires et les facteurs de croissance.

Figure adaptée de : Lum et Roebuck, 2001 et Lee *et al.*, 2003

Une production trop importante de ROS est néfaste et toxique pour les cellules, car ces radicaux causent des dommages oxydatifs (Tandara et Mustoe, 2004; Schreml, Szeimies *et al.*). Cette explosion de radicaux détruit, certes, les bactéries, mais par le fait même endommage les tissus et cellules avoisinants (Sen, 2009). L'hypoxie est importante dans le processus de coagulation et à l'initiation de la guérison, néanmoins l'oxygène est critique pour prévenir l'infection (Rodriguez, Felix *et al.*, 2008; Schreml, Szeimies *et*

al.). Des études expérimentales ont démontré que l'oxygène et certains antibiotiques ont des effets positifs additifs et que les antibiotiques sont moins efficaces dans des plaies hypoxiques (Gordillo et Sen, 2003; Gottrup, 2004; Rodriguez, Felix *et al.*, 2008). De plus, l'hypoxie diminue la production d'interleukines 2 et 8 qui jouent un rôle dans l'activation des neutrophiles, macrophages, cellules T et cellules endothéliales (Rodriguez, Felix *et al.*, 2008).

1.4.1.2 Phase proliférative

L'inflammation aiguë en réponse au trauma représente un incitatif important pour la production de ROS par la NADPH oxydase. Suite à la chute des niveaux de ROS et à l'élimination des cellules phagocytaires, le faible niveau de ROS sert de messenger cellulaire afin de stimuler la migration et la prolifération de diverses cellules, d'activer certaines cytokines et de promouvoir l'angiogenèse (Gordillo et Sen, 2003; Rodriguez, Felix *et al.*, 2008; Sen, 2009). Dans des tissus hypoxiques, plusieurs facteurs de croissance et mécanismes moléculaires seront ralentis, étant donné que les réactions d'oxydoréduction sont restreintes (Sen, 2009). L'adaptation cellulaire à l'hypoxie et l'homéostasie de l'oxygène seront régulées, en grande partie, par la stabilisation du facteur de transcription induit par l'hypoxie (HIF). Durant la guérison, le HIF1A sera stabilisé puis transloqué au noyau où il pourra augmenter la transcription de plusieurs gènes ayant des rôles dans le métabolisme du glucose, le transport du fer, le contrôle du tonus vasculaire et l'angiogenèse (Rodriguez, Felix *et al.*, 2008). Ce facteur, très important, sera décrit en détail dans la section suivante (section 1.4.2). L'angiogenèse est cruciale au processus de guérison, afin de rétablir des niveaux d'oxygène adéquats et permettre le bon déroulement de la guérison. La littérature en cancérologie rapporte que l'hypoxie aiguë, d'intensité faible à modérée, crée une réaction de stress cellulaire identifiée comme étant un important déclencheur de la transcription des facteurs angiogéniques, bien que cet effet

soit temporaire (Gordillo et Sen, 2003; Gottrup, 2004; Sen, 2009). Les nouveaux vaisseaux formés par l'angiogenèse dans le tissu de granulation vont permettre le rétablissement des niveaux en oxygène (Tandara et Mustoe, 2004). Par exemple, suivant un trauma (24h post-trauma) à l'oreille du lapin, l'acide ribonucléique messager (ARNm) du VEGF est augmenté de 6 à 7 fois (Corral *et al.*, 1999). L'oxygène est nécessaire à la synthèse de NO, qui permet une régulation du tonus vasculaire et de l'angiogenèse et est un puissant antioxydant (Sen, 2009). Le NO est un messenger signalétique dans plusieurs cascades, en plus d'être un régulateur de la stabilisation du HIF (Sen, 2009). Les ROS vont également intervenir dans l'angiogenèse (Sen, 2009). En fait, ceux produits par le stress oxydatif induisent le bFGF, facteur pro-angiogénique (Rodriguez, Felix *et al.*, 2008). De plus, dans les tissus, les anions superoxydes vont rapidement se transformer en peroxyde d'hydrogène qui est impliqué dans la signalisation de redox. Ce signal contribue à plusieurs aspects de la guérison tels que la migration cellulaire, la prolifération et l'angiogenèse. L'hypoxie sert également d'élément initiateur de l'épithélialisation (Rodriguez, Felix *et al.*, 2008). Cependant, l'épithélialisation dépend du niveau d'hydratation et d'oxygène. *In vitro*, la prolifération des cellules épithéliales est optimale à une concentration entre 10 et 50% en oxygène (Gottrup, 2004; Rodriguez, Felix *et al.*, 2008). En condition hypoxique, la motilité des kératinocytes est augmentée (O'Toole *et al.*, 1997). Cependant, les mêmes auteurs ont démontré qu'un bas niveau de ROS inhibe la migration et la prolifération de ceux-ci (O'Toole *et al.*, 1996; Tandara et Mustoe, 2004). Toutefois, l'influence des ROS sur les facteurs de croissance tels que EGF accélère l'épithélialisation (Rodriguez, Felix *et al.*, 2008). En clinique, un traitement hyperbare augmente la différenciation des kératinocytes, mais pas leur prolifération (Gottrup, 2004). Pour leur part, les fibroblastes nécessitent de l'oxygène pour proliférer (Tandara et Mustoe, 2004). *In vivo*, il a été démontré que les fibroblastes prolifèrent uniquement dans les zones périphériques où la tension atteint 15 mm Hg (~2 %O₂), car le centre de la plaie se situe entre 5 et 15 mm Hg (Tandara et Mustoe, 2004). Il a

également été démontré sur des fibroblastes cardiaques que l'oxygène initie la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, permettant la contraction (Roy *et al.*, 2003).

1.4.1.3 Phase de remodelage

La résistance d'une cicatrice est influencée par la quantité de collagène produit et sa maturation qui est directement corrélée avec la pression partielle en oxygène dans le tissu (Gottrup, 2004; Sen, 2009). Plusieurs étapes post-transcriptionnelles de la synthèse collagénique sont O₂-dépendantes (Gordillo et Sen, 2003). Comme pour l'angiogenèse et l'épithélialisation, l'hypoxie semble initier la synthèse de collagène, mais ne peut soutenir ce processus (Rodriguez, Felix *et al.*, 2008). L'hypoxie augmente la synthèse et la sécrétion de TGF-β1 par les fibroblastes *in vitro* et augmente l'expression du pro-collagène 1 (Falanga, Qian *et al.*, 1991; Falanga *et al.*, 1993). De plus, le TGF-β1 stimule la migration des fibroblastes en culture (Tandara et Mustoe, 2004). Les fibroblastes et leur réponse à l'hypoxie seront décrits de façon élaborée dans une section subséquente (section 2.4.4). Toutefois, l'oxygène reste primordial à la maturation du collagène (Tandara et Mustoe, 2004; Schreml, Szeimies *et al.*). Sa maturation est orchestrée par des enzymes (prolyl et lysyl hydroxylases) qui incorporent l'oxygène dans la structure du collagène immature (Gottrup, 2004; Rodriguez, Felix *et al.*, 2008; Sen, 2009). La quantité et la qualité du collagène produit au site de la plaie déterminent la résistance de la cicatrice.

Durant le processus de guérison, il est possible que certaines cellules soient exposées à des niveaux d'hypoxie trop sévères et, malgré un retour ultérieur à un état normal d'oxygénation, ne réussissent pas à survivre. Par contre, le retour de l'oxygène permettra l'élimination appropriée des cellules et tissus morts et leur remplacement via la prolifération des cellules avoisinantes (Sen, 2009). Les plaies hypoxiques souffriront d'un dépôt pauvre en collagène

et s'infecteront facilement (Sen, 2009). L'hypoxie aiguë, de légère à modérée, est souhaitable pour entraîner l'angiogenèse et d'autres mécanismes physiologiques, par contre l'hypoxie sévère ou chronique est à proscrire, car incompatible avec la réparation tissulaire (Thackham, McElwain *et al.*, 2008; Sen, 2009; Guo et Dipietro, 2010). Les personnes / animaux âgés semblent avoir une réponse exagérée à l'hypoxie, ralentissant considérablement leur processus de guérison (Tandara et Mustoe, 2004). En somme, autant la présence que l'absence d'oxygène jouent un rôle primordial dans la guérison.

1.4.2 Marqueur moléculaire d'hypoxie; facteur de transcription :

HIF1A

Dans les cellules de mammifère, le HIF est un facteur de transcription dépendant de l'oxygène. Il joue un rôle primordial dans l'homéostasie de l'oxygène autant au niveau cellulaire que systémique (Lee *et al.*, 2004). HIF est un hétérodimère qui a été découvert dans le laboratoire de Semenza et collaborateurs dans le début des années 1990 (Semenza et Wang, 1992). L'ARNm de la sous-unité alpha est présent dans une grande variété de types cellulaires, par contre la protéine est dégradée dans la plupart des cellules en condition de normoxie. La protéine sera stabilisée dans les cellules en condition hypoxique, mais parfois elle est constitutivement exprimée dans certains types cellulaires ou dans des cellules cancéreuses. Le complexe HIF-1 induit la transcription de plusieurs gènes dont les protéines ont un rôle sur l'angiogenèse, le transport du glucose, le métabolisme, etc. (Lee, Bae *et al.*, 2004).

1.4.2.1 Structure de la protéine

La protéine HIF-1 a été clonée en 1995 par l'équipe de Wang, basé sur sa capacité à lier la région 3' «enhancer» du gène d'érythropoïétine (Distler *et*

al., 2004). Le HIF-1 est composé de deux sous-unités: HIF1A et Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT), aussi connu sous le nom de HIF-1 β . Ils font partie de la superfamille des bHLH-PAS, car les deux sous-unités contiennent un domaine basique «helix-loop-helix» (bHLH) leur permettant de reconnaître et de lier des séquences d'ADN spécifiques (Figure 14) (Distler, Wenger *et al.*, 2004; Lee, Bae *et al.*, 2004). HIF1A et ARNT possèdent une région PAS (Per, ARNT, Sim) en position N-terminale qui permet leur hétérodimérisation (Figure 14). La sous-unité ARNT est constitutivement exprimée dans la plupart des types cellulaires. ARNT est une protéine nucléaire de 91-94 kDa (Distler, Wenger *et al.*, 2004). Son activité est régulée de façon oxygène-indépendant (Lee, Bae *et al.*, 2004). Seule, elle est incapable de lier l'ADN et d'agir en tant que facteur de transcription. La sous-unité alpha est plus complexe, car elle possède un domaine de dégradation oxygène-dépendant (ODDD) (Figure 14) (Weidemann et Johnson, 2008). Ce domaine est le lieu d'hydroxylation, essentiel à la dégradation du HIF1A en condition normoxique. La régulation sera élaborée à la section 2.4.2.2. Dans ce domaine se trouvent deux sites de phosphorylation (Pro402 et Pro564), très importants pour la régulation du HIF (Lee, Bae *et al.*, 2004). C'est également l'emplacement d'un site d'acétylation (K532). La protéine est initialement synthétisée dans le cytoplasme et possède un poids moléculaire de 120 kDa (Distler, Wenger *et al.*, 2004). HIF1A possède deux domaines de signal de localisation nucléaire (SLN) qui permettent la translocation de la protéine stabilisée vers le noyau où elle pourra former un dimère avec ARNT (Figure 14). De plus, il possède deux domaines de transactivation (TAD), un en C-terminal et l'autre qui est superposé avec le domaine ODDD en N-terminal (Distler, Wenger *et al.*, 2004). Le domaine C-TAD permet l'interaction entre HIF1A et ses co-activateurs tels que p300/CBP et SRC1 indépendamment de la stabilité de la protéine et est nécessaire à la pleine activation de HIF1 (Lando *et al.*, 2002).

Il existe cinq variantes de HIF1A produit par épissage alternatif; trois peuvent activer la transcription de gènes et deux sont dominants négatifs (Lee, Bae *et al.*, 2004). Dans la même superfamille bHLH-PAS, deux autres isoformes de la sous-unité alpha peuvent dimériser avec ARNT : HIF2A et HIF3A. HIF2A est exprimé par tous les types cellulaires tout comme le HIF1A. HIF1A et HIF2A possèdent des fonctions cellulaires qui sont non-redondantes (Kenneth et Rocha, 2008). Le HIF3A, un dominant négatif, est principalement exprimé dans le cerveau, le thymus et les muscles (Lee, Bae *et al.*, 2004).

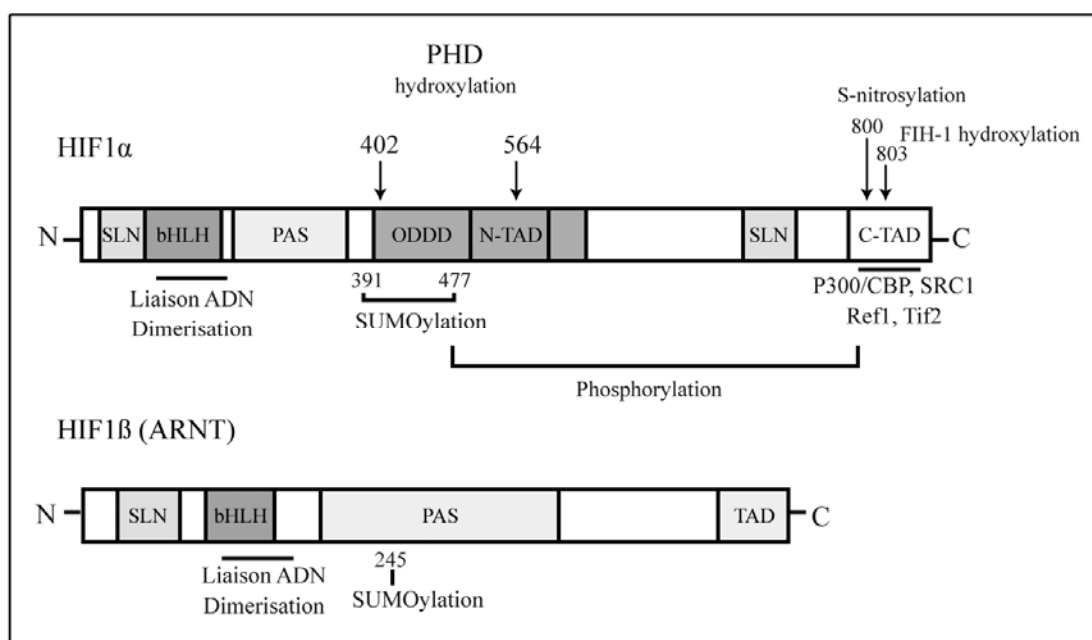


Figure 14: Structure et site de régulation de HIF1A et de ARNT

Diagramme illustrant les différents domaines des deux protéines, ainsi que les sites d'hydroxylation impliqués dans la régulation de HIF1A.

Figure tirée de : Lauzier *et al.*, 2006

1.4.2.2 La régulation de HIF1A

L'activité du HIF1 est contrôlée par la synthèse, la dégradation et la localisation intracellulaire de la sous-unité alpha (Chachami *et al.*, 2009). La régulation de HIF1 peut être oxygène-dépendante ou oxygène-indépendante (Figure 15). Des expériences *in vitro* montrent que la régulation de HIF1A

repose totalement sur la stabilité de la protéine, par contre quelques évidences *in vivo* tendent à montrer qu'une certaine régulation de HIF1A provient également de l'ARNm (Lee *et al.*, 2000) (Figure 15).

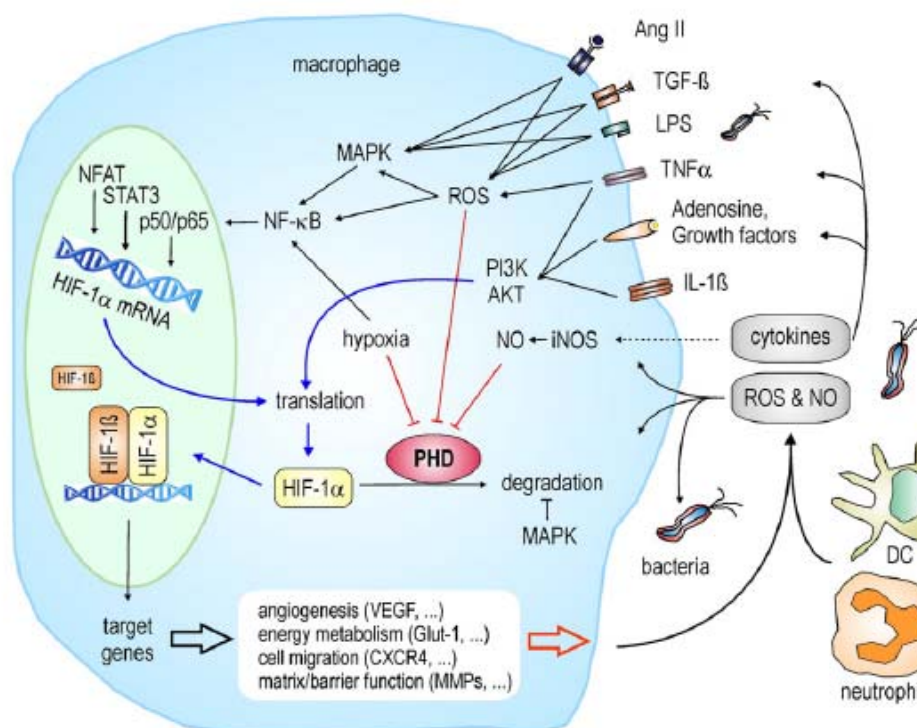


Figure 15: Régulation oxygène dépendante et indépendante de HIF1A

Exemple de régulation du HIF1A à l'intérieur du macrophage. La régulation a lieu autant sur la transcription, la traduction que post-traductionnelle. La régulation par l'oxygène est présentée, ainsi qu'indépendante de celle-ci soit par des cytokines, par les ROS ou par le NO. La stabilisation du HIF1A est nécessaire à la transcription de divers gènes.

Figure tirée de : Dehne et Brune, 2009

1.4.2.2.1 La régulation oxygène-dépendante

La régulation du HIF dépendante de l'oxygène implique des changements post-traductionnels (Figure 15). En condition normoxique, la protéine HIF1A est très labile; suite à la traduction elle est rapidement

dégradée par la cascade ubiquitine-protéasome médiée par la protéine von Hippel Lindau (pVHL) (Distler, Wenger *et al.*, 2004; Lee, Bae *et al.*, 2004) (Figure 16). Le temps de demi-vie approximatif du HIF1A à une concentration normale en oxygène (159 mm Hg ou 21%O₂) est de moins de cinq minutes (Pouyssegur *et al.*, 2006). Le niveau de HIF1A stabilisé augmente de façon exponentielle lorsque la concentration en oxygène est plus petite que 6%, avec une réponse maximale, selon le type cellulaire, qui se trouve près de 0,5% (Distler, Wenger *et al.*, 2004) (Figure 16).

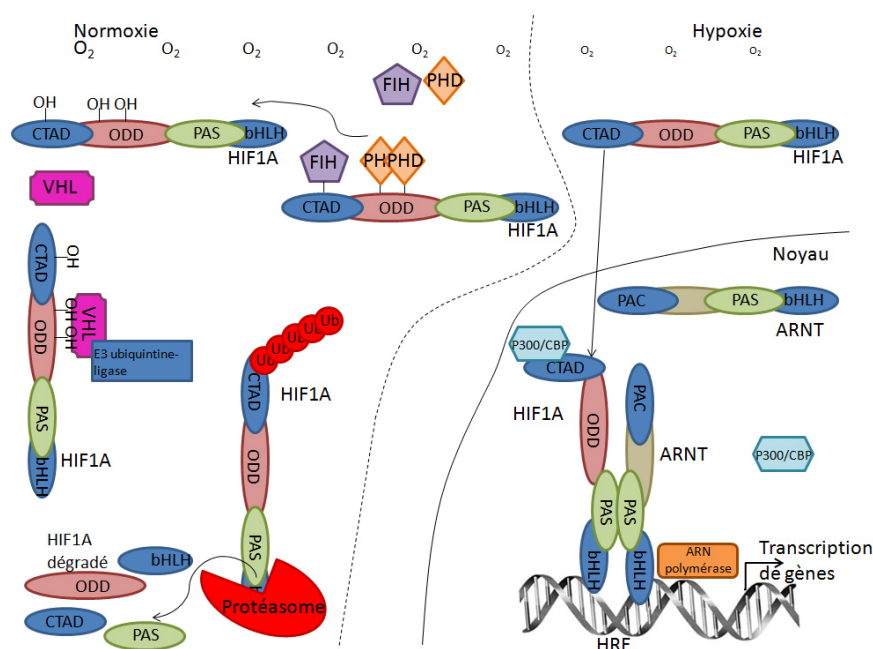


Figure 16: Régulation oxygène dépendante de HIF1A

La régulation par l'oxygène du HIF1A est orchestrée par les PHD et FIH, deux enzymes nécessitant l'oxygène comme cofacteur. Lorsque HIF1A est hydroxylé, il est reconnu par pVHL qui entraîne son ubiquitination et par la suite sa dégradation par le protéasome. Lorsque les niveaux d'oxygène ne suffisent pas à hydroxyler HIF1A, la protéine est stabilisée et ainsi elle peut transloquer au noyau où elle dimérisera avec ARNT et la liaison des co-activateurs (P300/CBP). Le dimère lie l'ADN sur l'élément de réponse à l'hypoxie (HRE) et active la transcription de gènes impliqués dans l'adaptation à l'hypoxie.

Figure adaptée de : Distler *et al.*, 2004 et Kenneth et Rocha, 2008

La régulation du HIF1A est orchestrée par l'hydroxylation de 2 résidus proline (402 et 564) localisés dans le domaine ODD (Figure 16). L'hydroxylation de ces résidus agit comme un signal de reconnaissance pour pVHL (Distler, Wenger *et al.*, 2004; Kenneth et Rocha, 2008). L'hydroxylation des résidus de proline est réalisée par trois prolyl hydroxylases (PHD). Les PHD sont des dioxygénases fer-dépendantes donc, elles nécessitent l'oxygène et l'oxoglutarate comme cofacteurs (Distler, Wenger *et al.*, 2004) (Figure 17). Elles sont les senseurs du niveau d'oxygène moléculaire dans la cellule (Jewell *et al.*, 2001; Kenneth et Rocha, 2008). PHD2 est celle qui possède la plus grande affinité pour HIF1A (Kenneth et Rocha, 2008).

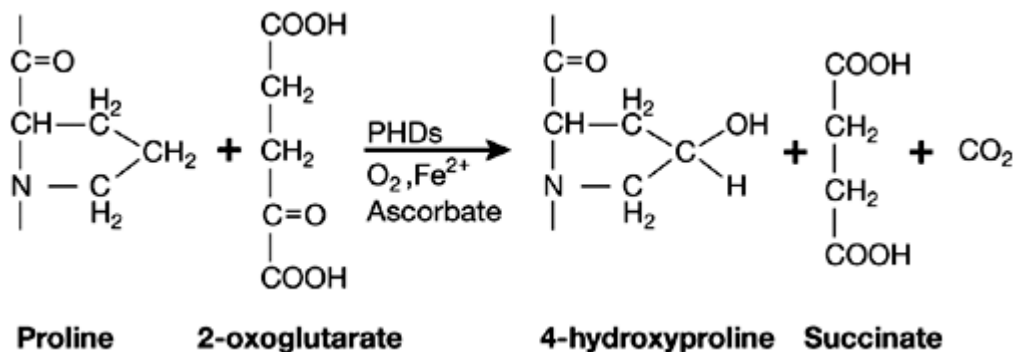


Figure 17: Réaction enzymatique des prolyl hydroxylases

Les PHDs sont des enzymes qui permettent d'hydroxyler les résidus de proline d'une protéine (tel que HIF1A) en utilisant l'oxygène et le fer ferreux (Fe^{2+}) comme cofacteurs.

Figure tirée de : Berra *et al.*, 2006

L'acétylation de la lysine 532 dans le domaine ODD par l'ADP-ribosylation factor domain protein 1 (ARD1) entraîne une dégradation rapide de HIF1A (Distler, Wenger *et al.*, 2004). Une mutation de ce résidu stabilise HIF1A, même en condition normoxique. Le niveau d'acétylation du HIF1A diminue graduellement en fonction du temps d'exposition à l'hypoxie dû à la réduction de l'expression d'ARD1. Cette acétylation est critique à la dégradation via le protéasome (Lee, Bae *et al.*, 2004). L'activation de HIF-1 nécessite le recrutement de co-activateurs de la transcription, tels que P300 et CBP (pour CREB (cAMP-response-element-binding protein)-binding protein)

(Figure 16). Cette activation est inhibée par une autre modification post-traductionnelle : l'hydroxylation du résidu asparagine 803 en c-terminal (Kenneth et Rocha, 2008). Cette hydroxylation est catalysée par une autre dioxygénase, factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) (Lando, Peet *et al.*, 2002). FIH-1 est un second senseur d'oxygène, car il utilise également l'oxygène comme substrat (Lee, Bae *et al.*, 2004). L'hydroxylation empêche la liaison des co-activateurs de HIF (p300 ou CBP) ce qui empêche la pleine activation de HIF1 (Kenneth et Rocha, 2008). Sans la liaison de ses cofacteurs, HIF1A peut tout de même activer la transcription d'un certain nombre de gènes (Kasper *et al.*, 2005). Les PHD sont inactives à des concentrations en oxygène qui permettent l'activité de FIH gardant le domaine c-TAD inactif (Pouyssegur, Dayan *et al.*, 2006).

La régulation du HIF1A est dépendante de la disponibilité en oxygène pour que les PHD puissent hydroxyler les deux résidus, qui seront ensuite reconnus par la protéine suppresseur de tumeur VHL. La reconnaissance par pVHL mène rapidement à l'ubiquitination de la protéine par le complexe ubiquitine-ligase E3 et subséquentement à sa dégradation via le protéasome (Figure 16). Inversement, dans des conditions d'hypoxie, les prolyl hydroxylases ne peuvent pas hydroxyler HIF1A ce qui empêche sa reconnaissance par pVHL et ainsi sa stabilisation (Distler, Wenger *et al.*, 2004; Lee, Bae *et al.*, 2004). Une fois stabilisé, le HIF1A peut transloquer vers le noyau grâce aux deux sites NLS. Ce transport est énergie-dépendant (Distler, Wenger *et al.*, 2004). En aussi peu que 2 minutes en condition hypoxique, le HIF1A s'accumule au noyau et l'augmentation est rapide durant les 30 premières minutes, puis plus graduelle jusqu'au maximum 60 minutes (Jewell, Kvietikova *et al.*, 2001). Une fois au noyau, HIF1A dimérise avec ARNT et le dimère lie l'ADN au site de liaison de HIF1 (HBS) (5' RCGTG 3') de l'élément de réponse à l'hypoxie (Distler, Wenger *et al.*, 2004). Cette liaison avec l'ADN permet la transcription de plusieurs gènes qui sont impliqués dans l'homéostasie de l'oxygène. Par ailleurs, le NO a aussi la capacité de stabiliser

le HIF1A en condition normoxique en bloquant l'activité des PHD et en atténuant l'hydroxylation de HIF1A (Palmer *et al.*, 2000; Brune et Zhou, 2007). À l'inverse, en condition hypoxique, le NO inhibe l'accumulation de HIF1A (Brune et Zhou, 2007).

1.4.2.2.2 La régulation oxygène-indépendante

Pour la régulation du HIF oxygène-indépendante, ce sont principalement des cytokines et des facteurs de croissance qui stabilisent le HIF1A via un récepteur tyrosine kinase (Distler, Wenger *et al.*, 2004) (Figure 15). Parmi les ligands qui activent HIF1A se trouvent: interleukine-1 β , TNF- α , TGF- β , PDGF, FGF2 et facteur de croissance insulino-like (IGF). La régulation de HIF1A oxygène-indépendante permet l'accumulation de HIF1A en augmentant sa traduction plutôt qu'en diminuant sa dégradation par le protéasome (Distler, Wenger *et al.*, 2004; Lee, Bae *et al.*, 2004). Cette activation sera d'une intensité moindre que l'induction via la diminution de la concentration en oxygène. La liaison ligand-récepteur tyrosine kinase active deux cascades: la cascade phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et la cascade mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Lee, Bae *et al.*, 2004) (Figure 15). La voie PI3K active Akt avant d'augmenter la synthèse de HIF1A. Concernant la cascade MAPK, le récepteur tyrosine kinase active Ras qui va activer MAPK et puis MAP/ERK kinase, favorisant la synthèse de HIF1A. Par ailleurs, la cascade MAPK augmente également l'activité transcriptionnelle de HIF1 en favorisant la phosphorylation de p300 par ERK (Lee, Bae *et al.*, 2004).

1.4.2.2.3 Expression constitutive de la protéine HIF1A

En condition physiologique, certains types cellulaires expriment constitutivement le HIF1A. Les kératinocytes de la peau (Cho *et al.*, 2008) et les cellules de Leydig dans les testicules (Lysiak *et al.*, 2009) en sont deux

exemples. Dans le cas des cellules de Leydig, le HIF1A joue un rôle dans l'homéostasie testiculaire. Chez la souris, il a été démontré que HIF1A régule la 3 β -hydroxystéroïde déhydrogénase de type 1 qui est une enzyme clé dans la production de testostérone (Lysiak, Kirby *et al.*, 2009). L'expression constitutive du HIF1A dans les kératinocytes a pour rôle de contrôler l'homéostasie de l'épithélium. HIF1A, dans ce type cellulaire, a la possibilité d'arrêter le cycle cellulaire augmentant l'expression de CDKN1A. Son expression est dépendante de la densité cellulaire. Une croissance de l'épithélium augmente la production de ROS mitochondrial, ce qui a pour effet d'activer la cascade de signalisation MEK/ERK qui permet la stabilisation du HIF1A (Cho, Bae *et al.*, 2008) (Figure 13 et 15).

1.4.2.3 Le rôle de la protéine HIF-1

Le rôle majeur de HIF-1 est de réguler la transcription des gènes impliqués dans l'homéostasie de l'oxygène et dans la réponse adaptative à l'hypoxie (Greijer *et al.*, 2005). En condition hypoxique, HIF-1 va activer la transcription de plus de 60 gènes ayant des rôles dans l'angiogenèse, la prolifération et la survie cellulaire, le métabolisme du glucose et du fer (Figure 18) (Semenza, 2003; Lee, Bae *et al.*, 2004). HIF-1 a un rôle primordial dans la vascularisation embryonnaire, l'angiogenèse tumorale et les pathophysiologies ischémiques (Dehne et Brune, 2009). La réponse au stress hypoxique des cellules de mammifères implique la réduction de la prolifération cellulaire par l'arrêt du cycle cellulaire (Kenneth et Rocha, 2008). Ce rôle est indépendant de la liaison à l'ADN, il vient plutôt de la compétition entre c-Myc et HIF1A sur le promoteur de l'inhibiteur de la kinase cycline-dépendant p21 (Koshiji *et al.*, 2004; Kenneth et Rocha, 2008).

Fonction	Gènes
Prolifération cellulaire	Cycline G2, IGF2, IGF-BP1, IGF-BP2, IGF-BP3, WAF-1, TGF- α , TGF- β 3
Survie cellulaire	ADM, EPO, IGF2, IGF-BP1, IGF-BP2, IGF-BP3, NOS1, TGF- α , VEGF
Apoptose	NIP3, NIX
Migration	AMF, c-MET, LRP1, TGF- α
Adhésion cellulaire	MIC2
Érythropoïèse	Érythropoïétine
Angiogénèse	EG-VEGF, ENG, LEP, LRP1, TGF- β 3, VEGF
Tonus vasculaire	Récepteur α 1B-adrénérique, ADM, Hème oxygénase-1, NOS1
Régulation du pH	Anhydrase carbonique 9
Régulation de l'activité de HIF1	P35srj
Résistance au drogue	MDR1
Métabolisme du glucose	HK1, HK2, AMF, ENO1, GLUT1, GAPDH, LDHA, PFKFB3, PFKL, PGK1, PKM, Aldolase A, Aldolase C
Métabolisme de la matrice extracellulaire	Cathepsine D, Collagène type V (α 1), Fibronectine 1, MMP2, PAI1, PHD4
Métabolisme de l'énergie	Leptine

ADM, adrénomédulline; AMF, Facteur autocrine de migration; EG-VEGF, VEGF dérivé de la glande endocrine; ENG, endogline; ET1, endothéline-1; ENO1, émolase 1; GLUT, transporteur du glucose; GAPDH, glyceraldéhyde-3-P-déhydrogénase; HK, hexokinase; IGF2, facteur de croissance similaire à l'insuline 2; IGF-BP, facteur liant la protéine IGF; LDHA, lactate déhydrogénase A; LRP1, protéine associée au récepteur-LDL; MMP2, métalloprotéinase matricielle 2; NOS1, monoxyde d'azote synthase inductible; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-3; PFKL, phosphofructokinase L; PGK 1, phosphoglycérate kinase 1; PAI1, inhibiteur de l'activateur du plasminogène; PKM, pyruvate kinase M; TGF, facteur de croissance transformant; VEGF, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire;

Figure 18: Fonctions de HIF-1

Aperçu de quelques gènes sous la régulation de HIF-1, conférant à la protéine un champ d'action très large et un rôle primordial dans l'adaptation à l'hypoxie.

Figure adaptée de : Lee, Bae *et al.*, 2004

HIF1 joue un rôle important dans l'angiogénèse. Le VEGF, cible majeure du HIF1, permet spécifiquement le recrutement des cellules endothéliales en condition hypoxique ou dans des régions non vascularisées (telle une plaie) et stimule leur prolifération (Lee, Bae *et al.*, 2004). Le VEGF est connu en tant que facteur capital dans l'angiogénèse. Le flux sanguin local est également contrôlé par le tonus vasculaire. Le tonus vasculaire est en partie régulé par le NO, l'endothéline 1 et l'activité des récepteurs α 1B-adrénériques, chacun d'eux nécessitant des gènes cibles de HIF-1 (Lee, Bae *et al.*, 2004) (Figure 18).

Les facteurs de croissance induits par l'hypoxie favorisent la prolifération et la survie cellulaires. Des facteurs, tels qu'IGF2 ou TGF- α sont des gènes cibles de HIF1 et favorisent la prolifération lorsqu'ils lient leur récepteur respectif. De plus, certains types cellulaires, en condition hypoxique, vont

augmenter l'activité de PI3K qui est impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire et la suppression de l'apoptose (Chen *et al.*, 2001). Selon le niveau d'oxygène, HIF1A va, en hypoxie, lier ARNT pour promouvoir la survie cellulaire et contrer l'apoptose, par contre à des niveaux d'anoxie (hypoxie très élevée), HIF1A va lier directement p53 et favoriser l'apoptose cellulaire (Piret *et al.*, 2002). De plus, en condition hypoxique, les cellules doivent produire leur ATP de façon oxygène-indépendante, donc elles utilisent la glycolyse. Un grand nombre de gènes impliqués dans l'absorption du glucose et la glycolyse sont des cibles de HIF-1 (Wenger, 2002). HIF-1 régule l'expression de toutes les enzymes impliquées dans la cascade de glycolyse ainsi que l'expression des transporteurs de glucose (GLUT1 ou SLC2A1 et GLUT3 ou SLC2A3) (Lee, Bae *et al.*, 2004). Par ailleurs, la prolifération et la migration cellulaires utilisent la cascade de la glycolyse comme source d'énergie.

Un certain nombre de cellules expriment, en condition normoxique, la protéine HIF1A sans qu'elle soit dégradée. Dans ces cellules, HIF1A est considéré comme étant constitutif. Il est démontré par plusieurs équipes que les kératinocytes expriment le HIF1A de façon constitutive (Cho *et al.*, 2008; Peyssonnaud *et al.*, 2008). Selon l'équipe de Cho, HIF1A participe au développement et à l'homéostasie de la peau en contrôlant la prolifération des kératinocytes via l'expression de la «Cyclin-dépendent kinase inhibitor 1» (CDKN1A) (Cho, Bae *et al.*, 2008).

HIF-1 a un large spectre d'action puisqu'il régule la transcription d'un grand nombre de gènes. HIF1A est surexprimé dans plusieurs types de cancers chez l'Homme (Zhong *et al.*, 1999; Pouyssegur, Dayan *et al.*, 2006). Il est également exprimé en condition inflammatoire (Dehne et Brune, 2009). Sa présence a notamment été corrélée avec la guérison tissulaire (Elson *et al.*, 2000; Mace, Yu *et al.*, 2007). De plus, il est rapporté que HIF1A est augmenté dans les tissus pathologiques provenant de chéloïde (Zhang *et al.*, 2003). En

fait, HIF1A est impliqué dans la guérison tissulaire et sa régulation est importante au bon déroulement de chacune des trois phases.

1.4.3 Expériences *in vivo* impliquant l'hypoxie dans la guérison

cutanée

L'oxygène est utilisé à plusieurs fins durant le processus de guérison: pour le diagnostic, la prévention et la thérapie (Gordillo et Sen, 2003). La cause la plus commune de plaies chroniques est la présence prolongée d'hypoxie au site de la plaie (Mathieu et Mani, 2007). Plusieurs techniques pour rétablir l'oxygénation des plaies ont été développées, telles que les chambres hyperbares (hyperbaric oxygen therapy - HBOT), l'application topique d'oxygène ou l'utilisation d'inhibiteurs des PHD pour permettre la stabilisation de HIF1A (Gordillo et Sen, 2003; Rodriguez, Felix *et al.*, 2008; Thackham, McElwain *et al.*, 2008; Sen, 2009; Schreml, Szeimies *et al.*, 2010). Peu importe la méthode employée pour rétablir l'oxygénation d'une plaie, il est crucial de reconnaître que pas assez est aussi néfaste à la guérison que trop d'oxygène et que le besoin en oxygène varie d'une phase à l'autre du processus (Sen, 2009).

Quelques études clés ont permis de lier l'expression du HIF1A à certaines pathologies de la guérison. L'étude d'Albina *et al.* utilisant l'implantation sous-cutanée d'une éponge de polyvinyl alcool sur des rats, a démontré que l'expression maximale en ARNm de *HIF1A* a lieu à 24h, au moment où plus de 90% des cellules présentes sont des neutrophiles (Albina *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'équipe d'Elson a démontré, à partir d'une incision cutanée pleine épaisseur de 8 mm sur des souris, que *HIF1A* et *SLC2A1* sont faiblement détectés dans les kératinocytes de la membrane basale en bord de plaie, le premier jour suivant le traumatisme. Les deux gènes atteignent un niveau maximal d'expression au cours de l'épithélialisation (jour 5) qui diminue à des niveaux indétectables suivant l'épithélialisation complète de la plaie (jour

11). L'expression du gène *HIF1A* n'est jamais détectée dans le derme (Elson, Ryan *et al.*, 2000). Une autre étude très importante est celle de Mace *et al.* Leur modèle consiste en une plaie pleine épaisseur de la peau dorsale, de 2 cm de diamètre, réalisée sur des souris *Lepr^{db/-}* diabétiques. À l'aide de ce modèle de plaie chronique, il est démontré que la protéine HIF1A subit une diminution importante de son expression dans les plaies chroniques par rapport aux plaies normales de souris contrôles, non-diabétiques. Une expression soutenue de HIF1A dans les plaies chroniques des souris diabétiques favorise l'angiogenèse en plus d'accélérer la fermeture des plaies (Mace, Yu *et al.*, 2007). Inversement, il a été démontré que les tissus provenant de chéloïde ont une expression en HIF1A supérieure aux tissus avoisinants normaux chez l'Homme (Zhang, Wu *et al.*, 2003). Ces études *in vivo* permettent d'établir une corrélation entre l'expression de HIF1 et certaines pathologies de la guérison cutanée. Les études *in vitro* vont permettre, pour leur part, de comprendre l'impact de l'hypoxie sur un type cellulaire isolé.

1.4.4 Expériences *in vitro* montrant l'interaction entre les fibroblastes dermiques et l'hypoxie

Une cellule possède la capacité de modifier son point de normoxie. En effet, une cellule cultivée à 20% O₂ qui est ensuite cultivée à 5% O₂ exprimera le HIF1A. Par contre, si cette même cellule est laissée à 5% O₂ sur une longue période (jusqu'à 4 semaines), sa machinerie va ajuster son point de normoxie à 5% O₂ et le HIF1A ne sera plus stabilisé (Khanna *et al.*, 2006). Le chlorure de cobalt (CoCl₂) est parfois utilisé en culture cellulaire en tant que mimétique de l'hypoxie. En fait, le CoCl₂ permet la stabilisation de HIF1A, car l'ion de cobalt va substituer l'ion de fer dans le site catalytique des PHD et ainsi inhiber leur action (Weidemann et Johnson, 2008) (Figure 17). Sans l'activité des PHD, le HIF1A est stabilisé comme en hypoxie.

Plusieurs études démontrent le rôle de l'oxygène sur différentes caractéristiques des fibroblastes. L'hypoxie aiguë et l'hypoxie chronique n'exercent pas le même impact sur les cellules en culture. *In vitro*, il a été démontré que l'hypoxie aiguë stimule la prolifération des fibroblastes dermiques humains, ainsi que leur synthèse collagénique. Or, l'hypoxie chronique (six passages à 1% O₂ ou ~5mm Hg) cause une diminution de l'activité proliférative des cellules et de la synthèse du collagène (Siddiqui, Galiano *et al.*, 1996). Oberringer rapporte une diminution de la prolifération cellulaire et de la capacité de migration des fibroblastes dermiques humains cultivés 24h en condition hypoxique (moins de 5 mm Hg en O₂) (Oberringer *et al.*, 2007; Oberringer *et al.*, 2008). Inversement, d'autres équipes ont trouvé que l'hypoxie (1% O₂ pour ~24h) accélère la migration des fibroblastes dermiques humains via HIF1A (Mogford *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007b). La production d'ATP est significativement augmentée par les fibroblastes issus de chéloïde exposés à des conditions hypoxiques que ce soit physique (0,5% O₂ pour 16h) ou chimique (desferrioxamine ou CoCl₂ pour 24h) (Vincent *et al.*, 2008). Une étude durant laquelle des fibroblastes dermiques humains ont été exposés à l'hypoxie chronique (24h à 2% O₂ ou ~14 mm Hg) n'a montré aucune différence significative de la prolifération par rapport aux fibroblastes cultivés en normoxie (Boraldi *et al.*, 2007). Des analyses protéomiques ont cependant démontré que l'expression de 56 protéines était modifiée. Les études de Distler démontrent que des fibroblastes dermiques humains exposés à l'hypoxie (1% O₂ pour 24h) augmentent leur expression de gènes impliqués dans la production de matrice extracellulaire, telles que le collagène et la fibronectine 1 (Distler *et al.*, 2007). Certaines de ces études dévoilent que l'hypoxie déclenche l'acquisition d'un phénotype pro-fibrotique par le fibroblaste.

2 PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Le TGE, fréquemment présent chez le cheval suivant une complication de la guérison d'une plaie cutanée au niveau du membre, est un phénomène clinique important. Cette pathologie exerce un impact significatif sur l'industrie équine, étant donné que les chevaux atteints sont retirés de leur discipline. Le TGE, observé uniquement chez le cheval, ressemble toutefois à certaines pathologies de la guérison cutanée affligant l'Homme. Le TGE, tout comme la chéloïde, est une fibrose excessive en réponse à un trauma. Toutefois, contrairement à la chéloïde de l'Homme, le TGE n'est pas épithélialisé, ce qui le rapproche des plaies chroniques observées chez l'Homme. Le processus de guérison cutanée est oxygène-dépendant, et autant la présence de l'oxygène que son absence exercent des influences spécifiques sur chacune des phases de la guérison. Plusieurs études ont établi des liens entre l'hypoxie et/ou HIF1A, le facteur de transcription majeur dans l'adaptation à l'oxygène, et les différentes pathologies de la guérison.

L'hypothèse globale du projet de recherche est que les complications de la guérison de plaie au membre du cheval sont associées à la présence d'une hypoxie locale prolongée. Les résultats d'une étude antérieure réalisée au Laboratoire de guérison tissulaire sous-tendent cette hypothèse. Il a été démontré que les microvaisseaux peuplant le tissu de granulation au niveau des plaies appendiculaires sont souvent occlus (Lepault, Céleste *et al.*, 2005). En parallèle, les chercheurs du laboratoire ont montré que l'oxygénation des plaies appendiculaires est moindre que celle des plaies corporelles durant les phases aiguës de la guérison (Céleste, Deschene *et al.*, 2011).

L'objectif de la présente étude est de vérifier la présence d'hypoxie locale à l'aide de biologie moléculaire et d'en préciser la contribution à la guérison rencontrée chez le cheval. Dans un premier temps, le HIF1A, facteur régulant

l'homéostasie de l'oxygène et l'adaptation cellulaire à l'hypoxie, sera mesuré. Des outils de biologie moléculaire permettront de vérifier les différences d'expression de ce « marqueur d'hypoxie », mais également des gènes sous sa régulation, dans le but d'établir le patron d'adaptation à l'hypoxie des tissus/types cellulaires localisés en bordure de plaie. Puisque le HIF1A est surexprimé dans la pathologie fibroproliférative qu'est la chéloïde (Zhang, Wu *et al.*, 2003), une augmentation de HIF1A ainsi que de certains gènes régulés par ce dernier est présagée au niveau des plaies appendiculaires prédisposées au développement du TGE. Dans un deuxième temps, une étude *in vitro* visera à définir les caractéristiques intrinsèques des FDE selon leur provenance anatomique et leur adaptation à des conditions hypoxiques. Il est attendu que l'hypoxie accélérera la prolifération cellulaire, favorisera la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire au profit de leur dégradation et diminuera l'apoptose cellulaire. De plus, il est anticipé que ces changements seront davantage importants lorsque les FDE proviennent du membre (Figure 19).

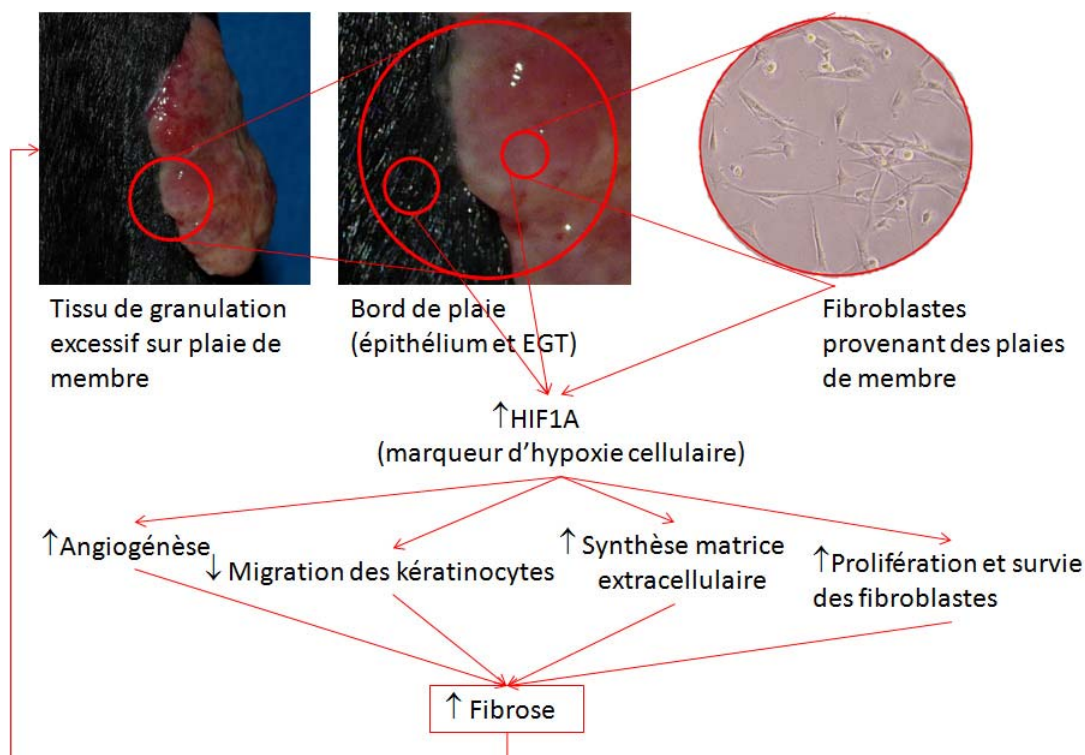


Figure 19: Hypothèses du projet

L'hypothèse est que les chevaux développent du TGE sur les plaies appendiculaires en réponse à une hypoxie locale prolongée qui pourra être confirmée par l'augmentation de l'expression du HIF1A dans ses plaies. Le HIF1A va réguler à la hausse l'angiogenèse, la production d'énergie via le métabolisme du glucose, la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire, ainsi que la prolifération et la survie cellulaires. Ces changements ayant été, auparavant, identifiés comme étant des facteurs profibrotiques.

Par conséquent, les objectifs précis sont :

- 1- À partir d'échantillons tissulaires prélevés en bordure de plaie, de mesurer et de localiser l'expression protéique de HIF1A. Vérifier l'expression de certains gènes, sous sa régulation, ayant un impact sur la fibrose et l'épithélialisation, tels que VEGF, SLC2A1 et CDKN1A. Pour ce faire, l'immunobuvardage de type western, le qRT-PCR et l'immunofluorescence seront réalisés.

- 2- *In vitro*, d'évaluer si les fibroblastes appendiculaires présentent des différences intrinsèques avec les fibroblastes tronculaires. Les paramètres suivants seront investigués; prolifération et mortalité et synthèse protéique (collagène 1, MMP 2, VEGF, caspase-3 clivée). Pour ce faire, le comptage au bleu de Trypan, l'incorporation du BrdU par colorimétrie et l'immunobuvardage de type western seront utilisés.

- 3- *In vitro*, d'observer les comportements des FDE de différentes provenances anatomiques lorsque cultivés en hypoxie (1% O₂) ou en présence d'un mimétique d'hypoxie (CoCl₂) dans le but de déterminer s'il existe une différence dans la réponse adaptative à l'hypoxie entre les FDE appendiculaires et les FDE tronculaires. De plus, le mimétique de l'hypoxie permet d'observer si les changements d'expression sont HIF1A-dépendants ou non. Pour ce faire, les mêmes expériences qu'au point 2 seront réalisées suite à une exposition des cellules à l'hypoxie.

3 RÉSULTATS

3.1 Article 1 : Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1 α in keratinocytes during the repair of skin wounds in horses

Karine Deschene, MSc; Christophe Céleste, DMV, MSc; Derek Boerboom, DMV, PhD; Christine L Theoret, DMV, PhD

Université de Montréal, Département de biomédecine vétérinaire

Statue de l'article :

Publié (2011). Wound Repair Regen **19** (2) : 250-9

Participation à l'article :

Les résultats présentés dans cet article ont été obtenus dans la totalité par des expériences que j'ai réalisées, à l'exception de l'immunofluorescence sur coupe de HIF1A. J'ai réalisé l'analyse et l'interprétation de l'ensemble des résultats. J'ai également rédigé et soumis cet article.

Constitutive expression of HIF1A in keratinocytes during the repair of skin wounds in horses

Karine Deschene, MSc; Christophe Céleste, DMV, MSc; Derek Boerboom, DMV, PhD; Christine L Theoret, DMV, PhD

Université de Montréal, Département de biomédecine vétérinaire

Short running title : HIF1A in horse skin repair

Key words : Wound healing; Hypoxia; HIF1A; Keratinocyte; Horse

Abstract

As a transient hypoxic state exists within skin wounds in horses and may be important for the healing process, this study sought to identify a molecular hypoxia response occurring in horse limb and body wounds healing by second intention. Hypoxia-Inducible Factor 1a (HIF1A) protein expression was studied throughout repair by western blotting and immunofluorescence. Paradoxically, HIF1A was strongly expressed in intact skin and its expression decreased dramatically following wounding ($P<0.01$), despite the expected hypoxic state within the wounded tissue. HIF1A levels re-increased in parallel with the epithelialization process, and more rapidly in body wounds than in limb wounds ($P<0.01$). HIF1A localized predominantly to the keratinocyte layer, in which it was constitutively expressed throughout healing. The HIF1A target gene *CDKN1A* showed a pattern of expression similar to HIF1A throughout the healing process and also localized to the keratinocyte layer, suggesting that HIF1A may regulate its constitutive expression. The HIF1A target genes *VEGFA* and *SLC2A1* however did not have a pattern of expression similar to HIF1A, at the mRNA level. We conclude that HIF1A is expressed in a continuous and hypoxia-independent manner in equine keratinocytes in both intact and wounded skin, and may regulate the expression of *CDKN1A* in this cell type.

Introduction

The main role of skin is to act as a protective barrier. This function is lost in the face of trauma, which rapidly triggers a number of remedial processes leading to repair. A dynamic process, wound healing is classically divided into four well-regulated overlapping phases including hemostasis, inflammation, proliferation and remodeling (1). Horses often suffer traumatic skin wounds that must close by second intention (2). In this species, complications such as wound infection, formation of exuberant granulation tissue (EGT) and hypertrophic scarring are frequent (2). The anatomic location of a wound has an important influence on the outcome such that limb wounds in horses are more frequently afflicted than body wounds by complications, especially the fibroproliferative disorder referred to as EGT. Specifically, Wilmink and collaborators demonstrated that the inflammatory phase of healing in limb wounds is of lesser intensity but prolonged in comparison to body wounds, while the proliferative phase also persists in limb wounds. Moreover, wound contraction is weaker in limb than in body wounds, retarding healing by second intention (2). While loss of conformation is detrimental to show horses, the impact on racehorses is also significant in that roughly 7% of injuries leading to retirement are the direct result of a wound (3), which exerts a significant burden on the equine industry.

Following injury, the microenvironment of a skin wound is hypoxic, likely due to vascular disruption and high oxygen consumption by cells at the wound edge and in the new granulation tissue (4-8). Superoxide generation by leukocytes, essential for bacterial killing, is critically dependent on oxygen (9), as is collagen synthesis by wound fibroblasts. While acute temporary hypoxia following injury enhances early wound healing via the production of proangiogenic mediators to stimulate wound revascularization, oxygen is rapidly needed to sustain the repair process. If normal oxygen tensions are not quickly restored, healing is impaired (10). Moreover, hypoxia has been proposed as a mechanism contributing to fibroproliferative scarring. In human fibroblasts, hypoxia increases cell proliferation by 71% (9), induces a 9-fold

increase in the synthesis of fibroproliferative transforming growth factor (TGF)- β 1 (11) and is a powerful stimulus to the synthesis and transcription of the procollagen gene (*COL1A1*) (12), due to activation by TGF- β 1 (13). Furthermore, TGF- β and hypoxia synergistically induce the expression of Vascular Endothelial Growth Factor (*VEGF*) mRNA (14) which correlates with the density of granulation tissue.

Occlusion of microvessels (15) as well as increased mRNA and protein levels of Hypoxia Inducible Factor 1 α (HIF1A) were documented in keloid tissue in man (16-18). Microvascular occlusion has similarly been documented by transmission electron microscopy in horse limb wounds which develop EGT (19) and a recent study reports a relative decrease in oxygen saturation of wound tissues in this location during the acute phase of repair (20). These data suggest the contribution of local hypoxia to the pathogenesis of equine EGT, which resembles the human keloid.

The genetic response to hypoxia is via HIF1, a dimer composed of HIF1A and ARNT subunits, which when translocated to the nucleus activates hypoxia-regulated genes (21). Genes targeted by HIF1 mediate adaptive responses to hypoxia such as angiogenesis and cell proliferation/survival. To maintain oxygen homeostasis HIF1 induces the transcription of more than 60 proteins, including VEGF and solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 1 (*SLC2A1*) (22). *VEGF* is a major target gene and, during the proliferative phase of healing, is an important protein stimulating angiogenesis within the granulation tissue. In hypoxic conditions, cells use glycolysis as an energy source and *SLC2A1* is important in cellular glucose uptake (22). Up-regulation of HIF1A occurs in adult wound repair but not fetal wound regeneration, suggesting HIF1A as a pathway in the pathogenesis of scarring (23). On the other hand, HIF1A is also an upstream factor that induces transcription of cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (*CDKN1A*), also named p21^{WAF1/CIP1} (24). Even in the absence of a hypoxic signal, HIF1A induces cell cycle arrest by antagonizing Myc activity, resulting in derepression

of CDKN1A (25). CDKN1A expression is induced at the onset of keratinocyte growth arrest and differentiation (26).

Given that a transient hypoxic state seems to exist within wounds and may be important to the healing process in horses, we sought to uncover evidence for a hypoxia response occurring at the molecular level in wounded skin during uncomplicated healing. We hypothesized that the expression of HIF1A and its transcriptional target genes *VEGFA* and *SLC2A1* would increase transiently, permitting the initiation of cellular and molecular processes crucial to the inflammatory and proliferative phases of repair. We further postulated that the greater relative hypoxic state of limb wounds would result in a more pronounced molecular hypoxia response relative to body wounds. HIF1A may also be expressed in keratinocytes during epithelialization and up-regulate CDKN1A to promote cell cycle arrest and differentiation. The ultimate objective of our research program is to contribute to a better understanding of the repair process and permit the development of novel targeted strategies to resolve wound healing complications in horses and other mammals.

Materials and methods

Animals:

Six healthy, 4- to 6-year-old Standardbred mares were used for the experiment, which complied with the Université de Montréal's guidelines and was sanctioned by the Canadian Council on Animal Care. Prior to entry into the study, horses were vaccinated against tetanus. Horses were kept 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.

Wound model:

As described elsewhere (19), horses were sedated with detomidine hydrochloride (0.01 mg/kg; iv) and butorphanol tartrate (0.04 mg/kg; iv) and hair was clipped from one metacarpal area and one hemi-thorax in each animal; right/left side was chosen randomly. Local anesthesia was performed using 2.5 ml of 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 metacarpal area 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 tended to bleed profusely immediately after surgery, were bandaged postoperatively for a 24-hour period to control hemorrhage and were then 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. Excised skin was kept as a time 0 sample (intact skin). 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. Healing was monitored until complete resurfacing of the wound was achieved.

Tissue collection:

Two, full-thickness wound margin samples were retrieved with an 8 mm diameter biopsy punch at 12, 24 and 48 hours and 1, 2 and 4 weeks postoperatively. The first three biopsy times corresponded to the early phase of wound healing when the inflammatory response predominates, while the last three reflected the late phase when proliferative processes such as angiogenesis, epithelialization and fibroplasia take place. To avoid repeat trauma, each wound, beginning with the most distal, was designated for only an early and a late biopsy. Each sample included a 3- to 4-mm strip of peripheral intact skin, the migrating or neoeepithelium, and a 3- to 4-mm strip of granulation tissue when present. Samples were halved at right angles to the junction between the wound and the intact skin border. At each time point, one sample (protein extract) and a half sample (RNA extract) were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until protein and RNA extraction. The other half sample was preserved in Tissue-Tek[®] O.C.T. compound (Sakura Finetek, California, USA, Inc. Torance, USA) and stored at -80°C for later immunofluorescence studies.

Protein extraction and Western Blot:

Intact skin and wound margin samples were homogenized in T-PER[®] Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) that was supplemented with Complete (Roche Applied Science, Québec, Canada), a protease inhibitor cocktail. Samples were homogenized on ice with a polytron homogenizer (model #PT1300D, Kinematica AG, Littau-Lucerne Switzerland) then centrifuged at 600 g for 10 min at 4°C . The protein concentration of the supernatant containing whole cell extract was measured with Coomassie Plus (Bradford) Assay Reagent (Pierce). Protein extracts were stored at -80°C until

electrophoretic analysis. For HIF1A Western blotting, 200 µg protein samples were separated by 7,5% acrylamide SDS-PAGE, while for CDKN1A protein, 100 µg protein samples were separated on a 15% acrylamide gel, then transferred to PVDF membranes (Hybond-P) (GE Healthcare, Baie d'Urfe, QC, Canada). Membranes were blocked in 5% milk for 1h at room temperature then incubated with mouse anti-human HIF1A monoclonal antibody (sc-53546; dilution 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or CDKN1A monoclonal antibody (NB500-303; dilution 1:1000; Novus Biologicals, Colorado, USA) for 2 hours at room temperature. Secondary antibody (rabbit anti-mouse antibody NA931VS, dilution 1:10,000; GE Amersham, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) was applied for 1 hour at room temperature. Detection of immunoreactive proteins was performed with ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit for HIF1A or ECL™ Plus Western Blotting Detection Kit for CDKN1A (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). β-actin (ACTB) (sc-47778; dilution 1:500 000; Santa Cruz Biotechnology) was used as a loading control. Autoradiographic images were digitized and densitometric measures were obtained using Kodak 1D version 3.6 software.

Immunofluorescence:

Cryosections (5 µm) of intact skin and of wound samples were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min 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 endoperoxidase. For CDKN1A immunofluorescence, the TSA™ kit #2 with HRP-goat anti-mouse IgG and Alexa Fluor® 488 tyramide (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) was used according to the company's protocol. Tissues were blocked with 1% blocking solution (included in TSA™ kit #2) in PBS. They were then incubated with the primary antibodies diluted in blocking solution for 2 hours at room temperature (HIF1A: sc-10790, dilution 1:50; CDKN1A: NB500-303, dilution 1:50; ki67: ab15580, dilution 1:50). Subsequently, sections were washed with PBS and

incubated with Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (ki67 and HIF1A) and/or Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (CDKN1A) (dilution 1:250; Invitrogen) for 1 hour at room temperature. The nuclei were counterstained with Vectashield containing DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA).

RNA extraction, reverse transcription and qRT-PCR:

Total RNA extraction from 30 mg of tissue was done using Qiagen RNeasy[®] Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). RNA concentration was measured with a ND-1000 NanoDrop spectrophotometer, then kept at -80°C until use. Reverse transcription (400U M-MLV reverse transcriptase, Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) was performed on 2 µg of total RNA in a final volume of 25 µl using an Oligo(dT)15 primer and RNasin 2500 (Promega). For qRT-PCR, the 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) was used with SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Gene-specific PCR primers were designed from equine cDNA sequences available on GenBank using Primer Express Software (Applied Biosystems), sequences for *VEGFA* were (sense: 5'-CAA CGA CGA GGG CCT AGA GT-3'; anti-sense: 5'-CAT CTC TCC TAT GTG TGG CTT TG-3'). *GAPDH* (sense: 5'-GGC AAG TTC CAT GGC ACA GT-3'; anti-sense: 5'-CAC AAC ATA TTC AGC ACC AGC AT-3') was used as a housekeeping gene (27). *VEGFA* amplicons were 100 base pairs (bp) in length whereas those for *GAPDH* contained 129bp. PCR was performed on 1.5 µl cDNA in 25 µl reaction volume in duplicate. qRT-PCR annealing temperature was 58°C. PCR amplification efficiencies were similar for all genes. Negative controls (water replacing cDNA) were included in each run. The relative expression of target gene was calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method with efficiency correction (28); the control was a cDNA sample derived from equine scrotal skin.

Statistical analysis

A repeated-measures linear model, with site (body versus limb) and biopsy time as within-subject factors, was used to determine the effects of site and time on protein or gene expression. *A priori* contrasts, with comparison-wise alpha levels adjusted with the Bonferroni sequential correction (29) to maintain the family-wise error rate at the desired alpha level, were then used to compare pre-selected individual means. All analyses were carried out with a family-wise error rate of 0.05, using SAS v.9.2. (Cary, N.C.). To be significant, a result needed to be below the post-correction threshold while a tendency was defined as a *p* value between 0.05 and the post-correction threshold.

Results

HIF1A protein temporal expression pattern during wound repair in the horse

HIF1A protein was strongly expressed in unwounded (time 0) horse skin at both anatomic locations. The RM linear model confirmed a significant effect of time, across sites ($P < 0.0001$) and a near significant effect of site across time ($P = 0.0260$) on the expression of HIF1A protein (Figure 1). Expression was maximal in intact skin at which time it did not differ significantly between anatomic locations. Wounding induced a rapid (12h) and drastic drop (90-100%) of HIF1A protein expression, which persisted during the early period of healing. HIF1A expression was reduced until week 2 at which time concentrations in limb wound samples were 10% and those of body wound samples were 32% of intact skin concentrations. Thereafter, expression increased in both anatomical locations such that at four weeks it had reached 37% and 62% of baseline in limb and body wound samples, respectively. The effect of site varied from one time to another. Globally, HIF1A protein expression was superior in body wound margins; this difference was statistically significant at four weeks of repair ($P = 0.0058$) and showed a tendency towards significance at two weeks ($P = 0.0433$; non-significant after correction). When compared to protein concentrations measured in the acute wound (12h), intact body skin and four week old body wounds showed significantly superior expression of HIF1A protein, while in the limb, this difference was significant only in intact skin, with a tendency towards increased levels in 4-week old wounds ($P = 0.0230$; non-significant after correction).

HIF1A protein spatial expression pattern in wound edges during repair in the horse

To study HIF1A protein localization, immunofluorescence was performed on mixed cell wound edge biopsies at various times during healing. In normal intact skin, a strong signal was detected in the keratinocytes of the epidermis

as well as in sweat glands, sebaceous glands and hair follicles (Figure 2A, B). Dermal fibroblasts were weakly stained while the extracellular matrix was devoid of signal. No qualitative differences in staining were detected between body and limb intact skin samples. During healing, differences in staining were apparent and depended upon the rate of epithelialization within wounds, which was speedier in those located on the body. Throughout healing, HIF1A protein was present in keratinocytes of the hyperplastic epithelium bordering the wound. The epithelial tongue, populated by keratinocytes migrating over the wound, also expressed HIF1A (Figure 2C, D). The granulation tissue had a diffuse signal and some endothelial cells were observed to be positively stained. In 4-week old wounds, HIF1A was expressed throughout the neoepidermis, while cutaneous appendages were predictably absent in the scar (Figure 2E, F). Higher magnification showed the signal to be mainly located in the cytoplasm of epithelial cells, while a weak nuclear expression was occasionally apparent (Figure 2B). Within the tip of the epithelial tongue migrating across 2-week old wounds, HIF1A was localized in the cytoplasm of all keratinocytes, but also in the nucleus of peripheral epithelial cells (Figure 2D).

CDKN1A protein spatio-temporal expression pattern during wound repair in the horse

CDKN1A protein, a HIF1A target and a cell cycle regulator that plays a central role in the control of keratinocyte growth and differentiation, was measured to determine whether its expression pattern correlated with that of HIF1A. As for HIF1A, CDKN1A protein was maximally expressed in intact skin of both anatomic locations. The RM linear model confirmed a significant effect of time, across sites ($P < 0.0001$). Wounding induced a rapid (12h) and significant drop of CDKN1A protein concentration in the early period of healing ($P < 0.0001$), followed by a gradual increase up to levels approaching 50% baseline during the late period of healing, in both locations (body: 49%; limb: 54% at four weeks) (Figure 3). When compared to 12h levels, CDKN1A

protein expression in 4-week old body wounds tended towards significance ($P = 0.0209$; non-significant after correction), as did expression in limb wounds ($P = 0.0097$; non-significant after correction). No significant differences in expression were observed between body and limb wounds at any time during healing.

Localization of CDKN1A protein expression was identified in intact skin by immunofluorescence. Its potential expression in proliferating cells was also studied by examining its co-localization with the proliferation marker ki67. CDKN1A was localized in keratinocytes of the epidermis, but not of epidermal appendages such as sebaceous glands and hair follicles (Figure 4A). At high magnification (Figure 4B) it was apparent that most cells expressing CDKN1A were not proliferating (absence of ki67), rather, they usually corresponded to differentiated epithelial cells populating the superficial layers of the epidermis. Ki67 expression was nuclear, whereas CDKN1A seemed to be mostly cytoplasmic and occasionally nuclear near the *stratum corneum* of the epidermis. CDKN1A expression was stronger in intact skin than in healing wounds where the signal was very weak and difficult to observe (not shown). The basal cells of hyperplastic epidermis bordering the wound and those located at the tip of the epithelial tongue and migrating over the wound strongly expressed ki67 (Figure 4C). Some cells in the wound granulation tissue expressed ki67; morphologically these resembled fibroblasts and endothelial cells (Figure 4D).

VEGFA mRNA temporal expression pattern during wound repair in the horse

Expression of *VEGFA*, a gene regulated by HIF1A and critical to oxygen homeostasis, was measured by qRT-PCR. *GAPDH*, whose expression in the study samples was stable in comparison with *ACTB* expression (data not shown), served as the housekeeping gene. A repeated measures linear model followed by Bonferroni correction of *a-priori* contrasts revealed no significant

difference in *VEGFA* mRNA expression between body and limb intact skin nor between wounds at either location, at any time during healing (Figure 5). mRNA expression of *SLC2A1*, another gene regulated by HIF1A in response to hypoxia, followed a similar temporal pattern (data not shown).

Discussion

This study sought to map the spatio-temporal pattern of the hypoxia response occurring at the molecular level throughout repair of wounds healing by second intention in different anatomic locations in horses, in an effort to elucidate some of the molecular mechanisms operating in limb wounds, predisposed to the development of EGT.

The transcription factor HIF1A is a key molecular regulator of cellular adaptation to hypoxia such that it has been used as a marker of hypoxia in a handful of skin wound healing studies (30-32). Using an *in vivo* wound model in mice, Elson *et al.* reported the absence of *HIF1A* mRNA in intact skin but detected, via *in situ* hybridization, a weak signal in basal epidermal keratinocytes at the wound edge 1 day after the creation of full-thickness back wounds. Levels were maximal in the sheet of keratinocytes migrating over the 5-day old wound then diminished to near undetectable levels following complete wound epithelialization. At no time during wound healing was *HIF1A* mRNA detected in the dermis, nor was there a signal in quiescent keratinocytes beyond 200-300 μm from the wound edge. As clearly established in the literature, the main regulation of HIF1A takes place at a posttranslational level by stabilization of the polypeptide. Thus, in the present study HIF1A protein concentrations were measured by Western blot. The results were unexpected and contrasted with the mRNA expression observed by Elson in that the temporal pattern at both anatomical locations began with a maximum concentration in intact skin followed by a rapid and drastic drop in HIF1A protein expression upon wounding and disruption of the vasculature (early period) with a final, gradual rise to near-baseline concentrations during the proliferative phase (epithelialization) of repair (Figure 1). The strong constitutive expression of HIF1A in epidermis of intact skin initially suggests hypoxia within the organ as previously reported in other species including mouse (33) and man (34). However, data obtained at subsequent time points is more difficult to reconcile with the literature and may reflect the time of

sampling. It is possible that strong HIF1A stabilization occurred in response to hypoxia in some cell types, such as inflammatory cells, in the minutes following wounding (30). Indeed, an inflammatory microenvironment is known to produce several molecules, such as TGF- β , ROS and NO, recognized to enhance HIF1A stabilization (35). Yet, HIF1A was at its lowest concentration at the 12h sampling time, in both anatomic locations, a fact which may simply reflect its very short half-life (36). The degradation of HIF1A involves many proteins such as von Hippel-Lindau protein and HIF1A-associated prolyl hydroxylase (EGLN1) (22-23). TGF- β inhibits EGLN1 thereby increasing HIF1A stabilization (37). Interestingly, elevated concentrations of TGF- β have been measured in limb wounds of horses during the proliferative phase of repair (38) yet, contrary to expectations, HIF1A levels were always inferior in biopsy samples from limb wounds in the current study.

Alternatively, and more likely, the nature of the biopsy samples might influence the temporal pattern of HIF1A protein expression throughout repair of skin wounds. Indeed, wound edges represent a mixed cellular population that varies as healing progresses. In intact skin, keratinocytes predominate in the epidermis while the number of fibroblasts reflects the depth of dermis included in the biopsy sample. During the early phase of healing, inflammatory cells prevail; during the later phase of healing, inflammatory cells wane while endothelial cells and fibroblasts are present and the number of keratinocytes rises once again as epithelialization proceeds (19). It appears that the expression of HIF1A in the present study correlated positively with the proportion of epidermal keratinocytes within the samples, thus with the extent of wound epithelialization. Therefore, the significantly greater HIF1A concentrations measured in 4-week old body wounds no doubt reflect the more rapid epithelialization occurring in this site as compared to equivalent limb wounds in horses (39). Immunofluorescence data support this postulate. HIF1A signal was detected in keratinocytes in all strata of the epidermis and in skin appendages of intact skin (Figure 2A and B), consistent with the

observations of others (24, 33). During wound healing, HIF1A was expressed in keratinocytes forming the migrating tongue and, ultimately, in those of the neoepidermis covering the wound bed (Figure 2C to F).

Using primary cell cultures of human skin keratinocytes as well as biopsy sections of human or rat skin, Cho *et al* showed that HIF1A protein expression is induced in a keratinocyte density-dependent manner (24). A clever study design enabled the investigators to confirm that cell density-dependent HIF1A expression is a unique feature of the epidermal keratinocyte, rather than a hypoxic event, and is attributable to stabilization at the protein level. It appears that the ROS-MEK/ERK pathway signals the constitutive expression of HIF1A in the epidermis (24). This might explain why the temporal pattern of HIF1A protein expression in the present study does not correlate with the presence of a relative state of hypoxia in limb wounds during the early period of repair in horses (20).

In normal skin, keratinocyte proliferation and differentiation are continuous throughout life. Keratinocytes are newly generated from stem cells in epidermal appendages and the basal layers of the epidermis, and undergo a sequential multi-step differentiation, including growth arrest. Cho *et al.* showed both *in vivo* and *in vitro* that HIF1A controls keratinocyte proliferation by up-regulating CDKN1A, a cyclin-dependent kinase inhibitor, causing cell cycle arrest (24). Therefore, HIF1A is involved in epidermal homeostasis. In the present study, CDKN1A protein was localized in epidermal keratinocytes in intact skin and followed a temporal pattern of expression similar to that of HIF1A protein (Figure 3, 4A and 4B). CDKN1A expression was maximal in intact skin, dropped in the early period of repair then became more abundant as wound healing progressed and the neoepidermis matured (Figure 3). Intracellular localization of the protein varied in intact skin, according to epidermal strata; nuclear staining was apparent in apical cells while staining of basal cells was mostly cytoplasmic. The CDKN1A protein is thought to play

different roles depending on its intracellular localization. Nuclear localization implies a role in cell cycle arrest, promotion of differentiation and instigation of cellular senescence whereas cytoplasmic localization is associated with vital pro-proliferative and survival roles (40). In intact skin, the apical cells belonging to the *stratum corneum* are approaching senescence whereas basal cells are actively proliferating to replace desquamated keratinocytes. As expected, cells immunopositive for CDKN1A protein did not simultaneously stain for ki67 protein, a marker of proliferation (Figure 4). Indeed, ki67-positive cells were those known to be actively proliferating in view of an imminent migratory activity at the wound edge: keratinocytes lining epidermal appendages and basal keratinocytes populating the hyperplastic epithelium at the wound edge (Figure 4C), as well as those within the migrating epithelial tongue (Figure 4D). It thus appears that HIF1A may drive the constitutive expression of CDKN1A in keratinocytes, but that other factors must intervene to govern its subcellular localization and therefore its effects on cell proliferation/survival.

Based on the original hypothesis that limb wounds in horses suffer more severe hypoxia than do equivalent body wounds, it was originally anticipated that reduced O₂ availability would elicit the physiological response of angiogenesis (4, 22) via the induction of *VEGFA* and *SLC2A1*, major downstream targets of HIF1A required to maintain oxygen homeostasis. Once more, the data were unexpected in that the expression of these genes did not change significantly upon wounding or during repair (Figure 5). This apparent lack of transcriptional activity has previously been observed by Cho *et al* for HIF1A expressed by keratinocytes in normoxia (24). It was suggested that in the absence of a hypoxic signal, the transcriptional activity of HIF1A in these cells may be repressed by factor-inhibiting HIF (FIH). Our data suggest that a similar mechanism could be operational in horse skin and that *VEGFA* and *SLC2A1* may not be major HIF1A transcriptional targets in equine keratinocytes.

In summary, the present study provides evidence that HIF1A is strongly expressed by keratinocytes in skin wounds of horses, independently of hypoxia. HIF1A is constitutively expressed in these cells and may be involved in epithelial homeostasis via the control of cellular proliferation by CDKN1A. Whether or not hypoxia / HIF1A signalling occurs and is important for the healing-related functions of other wound cells ultimately could not be determined by the experimental approach used herein. Indeed, the strong, constitutive expression of HIF1A observed in equine keratinocytes likely masked more subtle signalling events occurring in other cell types, particularly in quantitative analyses performed on full-thickness, wound-edge biopsies. Preliminary data from our laboratory show an increase in HIF1A and VEGFA protein concentrations in samples of pure granulation tissue obtained from the wound center compared with wound edge or intact skin samples containing a mixed population of cells. Further investigations should therefore be conducted on samples of pure granulation tissue obtained from the wound center, excluding the peripheral keratinocyte population, in an effort to determine whether the expression of HIF1A by wound fibroblasts reflects the predisposition of limb wounds to the development of EGT and excessive scarring. Moreover, cultures of dermal fibroblasts obtained from either body or limb wounds of horses should enable one to study the effects of physically- or chemically-induced hypoxia on the fibroproliferative response of these cells. Understanding the contribution of hypoxia to the pathogenesis of fibrosis will provide a basis for the development of appropriate, targeted therapies to prevent and treat excessive scarring.

Acknowledgments

Bandage materials were generously donated by Covidien Canada. The authors thank Dr. Stine Jacobsen for input during the early planning stages, Julie Ferland and Céline Forget for technical assistance, as well as Dr. Guy Beauchamp for statistical analysis. Research was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada.

List of Abbreviations

ACTB : beta-actin

CDKN1A : cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21^{WAF1/Cip1})

EGLN1 : HIF1A-associated prolyl hydroxylase

EGT : excessive granulation tissue

SLC2A1 : solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 1

HIF1A : hypoxia-inducible factor-1 alpha

VEGF : vascular endothelial growth factor

References

1. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738-46.
2. Wilmink JM. Differences in wound healing between horses and ponies. In: Stashak TS, Theoret CL, editors. *Equine wound management*, second edition. Ames: Wiley-Blackwell, 2008:29-46.
3. 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 Feb;53(1):69-76.
4. Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, Catrina AI, Grunler J, Lindberg S, Pereira T, Yla-Herttuala S, Poellinger L, Brismar K, Catrina SB. Stabilization of hif-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Dec 9;105(49):19426-31.
5. Li W, Li Y, Guan S, Fan J, Cheng CF, Bright AM, Chinn C, Chen M, Woodley DT. Extracellular heat shock protein-90alpha: Linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. *Embo J* 2007 Mar 7;26(5):1221-33.
6. Owings RA, Boerma M, Wang J, Berbee M, Laderoute KR, Soderberg LS, Vural E, Jensen MH. Selective deficiency of hif-1alpha in myeloid cells influences secondary intention wound healing in mouse skin. *In Vivo* 2009 Nov-Dec;23(6):879-84.
7. Rodriguez PG, Felix FN, Woodley DT, Shim EK. The role of oxygen in wound healing: A review of the literature. *Dermatol Surg* 2008 Sep;34(9):1159-69.
8. Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Karrer S, Landthaler M, Babilas P. Oxygen in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol* 2010;163(2):257-68.
9. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing--more than a nutrient. *World J Surg* 2004 Mar;28(3):294-300.
10. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010 Mar;89(3):219-29.

11. 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 Oct;97(4):634-7.
12. Falanga V, Martin TA, Takagi H, Kirsner RS, Helfman T, Pardes J, Ochoa MS. Low oxygen tension increases mRNA levels of alpha 1 (I) procollagen in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* 1993 Nov;157(2):408-12.
13. 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 Apr;191(1):42-50.
14. Shih SC, Claffey KP. Role of ap-1 and hif-1 transcription factors in tgf-beta activation of vegf expression. *Growth Factors* 2001;19(1):19-34.
15. Kischer CW. The microvessels in hypertrophic scars, keloids and related lesions: A review. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1992 Apr;24(2):281-96.
16. Fujiwara M, Muragaki Y, Ooshima A. Upregulation of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor in cultured keloid fibroblasts: Relevance to angiogenic activity. *Arch Dermatol Res* 2005 Oct;297(4):161-9.
17. Le AD, Zhang Q, Wu Y, Messadi DV, Akhondzadeh A, Nguyen AL, Aghaloo TL, Kelly AP, Bertolami CN. Elevated vascular endothelial growth factor in keloids: Relevance to tissue fibrosis. *Cells Tissues Organs* 2004;176(1-3):87-94.
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 Jan 15;312(2):145-55.
19. Lepault E, Celeste C, Dore M, Martineau D, Theoret CL. Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse. *Wound Repair Regen* 2005 Sep-Oct;13(5):520-9.

20. Celeste C, Deschesne K, Riley C, 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.
21. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 2002 Sep;64(5-6):993-8.
22. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (hif-1)alpha: Its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 2004 Feb 29;36(1):1-12.
23. Scheid A, Wenger RH, Schaffer L, Camenisch 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 Mar;16(3):411-3.
24. Cho YS, Bae JM, Chun YS, Chung JH, Jeon YK, Kim IS, Kim MS, Park JW. Hif-1alpha controls keratinocyte proliferation by up-regulating p21(waf1/cip1). *Biochim Biophys Acta* 2008 Feb;1783(2):323-33.
25. Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, Huang LE. Hif-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting myc. *Embo J* 2004 May 5;23(9):1949-56.
26. Missero C, Di Cunto F, Kiyokawa H, Koff A, Dotto GP. The absence of p21cip1/waf1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev* 1996 Dec 1;10(23):3065-75.
27. Kolm G, Knapp E, Wagner R, Klein D. Lactoferrin, a glycoprotein with immunomodulatory and mast cell stabilising properties, in skin of horses suffering from culicoides hypersensitivity. *Res Vet Sci* 2007 Oct;83(2):165-70.
28. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time rt-pcr. *Nucleic Acids Res* 2001 May 1;29(9):e45.
29. Abdi H. Bonferroni and šidák corrections for multiple comparisons. In: Salkind NJ, editor. *Encyclopedia of measurement and statistics*. Thousand Oaks: Sage, 2007:103-7.

30. Albina JE, Mastrofrancesco B, Vessella JA, Louis CA, Henry WL, Jr., Reichner JS. Hif-1 expression in healing wounds: Hif-1alpha induction in primary inflammatory cells by tnf-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 Dec;281(6):C1971-7.
31. Elson DA, Ryan HE, Snow JW, Johnson R, Arbeit JM. Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (hif)-1alpha and hif-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing. *Cancer Res* 2000 Nov 1;60(21):6189-95.
32. Mace KA, Yu DH, Paydar KZ, Boudreau N, Young DM. Sustained expression of hif-1alpha in the diabetic environment promotes angiogenesis and cutaneous wound repair. *Wound Repair Regen* 2007 Sep-Oct;15(5):636-45.
33. Peyssonnaud 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 Aug;128(8):1964-8.
34. Evans SM, Schrlau AE, Chalian AA, Zhang P, Koch CJ. Oxygen levels in normal and previously irradiated human skin as assessed by ef5 binding. *J Invest Dermatol* 2006 Dec;126(12):2596-606.
35. Chun YS, Kim MS, Park JW. Oxygen-dependent and -independent regulation of hif-1alpha. *J Korean Med Sci* 2002 Oct;17(5):581-8.
36. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Induction of hif-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *Faseb J* 2001 May;15(7):1312-4.
37. McMahon S, Charbonneau M, Grandmont S, Richard DE, Dubois CM. Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of phd2 expression. *J Biol Chem* 2006 Aug 25;281(34):24171-81.
38. 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 May-Jun;30(3):269-77.

39. 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 Jan;31(1):61-7.
40. Child ES, Mann DJ. The intricacies of p21 phosphorylation: Protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle* 2006 Jun;5(12):1313-9.

Figures

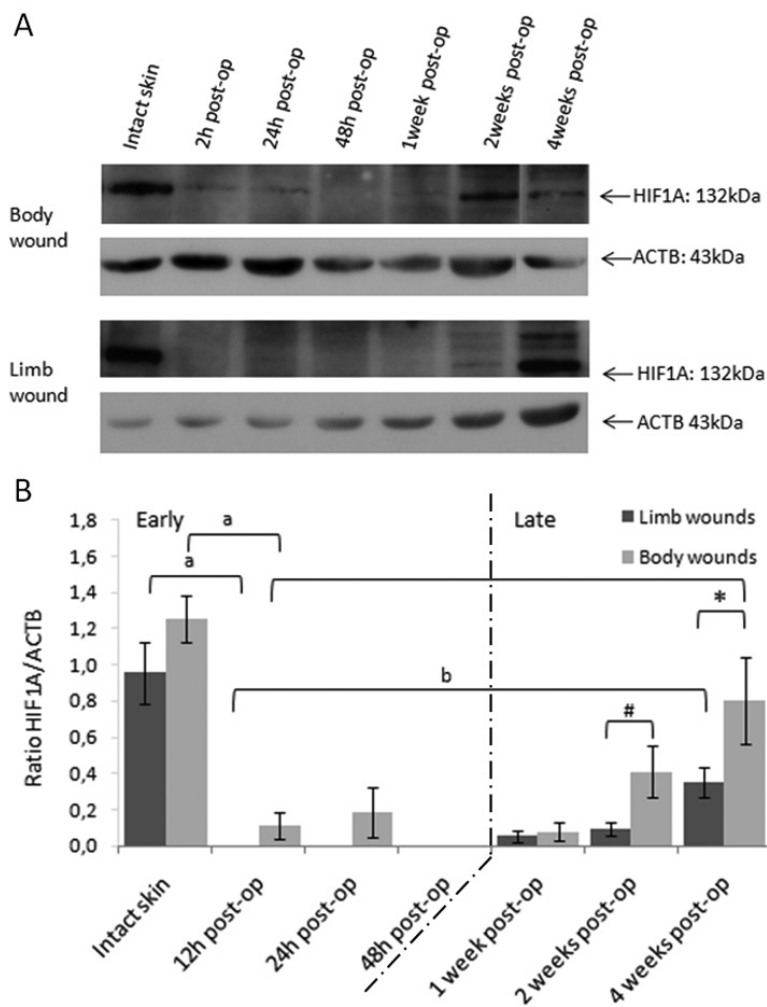


Figure 20 : Figure 1 de l'article 1: HIF1A Protein Expression During Wound Repair in the Horse

Western blot analysis of HIF1A in wound edges biopsies. ACTB was used as a loading control protein. (A) Western blot bands of HIF1A (132 kDa) and ACTB (43 kDa) for one representative individual at each anatomical site. (B) Histogram compiling the six individuals (mean \pm SEM; a : statistical significance ($p < 0.004$); b : tendency ($p < 0.05$; non-significant after correction) versus 12h post-op for given anatomic site; *: statistical significance ($p < 0.004$); #: tendency ($p < 0.05$; non-significant after correction) limb wound versus body wound for given time).

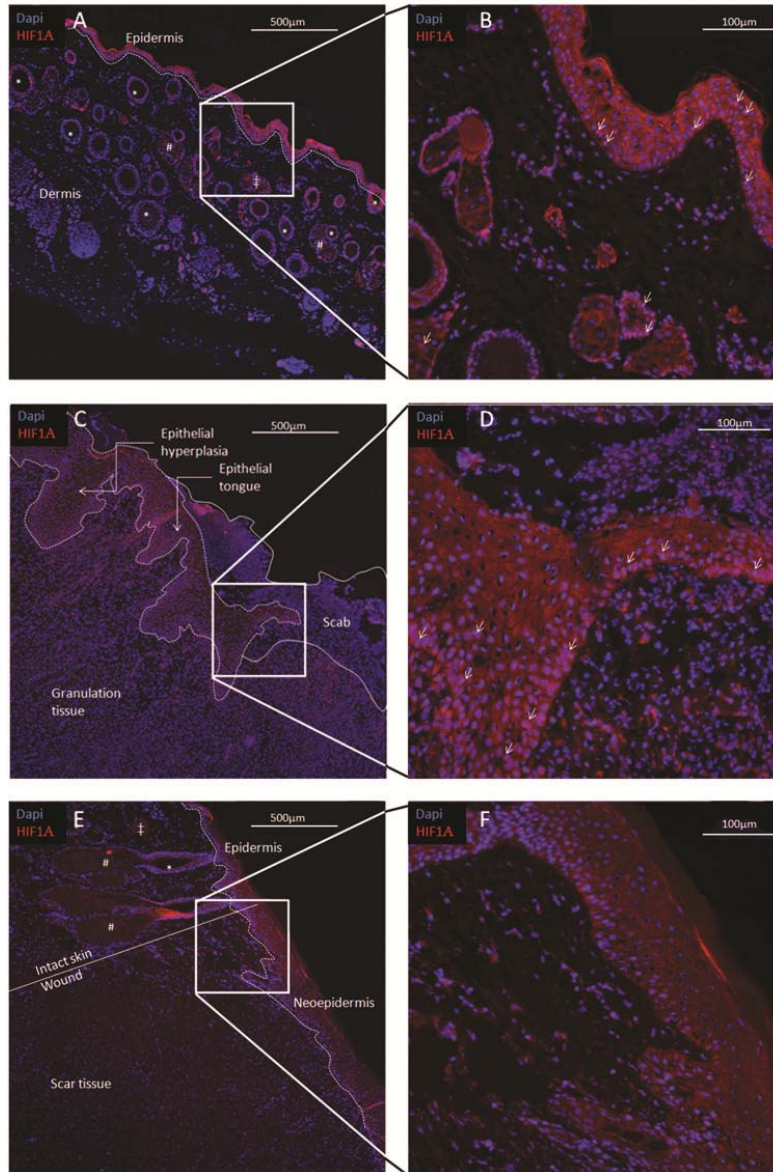


Figure 21 : Figure 2 de l'article 1: Immunolocalization of HIF1A Protein During Wound Repair in the Horse

Immunofluorescence images of HIF1A protein in wound edge biopsies (Blue: Dapi; Red: HIF1A). (A and B) Intact skin (limb). (C and D) 2-week old body wound edge showing migrating keratinocytes within epithelial tongue (migration of epithelial cells under the scab) (E and F) Neoepithelium in a 4-week old body wound. Cutaneous appendages are identified by symbols; * : hair follicle; ‡ : sweat gland; # : sebaceous gland. Nuclear HIF1A is shown by arrow.

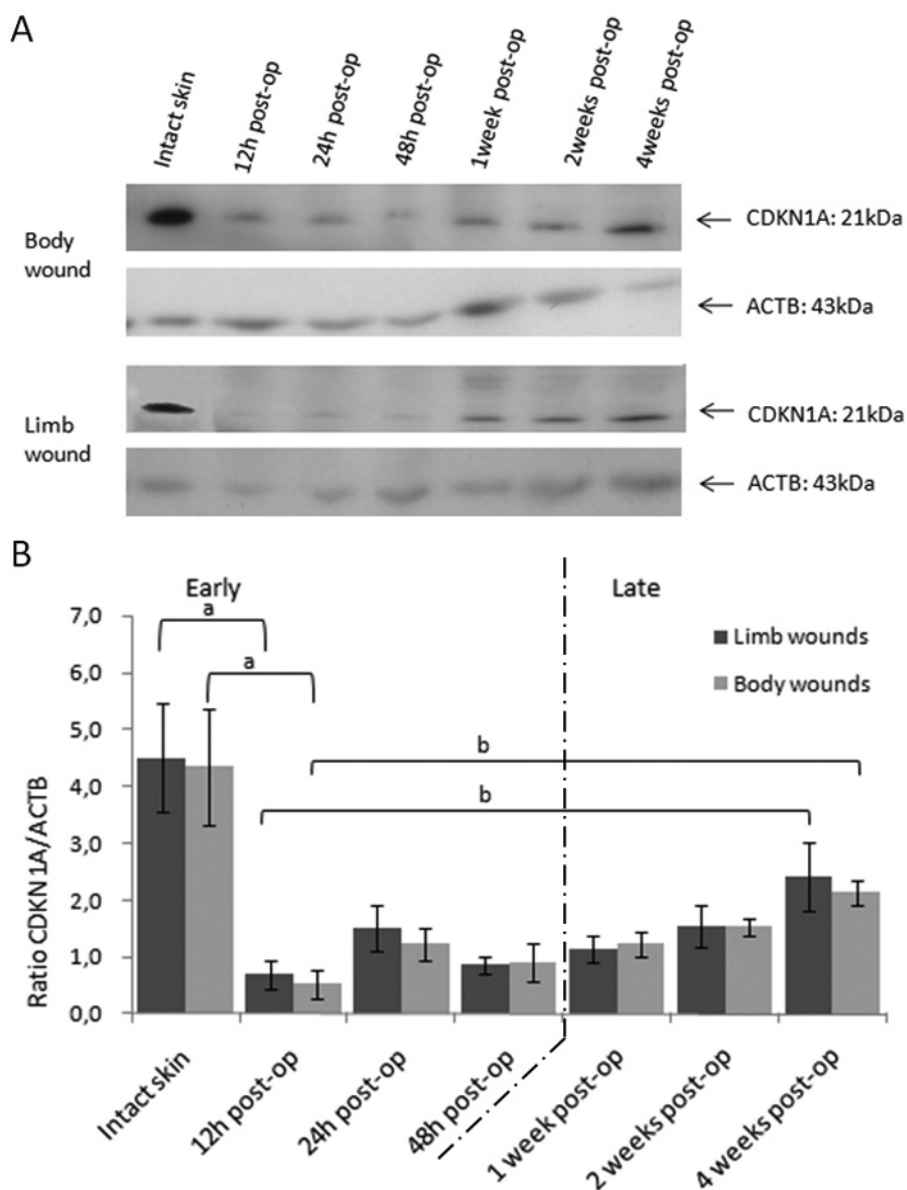


Figure 22 : Figure 3 de l'article 1: CDKN1A Protein Expression During Wound Repair in the Horse

Western blot analysis of CDKN1A in wound edge biopsies. ACTB was used as a loading control protein. (A) Western blot bands showing CDKN1A (21 kDa) and ACTB (43 kDa) for one representative individual at each anatomical site. (B) Histogram compiling the six individuals (mean \pm SEM; a: statistical significance ($p < 0.004$); b: tendency ($p < 0.05$; non-significant after correction) versus 12h post-op for given anatomic site).

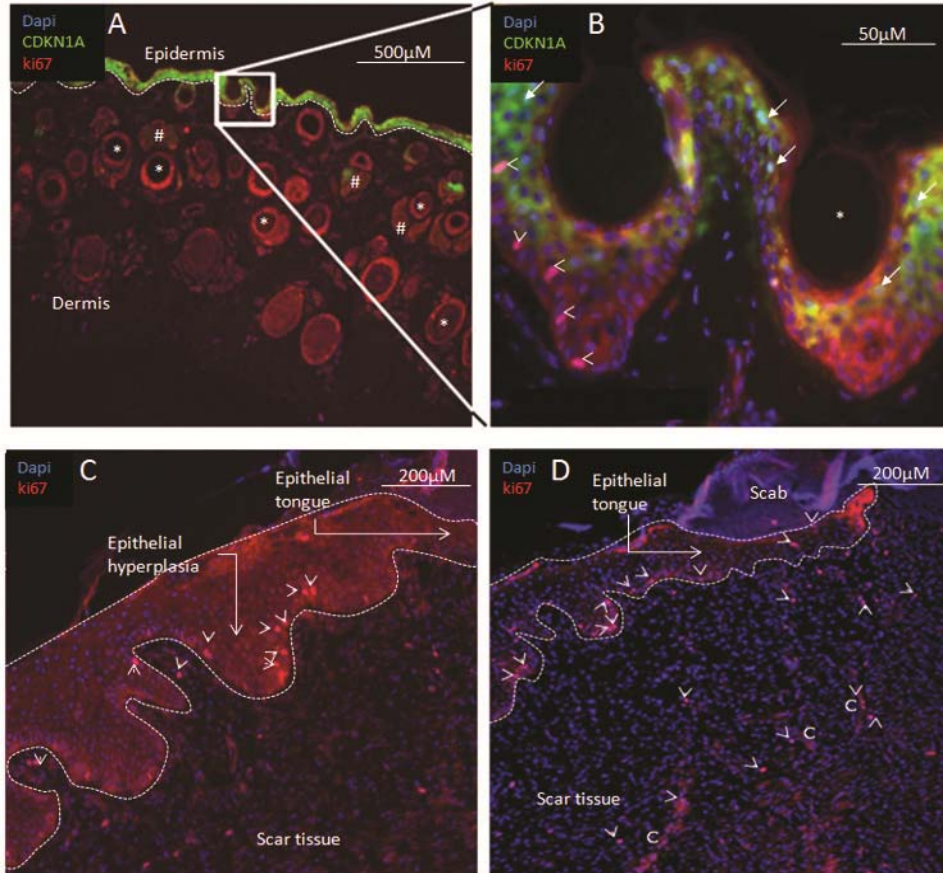


Figure 23 : Figure 4 de l'article 1: Co-localization of CDKN1A and ki67 in Intact Skin of the Horse

Immunofluorescence images of co-localized CDKN1A and ki67 protein expression. A and B : intact skin of the limb; C : epithelial hyperplasia at the edge of a 4-week old body wound; and D : epithelial tongue during epithelialization of a 4-week old body wound. (Blue: Dapi; Green: CDKN1A; Red: ki67). Cutaneous appendages are identified by symbols; * : hair follicle; # : sebaceous gland. Nuclear CDKN1A is shown by a solid arrow and nuclear ki67 by an arrowhead. New blood vessels (capillaries) are identified by the letter C.

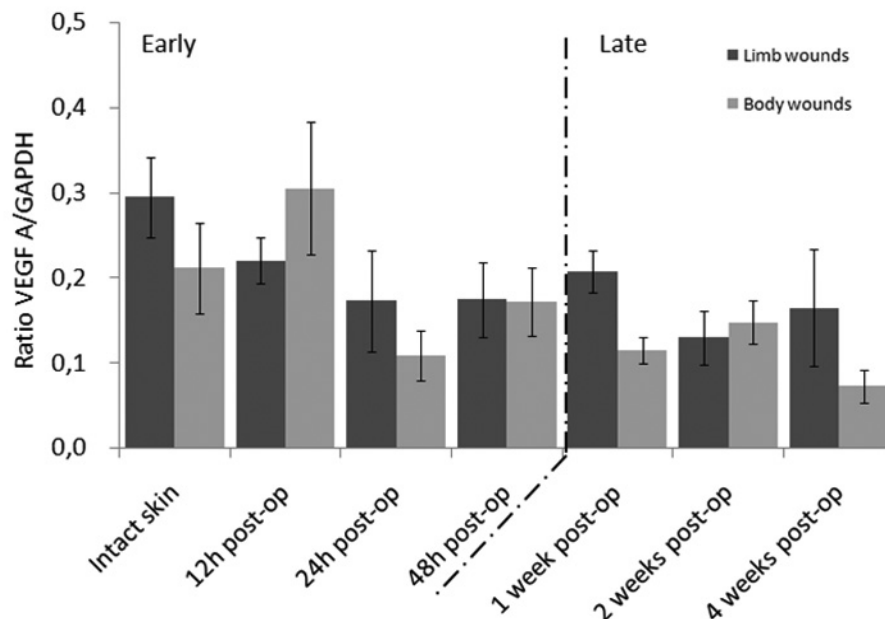


Figure 24 : Figure 5 de l'article 1: VEGFA mRNA Expression During Wound Repair in the Horse

qRT-PCR analysis of VEGFA in wound edges biopsies. GAPDH served as a housekeeping gene. Histogram compiling four individuals (mean \pm SEM).

3.2 Article 2 : Hypoxia regulates the expression of extracellular matrix associated proteins in equine dermal fibroblasts via HIF1

Karine Deschene, MSc; Christophe Céleste, DMV, PhD; Derek Boerboom, DMV, PhD; Christine L Theoret, DMV, PhD

Université de Montréal, Département de biomédecine vétérinaire

Statue de l'article :

L'article a été accepté dans J Dermatol Sci le 15 septembre 2011 et est disponible via [doi:10.1016/j.jdermsci.2011.09.006](https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.09.006) depuis le 29 septembre 2011.

Participation à l'article :

Les résultats présentés dans cet article ont été obtenus dans la totalité par des expériences que j'ai réalisées. J'ai réalisé l'analyse et l'interprétation de l'ensemble des résultats. J'ai également rédigé et soumis cet article.

Hypoxia regulates the expression of extracellular matrix associated proteins in equine dermal fibroblasts via HIF1

Karine Deschene, Christophe Céleste, Derek Boerboom, Christine L Theoret

Université de Montréal, Département de biomédecine vétérinaire, Canada

Short running title: Equine dermal fibroblast response to hypoxia

Key words: Wound healing; Hypoxia; HIF1A; Fibroblast; Extracellular matrix; Horse

Research was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada.

The authors have no conflict of interest to declare

Count: 3634 words, 45 references, 1 table and 6 figures.

Abstract

Background: Exuberant granulation tissue (EGT), a fibrotic healing disorder resembling the human keloid, occurs almost exclusively in limb wounds of horses and may be caused in part by a relative state of hypoxia within the wound.

Objective: The objectives of this study were therefore to 1) assess the effects of hypoxia on equine dermal fibroblast (EDF) proliferation and apoptosis, 2) study the effects of hypoxia on the expression of key extracellular matrix (ECM) associated proteins and determine if such effects are dependent on hypoxia-inducible factor (HIF), and 3) determine if EDFs from the body or limb respond differently to hypoxia.

Methods: EDFs were isolated and cultured from skin from body or limb under normoxic or hypoxic conditions for up to seven days.

Results: Hypoxia significantly stimulated EDF proliferation, but had no effect on cell survival. The hypoxia-mimetic agent CoCl_2 up-regulated COL1A1 expression and down-regulated MMP2 expression, suggesting an increase in ECM synthesis and a decrease in turnover. Both regulatory effects were inhibited by the addition of echinomycin, indicating that they are mediated by the transcriptional regulatory activity of HIF. No differences were observed between EDFs originating from body or limb for any effect of hypoxia or CoCl_2 , suggesting that EGT development does not depend on intrinsic properties of limb fibroblasts.

Conclusions: We conclude that hypoxia regulates ECM remodeling via HIF1 in EDFs, and that this may be an important determinant in the pathogenesis of equine EGT.

Introduction

Wound repair is remarkably uniform across mammalian species [1] and includes four distinctive phases: hemostasis, inflammation, proliferation and remodeling [2]. The proliferative phase aims to replace damaged tissues and relies on three major mechanisms: epithelialisation, angiogenesis and fibroplasia. Dermal fibroblasts predominate during fibroplasia and perform multiple functions important to wound repair, in particular the synthesis of extracellular matrix (ECM) proteins, ECM reorganization and wound contraction resulting in mature scar formation [3]. Excessive ECM accumulation leads to fibrosis and can be the result of increased production of proteins such as collagen, proteoglycan and elastin [4], and/or decreased turnover [5]. The latter occurs when an imbalance arises in the secretion of matrix metalloproteinases (MMPs) vs tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by fibroblasts or other wound cells [1].

Dysregulation of the wound healing process can lead to fibrotic disorders, which in humans manifest clinically as hypertrophic scars or keloids [2]. The equine counterpart is exuberant granulation tissue (EGT), commonly known as “proud flesh”, wherein the wound is trapped in the proliferative phase of repair. Fibroblasts persist and synthesize ECM rather than differentiating into myofibroblasts or being eliminated [6]. This condition occurs primarily on the horse’s lower limb and is detrimental to performance in both show and race horses. 7% of injuries leading to retirement are the result of a wound [7], exerting a significant financial impact of the horse industry. Studies have shown both equine EGT and human keloid to display deficient fibroblast apoptosis and microvascular dysfunction caused by luminal occlusion [8-10]. The latter was incriminated in the state of tissue hypoxia measured in both keloids [11] and, more recently, equine EGT [9]. Hypoxia is proposed as a major mechanism underlying fibrosis and overscarring. Proliferation of human dermal fibroblasts is increased 71% following 72 hours of culture at 1%

oxygen [12], fibroblast synthesis of profibrotic TGF- β 1 is amplified nine-fold after 72 hours of culture at 2% oxygen [13] and hypoxia is a powerful stimulus to the synthesis and transcription of the procollagen gene (COL1A1) [14]. In murine fibroblasts, hypoxia decreases MMP9 activity by 64% and mRNA by 80% [15].

Hypoxia's foremost influence is to generate adaptive responses, such as angiogenesis and cell proliferation, aimed at cellular survival, which depend or not on the hypoxia inducible factor (HIF)1 pathway. HIF1 is a transcription factor composed of a HIF1A subunit with an oxygen-dependent degradation domain (ODD) having a half-life of less than five minutes in normoxia [16]. In normoxia, prolyl hydroxylase (PHD) can efficiently hydroxylate the HIF1A subunit, leading to rapid degradation by the proteasome, whereas hypoxia prevents this reaction [17]. HIF1A translocates to the nucleus where it forms a heterodimer with aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) and binds to DNA on hypoxia response elements (HREs) in the promoters of target genes [18]. The latter include >60 genes, such as vascular endothelial growth factor (*VEGF*) and the facilitated glucose transporter solute carrier family 2 member 1 (*SLC2A1*) [19]. Up-regulation of HIF1A occurs in adult wound healing but not in fetal wound regeneration, implying the contribution of the HIF1A pathway in the pathogenesis of fibrosis and scarring [20].

Given that equine EGT develops in an hypoxic environment which may influence the equine dermal fibroblast (EDF) during the proliferative phase of wound healing, the present study sought to measure ECM gene expression and the mitotic activity of these cells when subjected to hypoxia. In addition, given the clinical propensity of limb wounds for fibrosis, fibroblasts were collected from two different anatomic sites (body and limb) to determine if intrinsic cellular factors contribute to the differences in healing. We hypothesized that hypoxia would increase fibroblast proliferation, that protein synthesis would favor ECM accumulation (increased collagen / decreased

MMP expression) and that these changes would differ according to the cell's anatomic origin. An additional aim of the study was to determine whether hypoxia-dependent changes in ECM protein expression are HIF1-dependent. The ultimate objective of the research program is to elucidate the pathogenesis of dermal fibrosis and scarring in an effort to provide new pharmacological targets to prevent and/or resolve EGT.

Materials and methods

Animals

Two horses euthanized at the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire de l'Université de Montréal for conditions unrelated to skin were used for sampling, which was sanctioned by the Canadian Council on Animal Care. Tissue samples were collected immediately upon death.

Tissue collection, fibroblast extraction and culture

Following aseptic preparation, a full-thickness 8 cm² sample of skin was taken with a scalpel from both the dorsolateral surface of one metacarpal area and from the lateral thoracic wall. Tissues were rinsed in PBS and transported to the laboratory in DMEM supplemented with gentamicin, amphotericin-B, HEPES, L-glutamine and FBS 10% at 4°C. Cell culture products were from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Tissue were cut into ~1 mm² pieces after removal of subcutaneous fat, then subjected to enzymatic digestion in DMEM containing 4 mg/ml of collagenase at 37°C for 30 min. Thereafter, collagenase activity was inactivated with fresh, unsupplemented DMEM and supernatant was collected and centrifuged at 750 RPM for 10 min. Collagenase digestion was repeated twice. Cell pellets were re-suspended in DMEM then plated on Petri dishes for 48h to allow adherence. Cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified environment (i.e. 21% O₂) corresponding to normoxia; medium was changed every three days. Equine dermal fibroblasts (EDF) were identified based on morphology and were passages 4 to 6. Hypoxia was produced by culturing EDF in an incubator set at 1% O₂ in a 5% CO₂ humidified environment at 37°C. Alternatively, hypoxia was mimicked by adding 200 µM CoCl₂ [21] to fibroblasts cultured in normoxia. The HIF1 pathway was inhibited by adding 10 nM echinomycin (VWR International, Mississauga, ON, Canada) [22].

Cell mortality and proliferation

EDF were seeded in 35 mm Petri dishes at a concentration of 6×10^4 cells/dish and left to attach for 24h prior to the experiment. Cell mortality and proliferation were measured using Trypan blue exclusion and counting with a hemacytometer at various times (0h, days 1, 3, 5 and 7) after culturing in normoxia or hypoxia. Experiments were repeated in triplicate for cells from each anatomic site of each horse. Cell divisions (log base 2 of the cell count) as a function of time were measured. Proliferation rate was obtained by linear regression of cell divisions vs. time. Cell mortality was estimated as a percentage ((dead cell/total cell)*100). Four groups were thus compared: limb EDF in normoxia (LN), body EDF in normoxia (BN), limb EDF in hypoxia (LH) and body EDF in hypoxia (BH).

RNA extraction, reverse transcription and qRT-PCR

Total RNA was extracted from cells using Qiagen RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Dosage, reverse transcription and qRT-PCR, were done like in a precedent study [23]. Gene-specific PCR primers were designed from equine cDNA sequences available on GenBank using Primer Express Software (Applied Biosystems); sequences for *VEGFA* were (sense: 5'-CAA CGA CGA GGG CCT AGA GT-3'; anti-sense: 5'-CAT CTC TCC TAT GTG TGG CTT TG-3') while sequences for *SLC2A1* (sense: 5'-CCA TCC TCA TCG CTG TGA TG-3'; anti-sense: 5'-TGC ACC CCC GCT TTC TC-3'). *ATCB* (sense: 5'-CCG ACG GCC AGG TGA TC-3'; anti-sense: 5'-TCG TGG ATA CCA CAA GAC TCC AT-3') was used as a housekeeping gene. *VEGFA* amplicons were 100 base pairs (bp) in length, *SLC2A1* amplicons were 100 bp whereas those for *ATCB* contained 100bp. PCR were performed on 1.5 µl cDNA in 25 µl reaction volume in duplicate. qRT-PCR annealing temperature

was 58°C. PCR amplification efficiencies were similar for all genes. Negative controls (water) were included in each run. The relative expression of target gene was calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method with efficiency correction [24]; the control was a cDNA sample derived from equine scrotal skin.

Protein extraction and Western blot analyses

Total protein was extracted from confluent cell cultures using M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) supplemented with Complete, a protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada). Petri dishes were scraped, on ice, then centrifuged at 600 g for 10 min at 4°C. The protein concentration of the supernatant containing whole cell extract was measured with a ND-1000 NanoDrop spectrophotometer. Protein extracts were stored at -80°C until analysis. For HIF1A Western blotting, 160 µg protein samples were separated by 7,5% acrylamide SDS-PAGE; for precursor collagen $\alpha 1$ Type I (COL1A1), 50 µg protein samples and for MMP2 protein, 70 µg protein samples were separated on a 10% acrylamide gel, while for VEGFA and cleaved caspase-3 (cleaved CASP3), 100 µg protein samples were separated on a 15% acrylamide gel then transferred to PVDF membranes (Hybond-P) (GE Amersham, Pittsburgh, PA, USA). Membranes were blocked in 5% milk, except for HIF1A and VEGFA for which blocking was done in a 2% blocking solution provided in the ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit, for 1h at room temperature. Membranes were then incubated with mouse anti-human HIF1A monoclonal antibody (sc-53546; dilution 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-bovine collagen type 1 polyclonal antibody (CL50121; dilution 1:1000; Cedarlane Labs, Burlington, ON, Canada), rabbit anti-MMP2 polyclonal antibody (NB200-193; dilution 1:1000; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), or rabbit anti-human cleaved CASP3 polyclonal antibody (cs9661; dilution 1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) for 2h at room temperature. Secondary

antibody (sheep anti-rabbit antibody NA931VS, dilution 1:10,000 or donkey anti-rabbit antibody NA934, dilution 1:20,000; GE Amersham, Pittsburgh, PA, USA) was applied for 1h at room temperature. Detection of immunoreactive proteins was achieved with ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit for HIF1A and cleaved CASP3 or ECL™ Plus Western Blotting Detection Kit for the other proteins (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). α -tubulin (12G10; dilution 1:100 000; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA) was used as a loading control. Autoradiographic images were digitized and densitometric measures were obtained using Kodak 1D version 3.6 software.

Statistical analysis

An ANCOVA model, with treatment (LN, BN, LH, BH) and culture time as factors, was used to determine the effects of site and time on proliferation, mortality and protein / gene expression. *A priori* contrasts, with comparison-wise alpha levels adjusted with the Bonferroni sequential correction to maintain the family-wise error rate at the desired level, were then used to compare pre-selected individual means. A non-parametric Kruskal-Wallis test was used to compare treatments (normoxia, CoCl₂ and CoCl₂ + echinomycin) in the experiment aimed at evaluating HIF1-dependency. All analyses were carried out with a family-wise error rate of 0.05, using SAS v.9.2. (Cary, NC, USA). To be significant, a result needed to be below the postcorrection threshold while a tendency was defined as a p-value between 0.05 and the postcorrection threshold.

Results

Hypoxia stimulates equine dermal fibroblast proliferation

To determine the potential effects of hypoxia on proliferation and mortality, EDFs from body and limb were cultured for seven days in normoxic or hypoxic conditions. The morphology of EDFs did not vary according to anatomic origin or culture conditions (not shown). However, comparisons of proliferation rates made over seven days of culture showed significant differences between groups (Fig 1). Proliferation rate of EDF in hypoxia was higher than in normoxia whether for body EDF ($p=0.0002$) or limb EDF ($p<0.0001$). Conversely, no significant differences were seen between EDF from different anatomic sites in either condition.

EDF mortality data measured at days 0, 1, 3, 5 and 7 are shown in Table 1. No significant differences were found between groups at any time.

EDF derived from skin of the limb showed a small, non-significant increase in expression of cleaved CASP3 in response to hypoxia at 3, 12 and 48h (Fig 2). No changes in protein expression were measured in body EDF cultured for 48h in hypoxia. Furthermore, no differences between body and limb EDF were statistically significant at any time over 48h of hypoxia.

Hypoxia mimetic (CoCl₂) induces the expression of HIF1A

A hypoxia mimetic was used for the protein expression studies in an effort to avoid fluctuations in HIF1A levels. The ability of CoCl₂ to act as a hypoxia mimetic in the subsequent experiments was validated by measuring its effect on the expression of HIF1A. CoCl₂ consistently and rapidly induced the expression of HIF1A protein (4-fold increase) at 3 and 6h; at 12h, HIF1A concentrations remained elevated (2-fold) but then declined to finally reach control levels by 24h (data not shown). Moreover, mRNA expression of both

target genes *VEGFA* and *SLC2A1* was increased up to 6-fold 6h following addition of CoCl_2 (Fig 3), confirming the reliability of the chosen hypoxia mimetic.

Hypoxia regulates the expression of ECM-associated proteins (COL1A1 and MMP2)

As hypoxia is thought to be involved in the pathogenesis of fibrosis, we next tested its effects on protein expression of COL1A1 and MMP2 by EDFs from body and limb. Hypoxia significantly upregulated the expression of COL1A1 in limb EDF by 3h (Fig 4A). Concentrations then began to decrease between 12 and 24h of hypoxia. By 48h, COL1A1 concentrations in limb EDF had returned to normoxic values. Body EDF showed the same pattern of expression but the increase, in response to hypoxia, was never statistically significant. No differences in expression of COL1A1 protein between body and limb EDF were statistically significant at any time.

Acute hypoxia led to a steady drop of MMP2 protein expression in EDF cell lysates. Limb EDF expressed less MMP2 protein at 3h of hypoxia ($p= 0.03$ non significant after Bonferroni correction). At 6h, expression continued its decrease to ultimately reach a level of 0.34 ± 0.03 – fold relative to cells in normoxia by 48h (Fig 4B). MMP2 protein expression by body EDF followed the same pattern. While the decrease was non significant at 3h of hypoxia, from 6h forwards, the drop was significant until 48h inclusively. As for COL1A1 expression, no differences between body and limb EDF were statistically significant at any time.

Hypoxia regulates COL1A1 and MMP2 via HIF1A

In order to determine whether the changes observed in response to CoCl_2 treatment were HIF1A-dependent or not, additional EDFs were treated with

echinomycin, which inhibits HIF transcriptional activity by suppressing its binding to the HRE site of target genes [25]. Addition of 10nM echinomycin to the CoCl₂-induced hypoxic culture medium resulted in a drop of 30% in mRNA expression of *VEGFA* and of 65% in expression of *SLC2A1* (Fig 3).

Limb EDFs were subjected to one of three treatments (normoxia; CoCl₂; CoCl₂ + echinomycin) for 6h, after which COL1A1 and MMP2 protein expression was measured. COL1A1 expression showed a statistically significant increase in hypoxia compared to normoxia and to hypoxia + echinomycin (Fig 5A). In the case of MMP2, hypoxia decreased the expression while addition of echinomycin returned it to a level slightly higher than in normoxia (Fig 5B). The differences between hypoxia and hypoxia + echinomycin were statistically significant.

Discussion

Dysregulation of the wound healing process are common pathology and can reach every species. Among its pathology, they have fibroproliferative disorders, finds as hypertrophic scars or keloids in human [2] or as exuberant granulation tissue in horses. EGT is a major cause of retirement from show and race [7] and it exerts a significant financial impact for the horse industry. Recent studies conducted in an effort to elucidate the development of dermal fibroproliferative disorders in horses demonstrated a relative state of hypoxia in limb compared to body wounds, during early healing [26]. The present study attempts to clarify the influence of hypoxia on increased fibroblast proliferation, deficient apoptosis and aberrant collagen metabolism (abundant synthesis / impaired lysis) characteristic of equine EGT. In addition, contribution of the HIF1A pathway to ECM regulation was verified.

Dermal fibroblasts are the predominant cell type in both equine wound granulation tissue and EGT. The positive influence of acute hypoxia (1% O₂) on their proliferation (Fig. 1) echoes what is reported for human dermal [27] and renal fibroblasts [5]. However, cell mortality and expression of cleaved CASP3, the ultimate effector of the apoptosis pathway, did not change in response to hypoxia (Table 1, Fig 2). Saed et al [28] report that the influence of hypoxia on apoptosis of human peritoneal fibroblasts depends on the nature of the cell: normal fibroblasts become increasingly apoptotic when cultured at 2% O₂ whereas hypoxia decreases the rate of apoptosis in adhesion-derived fibroblasts. It would be interesting to study the influence of hypoxia on EDF derived from EGT since previous studies show that both equine EGT [10] and human keloid [29] display deficient fibroblast apoptosis. While the effect of hypoxia on apoptosis merits further investigation, it must be emphasized that in general, severe and prolonged hypoxia initiates apoptosis whereas cells often adapt to acute, mild hypoxia and survive [30].

The anatomic origin of the fibroblast does not appear to exert a significant influence on its response to hypoxia. Microenvironmental factors must account for the distinct healing and scarring/fibrosis patterns observed in horses. Due to their closer proximity to the ground, limb wounds are more susceptible to colonization by microorganisms [31]. The relative state of hypoxia characterizing the healing process at limb level [9] may affect wound defense capabilities and heighten the risk of infection and the development of bacterial biofilm [32, 33]. Lower tissue perfusion also afflicts limb wounds [26]. Hypoperfusion may alter temperature but also moisture, pH and gaseous exchanges at the wound site [34]. These microenvironmental differences may exert a greater influence on fibroblast behavior than its specific anatomic origin.

The choice to study the influence of acute, rather than chronic, hypoxia was based upon data from our laboratory, showing that the major differences in oxygenation between body and limb wounds occur 24 and 48h following wounding [9]. Hypoxia was thus considered a trigger to the development of EGT. Because a trend towards significantly greater hypoxia in limb wounds is still present at 4 weeks of healing [9], future studies should measure the influence of chronic hypoxia (more than 6 passages in hypoxia) to characterize the condition of fibroblasts present in well-established EGT. Siddiqui *et al.* have shown that the stimulatory effects seen in acute hypoxia are suppressed or eliminated on chronic exposure of human dermal fibroblasts to hypoxic conditions [27]. This implies that EDF derived from EGT of limb wounds might suffer from slowed metabolism and/or be unable to progress to a contractile phenotype, explaining the deficient wound contraction characterizing limb wounds of horses [33]. In support of this, rat skin myofibroblast differentiation and contractility were significantly reduced by culturing for 5 days at 2% O₂ [35].

Despite several studies documenting changes in ECM proteins and fibrogenic growth factors in models of equine EGT and other dermal fibroproliferative

disorders of various species, the mechanisms underlying accumulation of ECM remain obscure. Recently, hypoxia was incriminated in systemic sclerosis [36], scleroderma [37] and keloids [38]. Changes in ECM proteins were measured using a hypoxia mimetic, CoCl_2 , because it induces HIF1A more rapidly than physical hypoxia and generate a robust transcriptional response that is more repeatable. Given the largely synthetic function of dermal fibroblasts and their increased proliferative rate under hypoxic conditions, it is no surprise that collagen production was seen to increase in the present study. Perhaps more significant, in parallel with changes in collagen production, hypoxia also altered ECM turnover, suppressing expression of MMP2 (Fig 4A, B). This collagenase degrades collagens I, III, IV, V and XI during tissue remodeling. Saed *et al.* showed that murine fibroblasts decrease MMP9 activity by 64% and mRNA expression by 80% in hypoxia (2% O_2), but observed no changes in MMP2 [15]. Comparisons with the present study are impossible since protein expression rather than mRNA expression or protein activity was measured. ECM maturation is complex, involving a plethora of enzymes; ultimately, the fine balance between matrix-enhancing and matrix-degrading molecules will determine the clinical outcome.

Fibrosis is characterized by TGF- β 1 release and fibroblast activation with a consequent increase in collagen synthesis and decrease in turnover [39]. Moreover, fibroblast synthesis of TGF- β 1 is amplified nine-fold after 72 hours of culture at 2% oxygen [13] and neutralizing antibodies against TGF- β 1 completely abrogate the induction of collagen in human fibroblasts cultured under hypoxic conditions [36]. Given the persistence of elevated concentrations of TGF- β 1 in limb wounds of horses predisposed to the development of EGT [40, 41], it would be interesting to correlate the hypoxia-induced increase in COL1A1 and concomitant decrease in MMP2 synthesis (Fig 4A, B) with TGF- β 1 concentrations.

Changes in expression of COL1A1 and MMP2 under hypoxia were canceled by the addition of echinomycin (Fig 5A & B). Echinomycin, a cyclic peptide antibiotic, specifically binds the 5'-CGTG-3' sequence, which forms the core of the HRE found at the promoters of HIF-target genes [42]. COL1A1 and MMP2 regulation by hypoxia thus appear to depend on HIF1 signaling (Fig 6). MMP2 is generally reported as stable or overexpressed in hypoxia, however downregulation by HIF1 has been shown [43-45]. Results of the current study indicate that inhibition of HIF1 activity may prevent fibrosis and suggest the investigation of this pathway for the development of therapeutic strategies for equine EGT.

In conclusion, data suggest that hypoxia, via the HIF1 pathway, coordinately up-regulates matrix production and decreases matrix turnover in EDF. Results support a role for hypoxia in the pathogenesis of fibrosis (EGT), whose cardinal feature is ECM accumulation. Further studies should investigate the influence of chronic hypoxia and be conducted on other wound healing cells (in particular inflammatory cells and myofibroblasts), and should aim to study more proteins involved in ECM accumulation as well as their link with HIF1A. A better understanding of molecular pathways implicated in equine EGT will provide a basis for the development of appropriate therapies.

Acknowledgments

The 12G10 anti- α -tubulin developed by Frankel, J. and Nelsen, E.M. was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242. The authors thank Genevieve Langevin-Carpentier for technical assistance, as well as Dr. Guy Beauchamp for statistical analysis.

References

- [1] Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT: Wound repair and regeneration. *Nature* 453: 314-321, 2008.
- [2] Li J, Chen J, Kirsner R: Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 25: 9-18, 2007.
- [3] Mollenhauer J, Bayreuther K: Donor-age-related changes in the morphology, growth potential, and collagen biosynthesis in rat fibroblast subpopulations in vitro. *Differentiation* 32: 165-172, 1986.
- [4] Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE: Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg* 117: 1e-S-32e-S, 2006.
- [5] Norman JT, Clark IM, Garcia PL: Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. *Kidney Int* 58: 2351-2366, 2000.
- [6] Wilmlink JM: Differences in Wound Healing between Horses and Ponies. In *Equine Wound Management*. Edited by Stashak TS, Theoret CL. Wiley-Blackwell, Iowa, 2008. pp. 29-46.
- [7] Perkins NR, Reid SW, Morris RS: Profiling the New Zealand Thoroughbred racing industry. 2. Conditions interfering with training and racing. *N Z Vet J* 53: 69-76, 2005.
- [8] Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN: Keloid or hypertrophic scar: the controversy: review of the literature. *Ann Plast Surg* 54: 676-680, 2005.
- [9] 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* 19: 89-97, 2011.
- [10] Lepault E, Celeste C, Dore M, Martineau D, Theoret CL: Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse. *Wound Repair Regen* 13: 520-529, 2005.
- [11] Zhang Q, Wu Y, Ann DK, Messadi DV, Tuan TL, Kelly AP, et al.: Mechanisms of hypoxic regulation of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression in keloid fibroblasts. *J Invest Dermatol* 121: 1005-1012, 2003.

- [12] Tandara AA, Mustoe TA: Oxygen in wound healing--more than a nutrient. *World J Surg* 28: 294-300, 2004.
- [13] 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* 97: 634-637, 1991.
- [14] Falanga V, Martin TA, Takagi H, Kirsner RS, Helfman T, Pardes J, et al.: Low oxygen tension increases mRNA levels of alpha 1 (I) procollagen in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* 157: 408-412, 1993.
- [15] Saed GM, Zhang W, Diamond MP: Effect of hypoxia on stimulatory effect of TGF-beta 1 on MMP-2 and MMP-9 activities in mouse fibroblasts. *J Soc Gynecol Investig* 7: 348-354, 2000.
- [16] Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM: Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441: 437-443, 2006.
- [17] Distler JH, Wenger RH, Gassmann M, Kurowska M, Hirth A, Gay S, et al.: Physiologic responses to hypoxia and implications for hypoxia-inducible factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50: 10-23, 2004.
- [18] Weidemann A, Johnson RS: Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ* 15: 621-627, 2008.
- [19] Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW: Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 36: 1-12, 2004.
- [20] Scheid A, Wenger RH, Schaffer L, Camenisch I, Distler O, Ferenc A, et al.: Physiologically low oxygen concentrations in fetal skin regulate hypoxia-inducible factor 1 and transforming growth factor-beta3. *Faseb J* 16: 411-413, 2002.
- [21] Mace KA, Yu DH, Paydar KZ, Boudreau N, Young DM: Sustained expression of Hif-1alpha in the diabetic environment promotes angiogenesis and cutaneous wound repair. *Wound Repair Regen* 15: 636-645, 2007.
- [22] Kim J, Bagchi IC, Bagchi MK: Signaling by hypoxia-inducible factors is critical for ovulation in mice. *Endocrinology* 150: 3392-3400, 2009.

- [23] Deschene K, Celeste C, Boerboom D, Theoret CL: Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in keratinocytes during the repair of skin wounds in horses. *Wound Repair Regen* 19: 250-259, 2011.
- [24] Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45, 2001.
- [25] Kong D, Park EJ, Stephen AG, Calvani M, Cardellina JH, Monks A, et al.: Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res* 65: 9047-9055, 2005.
- [26] Celeste C, 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. *Vet Surg*; under review.
- [27] Siddiqui A, Galiano RD, Connors D, Gruskin E, Wu L, Mustoe TA: Differential effects of oxygen on human dermal fibroblasts: acute versus chronic hypoxia. *Wound Repair Regen* 4: 211-218, 1996.
- [28] Saed GM, Diamond MP: Apoptosis and proliferation of human peritoneal fibroblasts in response to hypoxia. *Fertil Steril* 78: 137-143, 2002.
- [29] Ladin DA, Hou Z, Patel D, McPhail M, Olson JC, Saed GM, et al.: p53 and apoptosis alterations in keloids and keloid fibroblasts. *Wound Repair Regen* 6: 28-37, 1998.
- [30] Greijer AE, van der Wall E: The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 57: 1009-1014, 2004.
- [31] Westgate SJ, Percival SL, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA: Microbiology of equine wounds and evidence of bacterial biofilms. *Vet Microbiol* 150: 152-159, 2011.
- [32] Westgate SJ, Percival SL, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA: Chronic equine wounds: what is the role of infection and biofilms? *Wounds* 22: 138-145, 2010.
- [33] Wilmink JM, Stolk PW, van Weeren PR, Barneveld A: Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopic aspects. *Equine Vet J* 31: 53-60, 1999.

- [34] Knottenbelt DC: Basic wound management. In Handbook of equine wound management. Edited by Knottenbelt DC. Saunders, London, 2003. pp. 54-73.
- [35] Modarressi A, Pietramaggiore G, Godbout C, Vigato E, Pittet B, Hinz B: Hypoxia impairs skin myofibroblast differentiation and function. *J Invest Dermatol* 130: 2818-2827, 2010.
- [36] Distler JH, Jungel A, Pilecky M, Zwerina J, Michel BA, Gay RE, et al.: Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 56: 4203-4215, 2007.
- [37] Hong KH, Yoo SA, Kang SS, Choi JJ, Kim WU, Cho CS: Hypoxia induces expression of connective tissue growth factor in scleroderma skin fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 146: 362-370, 2006.
- [38] Zhang Q, Wu Y, Chau CH, Ann DK, Bertolami CN, Le AD: Crosstalk of hypoxia-mediated signaling pathways in upregulating plasminogen activator inhibitor-1 expression in keloid fibroblasts. *J Cell Physiol* 199: 89-97, 2004.
- [39] Kisseleva T, Brenner DA: Mechanisms of fibrogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 233: 109-122, 2008.
- [40] 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* 30: 269-277, 2001.
- [41] 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 Repair Regen* 10: 188-194, 2002.
- [42] Vlaminck B, Toffoli S, Ghislain B, Demazy C, Raes M, Michiels C: Dual effect of echinomycin on hypoxia-inducible factor-1 activity under normoxic and hypoxic conditions. *FEBS J* 274: 5533-5542, 2007.
- [43] Fan RH, Chen PS, Zhao D, Zhang WD: [Hypoxia induced by CoCl₂ influencing the expression and the activity of matrix metalloproteinase-2 in rat hepatic stellate cells]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 15: 654-657, 2007.

[44] Medina-Torres CE, Mason SL, Floyd RV, Harris PA, Mobasheri A: Hypoxia and a hypoxia mimetic up-regulate matrix metalloproteinase 2 and 9 in equine lamellar keratinocytes. *Vet J*, 2011.

[45] Ye H, Zheng Y, Ma W, Ke D, Jin X, Liu S, et al.: Hypoxia down-regulates secretion of MMP-2, MMP-9 in porcine pulmonary artery endothelial and smooth muscle cells and the role of HIF-1. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 25: 382-384, 407, 2005.

Table**Tableau II : Table 1 de l'article 2 : Mortality of EDF in normoxia and hypoxia**

Group	Day 0 % ± SEM	Day 1 % ± SEM	Day 3 % ± SEM	Day 5 % ± SEM	Day 7 % ± SEM
BN	4.7 ± 0,7	3.9 ± 0.8	5 ± 1	8 ± 3	3.2 ± 0.5
BH	8 ± 4	3.3 ± 0.5	1.3 ± 0.4	2.4 ± 0.4	1.1 ± 0.2
LN	2.9 ± 0,3	3.6 ± 0.2	2.4 ± 0.6	3.4 ± 0.5	2.8 ± 0.6
LH	6 ± 3	2.1 ± 0.4	2.01 ± 0.04	1.9 ± 0.8	1.0 ± 0.2

Cell mortality measured by Trypan blue exclusion staining. Table compiling cell mortality percentage at each day of culture (mean ± SEM). Hypoxia obtained in hypoxic chamber calibrated at 1% O₂. N=3 for each group. (BN: Body EDF in normoxia; BH: Body EDF in hypoxia; LN: Limb EDF in normoxia; LH: Limb EDF in hypoxia)

Figures

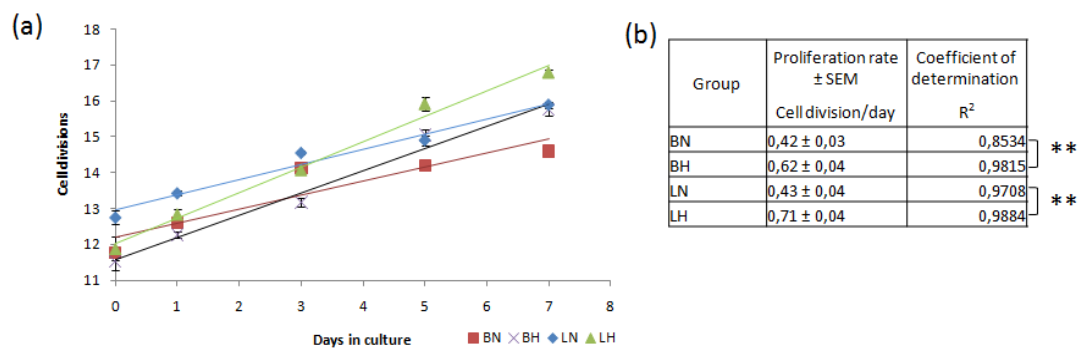


Figure 25 : Figure 1 de l'article 2: Prolifération de EDF en normoxia and hypoxia.

Cell proliferation measured using Trypan blue exclusion and counting. (a) Graph showing cell division (log base 2 of cell count) as a function of time (hypoxic chamber calibrated at 1% O₂). N=3 for each group. Symbol: ◇limb EDF in normoxia □ body EDF in normoxia Δ limb EDF in hypoxia and × body EDF in hypoxia. (b) Table compiling proliferation rate (linear regression of cell division as a function of time) and coefficient of determination (R²) for the four groups (mean ± SEM; **: statistically significant difference between normoxia and hypoxia, limb p<0.0001 and body p=0.0002).

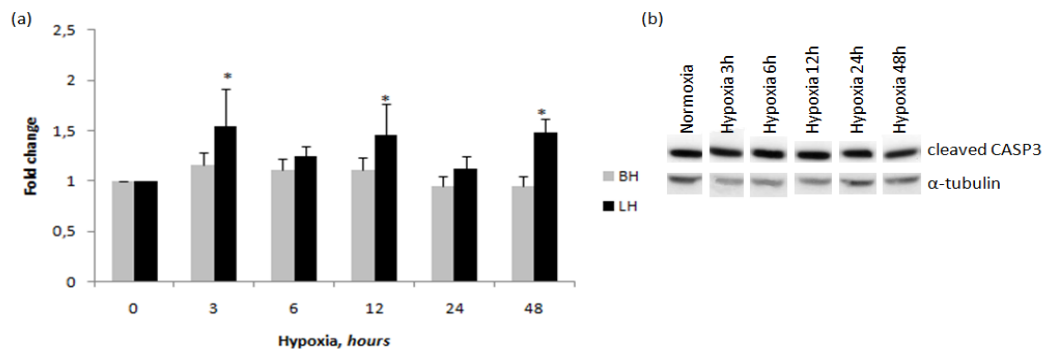


Figure 26 : Figure 2 de l'article 2: Cleaved caspase-3 (CASP3) protein expression in EDF cultured in CoCl_2 hypoxia.

Western blot analysis of CASP3 in cell lysate total protein extraction. α -tubulin was used as a loading control protein. a) Histogram compiling results (mean \pm SEM; *: tendency $p < 0.05$; non significant after Bonferroni correction). Results are compared to normoxia values (time 0) and data are presented as fold-increase. Grey columns represent body EDF values and black columns represent limb EDF values. $N=4$ for each group at each time. b) Western blot bands of CASP3 and α -tubulin for limb EDF.

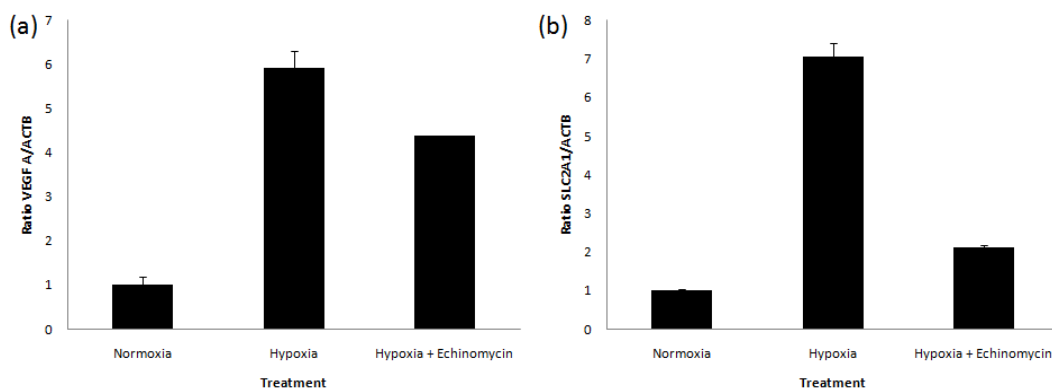


Figure 27 : Figure 3 de l'article 2: Vascular endothelial growth factor A (VEGF A) and solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 1 (SLC2A1) mRNA expression in EDF exposed to 6h treatment of CoCl_2 hypoxia, with or without echinomycin. qRT-PCR analysis of a) VEGF A and b) SLC2A1 in cell lysate RNA extraction. β -actin (ACTB) used as a housekeeping gene. Histogram compiling results (mean \pm SEM). $N=2$ for each group.

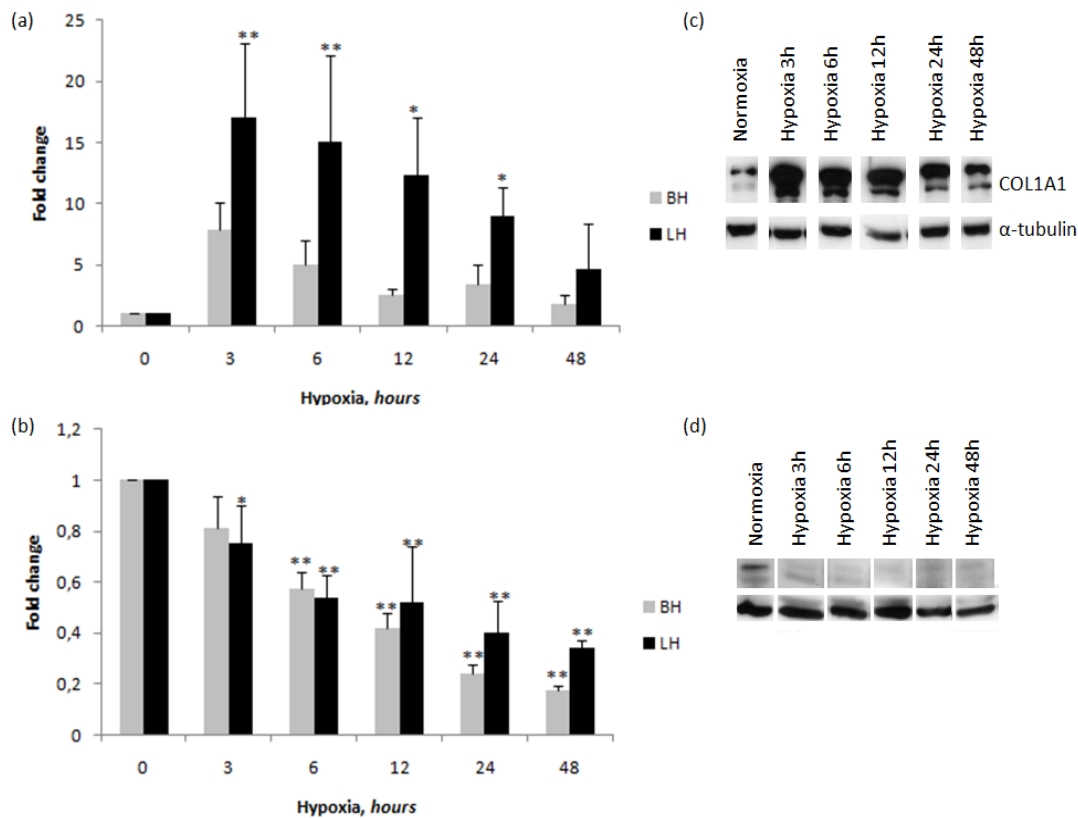


Figure 28 : Figure 4 de l'article 2: Precursor collagen $\alpha 1$ type I (COL1A1) and matrix metalloproteinase 2 (MMP2) protein expression in EDF cultured in CoCl_2 hypoxia.

Western blot analysis of a) COL1A1 or b) MMP2 in cell lysate total protein extraction. α -tubulin used as a loading control protein. Histogram compiling results (mean \pm SEM; **: statistically significant difference between normoxia and hypoxia $p < 0.005$, *: tendency $p < 0.05$; non significant after Bonferroni correction). Results are compared to normoxia values (time 0) and data are presented as fold-increase. Grey columns represent body EDF values and black columns represent limb EDF values. $N=4$ for each group at each time. Western blot bands of c) COL1A1 or d) MMP2 and α -tubulin for limb EDF.

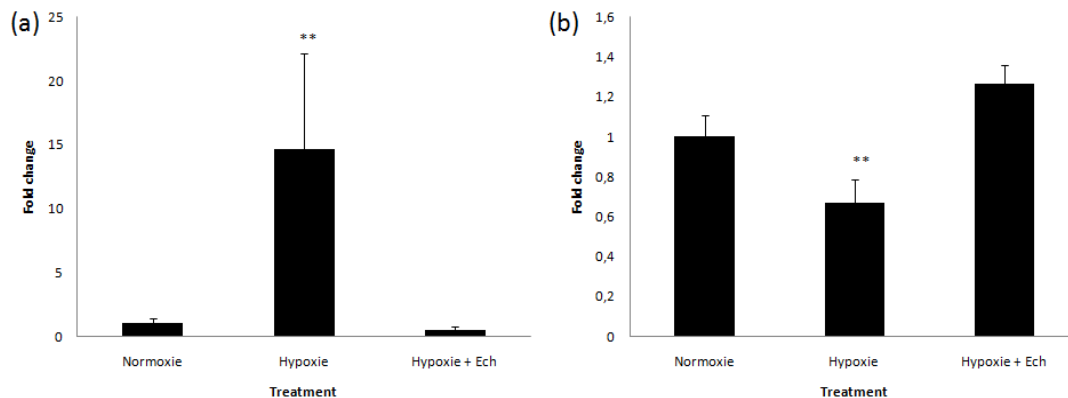


Figure 29 : Figure 5 de l'article 2: Precursor collagen $\alpha 1$ type I (COL1A1) and matrix metalloproteinase 2 (MMP2) protein expression in EDF exposed to 6h treatment of CoCl_2 hypoxia, with or without echinomycin.

Western blot analysis of a) COL1A1 or b) MMP2 in cell lysate total protein extractions. α -tubulin used as a loading control protein. Histogram compiling results (mean \pm SEM; **: statistically significant difference between treatments (COL1A1 $p < 0.01$; MMP2 $p < 0.03$). Results are normalized to normoxic values and data are presented as fold-increase. N=7 for normoxia and hypoxia; N=3 for hypoxia + echinomycin.

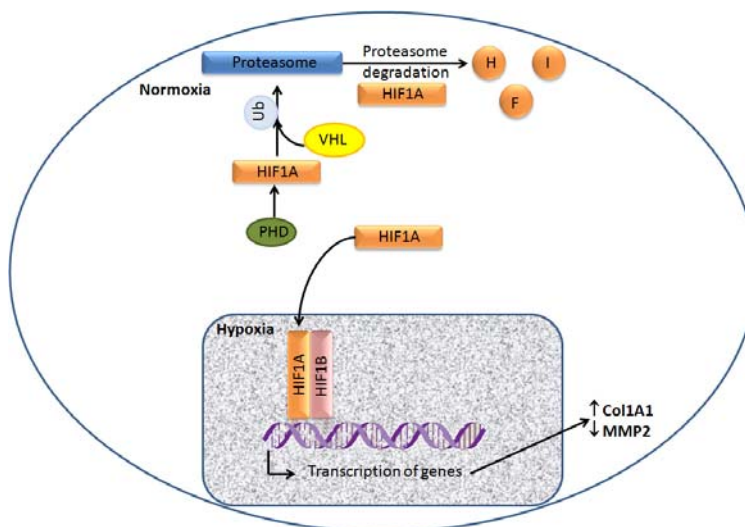


Figure 30 : Figure 6 de l'article 2: Col1A1 and MMP2 under HIF1A regulation.

Results presented show Col1A1 and MMP2 regulated by HIF1A in equine dermal fibroblasts.

4 DISCUSSION GÉNÉRALE

La guérison cutanée des plaies de membre chez le cheval est souvent accompagnée de complication. Les causes possibles de ces complications sont nombreuses, mais de plus en plus les niveaux d'oxygène au site de la plaie sont incriminés dans le cas du développement d'un TGE. Actuellement, l'utilisation des chambres hyperbares comme traitement pour le TGE, afin d'augmenter l'oxygénation des plaies est controversée et déconseillée (Holder et al., 2008). Aucune thérapie, présentement, n'est vraiment efficace sur le TGE, ce qui motive la recherche sur l'étude des mécanismes qui sous-tendent son développement. La recherche sur cette pathologie permettra une meilleure compréhension de celle-ci et possiblement la mise au point de future thérapie pharmacologique efficace. Les études présentées ont pour but d'étudier une parcelle des mécanismes de l'hypoxie sur la guérison cutanée équine en vérifiant la présence de l'hypoxie au niveau moléculaire (Deschene et al., 2011), ainsi que son effet sur les fibroblastes (Deschene et al., In press).

4.1 *HIF1A est constitutivement exprimé dans les*

kératinocytes

La première étude avait pour but de dresser le portrait spatio-temporel de la réponse moléculaire à l'hypoxie récemment observée par spectroscopie dans le proche infrarouge (NIRS) lors de la guérison tissulaire par seconde intention chez le cheval (Céleste, Deschene et al., 2011).

Le facteur de transcription HIF1A est un acteur majeur dans l'adaptation cellulaire à l'hypoxie, ce qui justifie son utilisation comme marqueur d'hypoxie

dans plusieurs études de guérison (Elson, Ryan *et al.*, 2000; Albina, Mastrofrancesco *et al.*, 2001; Mace, Yu *et al.*, 2007). Le facteur de transcription HIF1 est régulé à plusieurs niveaux, mais principalement de façon post-traductionnelle. Pour cette raison la mesure de son ARNm fournit une information qui peut être distincte de la mesure de sa protéine. La mesure la plus représentative de l'activation de HIF1A serait faite à partir d'extraits protéiques au niveau nucléaire plutôt qu'à partir d'extraits protéiques totaux. Les extraits nucléaires auraient ainsi permis de mesurer uniquement l'expression de la protéine qui a transloqué au noyau et qui peut dimériser avec ARNT et par la suite, agir comme facteur de transcription (Figure 16). Les résultats obtenus en mesurant l'expression du HIF1A sur des extractions protéiques totales d'échantillons tissulaires mixtes étaient inattendus. L'hypothèse émise était que le HIF1A au niveau de la plaie allait suivre un patron d'expression diamétralement opposé au patron de l'oxygénation observé en NIRS (Celeste *et al.*, 2011), c'est-à-dire une augmentation rapide du HIF1A suite au traumatisme, suivi d'une descente progressive au cours de la guérison. Cependant, son expression suivait un patron différent; il était initialement élevé pour ensuite chuter au moment où les vaisseaux sanguins furent sectionnés, donc moment où l'oxygène se rend difficilement au site de la plaie. L'expression du HIF1A a ensuite remonté en fin de guérison lorsque les vaisseaux furent recréés par angiogenèse.

Une analyse subséquente, réalisée par immunofluorescence sur coupe, a révélé que la protéine HIF1A était principalement exprimée par les kératinocytes de la peau. L'expression du HIF1A par les kératinocytes est rapportée par Cho et collaborateurs comme étant constitutive (Cho, Bae *et al.*, 2008). Ces derniers concluent que HIF1A joue un rôle important dans l'homéostasie et le contrôle de la prolifération des kératinocytes cutanés. Il s'avère donc que nos données reflètent la progression de l'épithélialisation durant le processus de guérison plutôt que de tracer le patron d'hypoxie durant ce processus.

Comme mentionné à la section 1.4.2.2.3, le HIF1A exprimé constitutivement dans les kératinocytes régule la transcription de CDKN1A, un inhibiteur des kinases cycline-dépendantes qui permet l'arrêt du cycle cellulaire en G1 afin de maintenir l'homéostasie de la peau (Cho, Bae *et al.*, 2008). Le patron d'expression protéique de CDKN1A au niveau des échantillons de peau intacte et de plaies en guérison est similaire à celui de la protéine HIF1A. De plus, la colocalisation en immunofluorescence a démontré que les kératinocytes qui expriment CDKN1A sont localisés principalement à la surface de la peau, tandis que ceux présents dans les annexes cutanées tels les glandes sébacées et les follicules pileux, expriment fortement le ki67, un marqueur de prolifération. Cette observation corrèle avec le patron de maturation de l'épiderme: les kératinocytes prolifèrent principalement au niveau des annexes cutanées (ki67-positifs), puis ils se différencient (CDKN1A-positifs au niveau cytosolique) et migrent vers le *stratum corneum* où ils vont entrer en sénescence (CDKN1A-positifs au niveau nucléaire). Une autre étude rapporte que la localisation de l'hypoxie est reliée aux cellules en croissance ou en migration, et non celles en prolifération (Xing *et al.*, 2011). De plus, il est démontré que le HIF1A exprimé par les kératinocytes n'induit pas la transcription de gènes liés à la réponse à l'hypoxie pour assurer l'adaptation cellulaire (Cho, Bae *et al.*, 2008). C'est également ce que nous avons observé à l'aide d'un qRT-PCR du gène VEGF A qui est normalement régulé par HIF1A en situation d'hypoxie.

Cette première étude a démontré que le HIF1A est fortement exprimé dans les kératinocytes de la peau équine, et ce, de façon indépendante à l'hypoxie. Il permet le contrôle de l'homéostasie de l'épithélium via la régulation de CDKN1A. L'utilisation du HIF1A comme marque d'hypoxie dans des échantillons mixtes contenant des kératinocytes n'est pas appropriée. Afin de vérifier la présence d'hypoxie cellulaire, il faudrait utiliser un autre marqueur ou des échantillons pris au centre de la plaie et sans épithélium.

Une étude sur le cancer du col de l'utérus a comparé divers marqueurs moléculaires de l'hypoxie aux résultats obtenus par tomographie par émission de positron. Parmi les marqueurs utilisés se retrouvaient le VEGF, la cyclo-oxygénase-2 et l'anhydrase carbonique IX (Grigsby *et al.*, 2007).

4.2 Effet de l'hypoxie ou d'un mimétique sur divers

comportements des FDE

Les études précédemment réalisées au laboratoire suggèrent que l'hypoxie peut exercer une influence sur le développement du TGE sur les plaies appendiculaires chez le cheval (Lepault, Céleste *et al.*, 2005; Céleste, Deschene *et al.*, 2011). Des études préliminaires que j'ai réalisées sur le tissu de granulation ont montré la présence d'hypoxie cellulaire au niveau des fibroblastes cutanés. De cette constatation est née l'hypothèse que l'hypoxie favoriserait la prolifération des fibroblastes ainsi que leur synthèse de protéines profibrotiques.

Les résultats du second article obtenus via l'expérience *in vitro* démontrent que l'hypoxie accélère la prolifération des fibroblastes, tel que déjà rapporté chez d'autres espèces (Siddiqui, Galiano *et al.*, 1996; Norman *et al.*, 2000). Il est à noter que les résultats de synthèse protéique rapportés dans l'article ont été obtenus à l'aide d'un mimétique de l'hypoxie (CoCl_2), car les données sont plus constantes qu'en hypoxie physique à 1% d' O_2 . En hypoxie physique, les résultats varient puisque la stabilité du HIF1A est altérée après seulement 4 minutes de réoxygénation (Jewell, Kvietikova *et al.*, 2001); le temps requis pour réaliser les extractions protéiques influence donc les concentrations de protéines. De plus, des observations qualitatives indiquent que le niveau de confluence cellulaire semble influencer la synthèse protéique en réponse à l'hypoxie physique. Les cellules arrivées tout juste à confluence semblent synthétiser moins de protéine que celles ayant atteint une

surconfluence (étages de fibroblastes), malgré une normalisation par rapport à l' α -tubuline. La confluence lâche des fibroblastes ne semble pas suffisante pour arrêter leur prolifération au profit de la synthèse protéique. Il est rapporté que les fibroblastes qui prolifèrent rapidement synthétisent peu de protéine, et inversement ceux qui prolifèrent peu en synthétisent plus (Mollenhauer et Bayreuther, 1986). Pour toutes ces raisons, le CoCl_2 a été utilisé et il a permis de démontrer que la stabilisation du HIF1A a des effets pro-fibrotique en augmentant la synthèse de COL1A1 et de MMP 2.

Les données obtenues *in vitro* ont confirmé l'hypothèse selon laquelle l'hypoxie influence positivement la synthèse de protéines pro-fibrotiques. Pour réaliser cette expérience, les pétris à confluence ont été incubés avec 200 μM de CoCl_2 pendant une période de 3h à 48h avant que les protéines totales soient extraites afin de procéder à des immunobuvardages de type Western. Le CoCl_2 est un composé couramment utilisé en culture cellulaire pour mimer l'hypoxie (Fan *et al.*, 2007; Vincent, Phan *et al.*, 2008; Medina-Torres *et al.*, 2011). L'ion cobalt du CoCl_2 substitue l'ion fer de l'enzyme PHD empêchant cette dernière de phosphoryler HIF1A (Figure 17), le stabilisant et prévenant sa dégradation par le protéasome (Weidemann et Johnson, 2008) (Figure 16). Comme le développement de fibrose résulte d'un déséquilibre entre la synthèse collagénique et le remodelage via les métalloprotéinases, deux protéines ont été ciblées : le collagène 1 et MMP 2. Les FDE à confluence, en présence du CoCl_2 , ont augmenté significativement leur synthèse de collagène 1 et diminué celle de MMP 2. Les résultats obtenus dans les diverses expériences *in vitro* ont montré aucune différence significative entre les fibroblastes issus des deux sites anatomiques étudiés (corps VS membre), excluant par le fait même des différences intrinsèques. Il semblerait donc que le comportement des fibroblastes soit principalement influencé par des facteurs extrinsèques, c'est-à-dire environnementaux. Étant donné que la provenance anatomique n'influence pas l'expression de COL1A1 et de MMP

2, il aurait été intéressant de voir si des fibroblastes en provenance de TGE mature avaient une réponse distincte à l'hypoxie.

Par ailleurs, des analyses de l'expression de la CASP-3 clivée ont également été réalisées, afin de voir si l'hypoxie influence la mortalité et le taux d'apoptose des fibroblastes, puisqu'il a été démontré que les plaies appendiculaires présentent une dérégulation de l'apoptose (Lepault, Céleste *et al.*, 2005). Les expériences réalisées *in vitro* sur les FDE n'ont démontré aucune différence significative dans l'expression de la CASP-3 clivée. L'influence de l'hypoxie et de la stabilisation du HIF1A sur l'apoptose est encore obscure; il semblerait que l'effet puisse être diamétralement opposé, passant de la survie cellulaire à l'apoptose, selon le niveau d'hypoxie (Piret, Mottet *et al.*, 2002).

Le deuxième volet de cette étude a permis de confirmer que les changements induits par l'ajout du CoCl_2 sont HIF1A-dépendants. L'échinomycine est un antibiotique de la famille des quinoxalines qui a la propriété de lier l'ADN double brins via l'intercalation d'une séquence de nucléotides spécifiques empêchant ainsi la liaison du complexe HIF1A-ARNT au domaine HRE et donc la transcription des gènes sous sa régulation (Vlaminck *et al.*, 2007). Les FDE sous l'influence du CoCl_2 et de l'échinomycine exprimaient les protéines COL1A1 et MMP 2 à des niveaux similaires à ceux observés en normoxie, malgré la stabilisation du HIF1A. L'hypoxie, via la stabilisation du HIF1A, semble donc exercer un effet positif sur le développement de fibrose en augmentant la synthèse de collagène 1 et en diminuant le remodelage par MMP 2. Comme le MMP 2 a été mesuré sous forme de protéine, il serait intéressant de voir si l'hypoxie a un effet négatif sur la transcription du gène ou s'il altère la stabilité de la protéine.

L'étude *in vitro* a permis de constater que l'origine anatomique du FDE ne module pas son comportement prolifératif ou synthétique. Par contre,

l'environnement auquel il est soumis occasionne des changements significatifs, l'hypoxie étant un catalyseur de la fibrose. Étant donné que le TGE est davantage retrouvé au niveau des plaies du membre, il est probable que l'environnement de ces plaies soit distinct de celui des plaies corporelles. Les plaies situées sur le membre sont plus susceptibles à la contamination par les microorganismes vu leur proximité au sol (Westgate *et al.*, 2011). De plus, les plaies appendiculaires présentent une hypoxie tissulaire supérieure à celle des plaies corporelles (Céleste, Deschene *et al.*, 2011) en plus d'afficher une perfusion tissulaire altérée (Céleste, Deschene *et al.*, In press). L'hypoperfusion peut modifier la température, mais également le niveau d'humidité, le pH et les échanges gazeux au site de la plaie (Knottenbelt, 2003). Voici donc quelques différences environnementales qui pourraient influencer le niveau d'oxygénation et conséquemment, le comportement du FDE.

Cette seconde étude a démontré que la stabilisation du HIF1A a un effet pro-fibrotique sur les FDE. La stabilisation du HIF1A est normalement observée en hypoxie, par contre ici l'utilisation d'un mimétique a eu lieu. Une observation importante réalisée est que la régulation à la hausse de COL1A1 et à la baisse de MMP 2 sont HIF1A-dépendantes, ce qui incrimine une fois de plus l'hypoxie en tant que promoteur du développement du TGE. De plus, le comportement des fibroblastes ne semble pas varier selon leur site anatomique, les conditions environnementales hypoxiques semblent davantage être en cause. La recherche sur les mécanismes derrière cette pathologie doit se poursuivre, néanmoins, les résultats de cette étude démontrent que la voie du HIF1A est potentiellement une cible pharmacologique.

4.3 HIF1A, marqueur d'hypoxie dans le tissu de granulation

Au départ ce projet devait comparer la guérison cutanée au niveau du corps et des membres, dont les plaies seraient gardées soit sans bandage (modèle de guérison retardée) ou avec bandage (modèle de TGE). Pour des raisons de concision, la première publication ne rapporte que les résultats de l'expression du HIF1A au niveau du corps et des membres non bandés. Cependant, la comparaison des données des plaies de membre avec bandage et sans bandage semblait davantage refléter le rôle de marqueur moléculaire de l'hypoxie du HIF1A. Afin de vérifier cette affirmation, de nouvelles mesures devront être faites et idéalement en prenant uniquement le centre de la plaie. Cependant, étant donné que les plaies localisées au niveau des membres souffrent d'une épithélialisation retardée par rapport au corps (Wilmink, Stolk *et al.*, 1999a), la mesure du HIF1A dans les biopsies mixtes est moins influencée par son expression constitutive par les kératinocytes. Comme des études réalisées sur la chéloïde de l'Homme ont identifié une hausse de l'expression de la protéine HIF1A dans cette pathologie fibroproliférative (Zhang, Wu *et al.*, 2003), il est possible que cette même observation soit faite dans le TGE chez le cheval. L'étude du TGE, en l'absence du bord de plaie, pourrait fournir des renseignements plus spécifiques. De plus, des études montrent que le niveau d'oxygénation varie entre le centre et la périphérie d'une plaie (Tandara et Mustoe, 2004), ce qui suppose que les niveaux peuvent également varier dans un TGE. À partir de cette constatation, il est possible que l'expression de la protéine HIF1A varie, également, en fonction de la profondeur à laquelle est pris l'échantillon; la taille du TGE pourrait donc également influencer l'expression protéique. La façon dont a été réalisée l'étude *in vivo*, a permis de localiser la présence de HIF1A dans les kératinocytes de façon constitutive, mais n'a pas permis d'évaluer sa présence dans le tissu de granulation et spécifiquement au niveau des fibroblastes. Lorsque la mesure du HIF1A sera obtenue *in vivo* pour les fibroblastes du tissu de granulation, l'étude *in vitro* de ce type

cellulaire prendra tout son sens. Malgré, l'absence de cette confirmation moléculaire, plusieurs études tendent à le démontrer la présence d'hypoxie au niveau des plaies appendiculaires (Lepault *et al.*, 2005; Celeste, Deschene *et al.*, 2011).

4.4 Limites, problèmes rencontrés et méthodes alternatives

Les expériences réalisées au cours du programme de doctorat présentent certaines limites, dont la première est le faible nombre (n). Dans l'article 1, qui repose sur un projet *in vivo* dont les sujets (chevaux) présentent forcément des caractéristiques individuelles, le n est de 6. La puissance statistique était donc faible, surtout en raison de la méthode d'analyse qui devait inclure une correction de Bonferroni pour tenir compte des nombreuses comparaisons réalisées. Afin de limiter l'effet inter-individu, chaque cheval était son propre contrôle étant donné que la comparaison était réalisée entre les membres et le corps. Pour la seconde étude, suite à un problème de conservation des FDE à partir des chevaux alloués au premier projet, il a été nécessaire de solliciter un abattoir local et le Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire pour obtenir des tissus frais afin de pouvoir isoler de nouveau des fibroblastes pour la culture. Pour ce second projet, la même approche a été utilisée; les fibroblastes de corps provenaient du même animal que ceux des membres. Afin d'atteindre un nombre de fibroblastes adéquat, il a été possible d'amener les cellules à se diviser pendant quelques semaines, c'est-à-dire jusqu'au passage 6. Le nombre de FDE à ce passage a permis de réaliser l'ensemble des expériences en duplicata, avant que les fibroblastes ne commencent à présenter un phénotype différent et par la suite tendent vers la sénescence en normoxie (20% O₂).

Une difficulté qui limite les expériences de biologie moléculaire sur des chevaux est la pénurie de réactifs commerciaux. Très peu de réactifs sont spécifiques au cheval, que ce soit des ensembles ELISA ou des anticorps

primaires, en raison du nombre restreint de chercheurs étudiant cette espèce. Puisque le génome équin est entièrement séquencé (Wade *et al.*, 2009), il est cependant possible de prévoir si la séquence d'un anticorps commercial est complémentaire à la séquence équine, ce qui permet de faire une présélection. Une alternative est de mesurer l'ARN, par PCR, plutôt que la protéine, en créant des amorces spécifiques pour l'espèce à l'étude. Cependant, cette alternative a des limites quant à son interprétation, car un nombre impressionnant de modifications et de régulations post-transcriptionnelles peuvent subvenir.

À ces limites générales se rajoutent des contraintes inhérentes à chacune des expériences. Pour l'étude *in vivo*, il est impératif de se rappeler les difficultés de travailler avec le cheval, un animal imprévisible et potentiellement dangereux. Puisque l'étude n'était pas terminale, la quantité de tissus à prélever fut limitée, obligeant des choix sur les analyses à réaliser. Par exemple, des coupes congelées (immunofluorescence (IF)) plutôt que gardées en paraffine (immunohistochimie) furent choisies, car les études précédentes du laboratoire ont eu recours à des analyses immunohistochimique, mais aucune en IF. L'IF a l'avantage de permettre la réalisation d'un double marquage sur une même coupe. Par ailleurs, seuls certains gènes ou protéines ont pu être mesurés, au détriment d'autres qui pouvaient également représenter un intérêt.

L'homogénéisation des tissus pour les extractions présentait certains problèmes, vu l'aspect très fibreux de la peau. Afin d'obtenir une bonne extraction, l'homogénéisation devait être effectuée à une vitesse élevée, et ce, pendant longtemps sans toutefois que l'extrait accumule trop de chaleur qui pourrait nuire à l'intégrité des protéines ou de l'ARN. À l'inverse, en début de guérison (durant la phase inflammatoire), les échantillons prélevés dans les premières 48h étaient constitués du caillot de fibrine et de cellules inflammatoires, mais cette portion gélatineuse résistait mal à

l'homogénéisation mécanique par rapport à la peau intacte en périphérie. Il aurait sans doute été avantageux d'étudier des échantillons obtenus à diverses profondeurs de la plaie (Wilmink, van Weeren *et al.*, 1999b).

De plus, étant donné la pénurie de tissus, une extraction totale fut réalisée or, certaines protéines, tel le HIF1A, auraient nécessité une extraction nucléaire afin d'obtenir des concentrations plus élevées et ainsi, plus faciles à mesurer. De plus, la localisation nucléaire de HIF1A apporte une information supplémentaire, à savoir s'il a transloqué au noyau, une étape cruciale à son pouvoir de transcription.

Une limite majeure des échantillons est leur composition multicellulaire; les types cellulaires présents varient en quantité et en nature en fonction du stade de guérison. Initialement, dans la peau intacte, les kératinocytes et les fibroblastes prédominent; suivant un trauma le nombre de kératinocytes chute radicalement pour donner place à des cellules inflammatoires; par la suite, les fibroblastes et cellules endothéliales sont présents de façon marquée dans le tissu de granulation; finalement, en fin de guérison, un patron similaire à celui de la peau intacte est retrouvé. Toute cette évolution durant la guérison rend difficile l'interprétation des résultats, car les protéines ne sont pas exprimées également dans ces divers types cellulaires. Le meilleur exemple de cela, dans les études présentées, est l'expression constitutive du HIF1A dans les kératinocytes qui masque les possibles changements de son expression au niveau du derme lorsqu'il est mesuré par immunobuvardage de type western.

En ce qui concerne le choix du « loading control » pour l'immunobuvardage de type western, le GAPDH fut d'abord utilisé. Or, vu les nombreux types cellulaires et les changements dans leurs proportions, les bandes visualisées n'étaient pas régulières; la β -actine fut donc testée et retenue. Cependant, puisqu'en qRT-PCR le GAPDH et la β -actine donnaient des résultats similaires, le GAPDH fut privilégié (Turabelidze *et al.*, 2010).

Les expériences exécutées en IF ont exigé une mise au point importante. L'anticorps anti-HIF1A utilisé en immunobuvardage (sc-53546) donnait énormément de signaux indésirables; il fut donc remplacé par sc-10790. Le signal du CDKN1A étant imperceptible, une trousse en provenance d'Invitrogen fut utilisée pour observer un signal en utilisant la technique d'amplification de signal par la tyramide (Cho, Bae *et al.*, 2008).

Pour réaliser l'étude *in vitro*, il a fallu d'abord mettre au point la technique d'isolement de FDE. Dans un premier temps, la peau était morcelée puis déposée, côté derme, sur le pétri, tel que rapporté par Cochrane (Cochrane *et al.*, 1996). Cette technique a permis d'obtenir un nombre adéquat de fibroblastes corporels, par contre une infime quantité de fibroblastes furent recueillis depuis le membre. Dans le but d'améliorer le rendement de la manipulation, des extractions enzymatiques à l'aide de soit la collagénase, soit la trypsine, furent par la suite réalisées. La méthode à la collagénase donnait un rendement supérieur, malgré cela, pour obtenir un nombre suffisant de fibroblastes viables, les tissus devaient être très frais, bien dégagés de la couche graisseuse sous-jacente et préparés rapidement. Les extractions réalisées sur des tissus provenant de l'abattoir permettaient un nombre insuffisant de passages pour obtenir assez de fibroblastes pour l'ensemble des expérimentations prévues.

La culture en hypoxie exigeait le transport des fibroblastes vers la chambre hypoxique (à distance), ce qui les affectait légèrement (Annexe : Tableau III). Pour cette raison les comparaisons sont faites sur les taux de prolifération plutôt que sur les comptes cellulaires absolus. Une difficulté majeure rencontrée en culture dans la chambre hypoxique était le manque de stabilité des niveaux d'hypoxie. Comme il est rapporté par Jewell, seules 30 secondes de réoxygénation sont requises pour retrouver un niveau normal d'oxygénation (20% O₂) et une diminution de l'expression du HIF1A est déjà

perceptible à 4 minutes (Jewell, Kvietikova *et al.*, 2001). Conséquemment, les expériences en chambre hypoxique devaient être faites très rapidement pour qu'il y ait le moins de variation possible. C'est la raison qui a motivé le choix d'utiliser un agent mimétique de l'hypoxie (CoCl₂) pour réaliser les différentes mesures d'expression protéique. Les tests de prolifération ont, pour leur part, été réalisés en hypoxie physique, puisque les cellules devaient être étudiées à plus long terme (7 jours). Or le traitement au CoCl₂ ne peut être appliqué au-delà de trois ou quatre jours sans changement de milieu, ce qui perturbe grandement la prolifération cellulaire. Les mesures de migration cellulaire ont été écartées de l'étude en raison d'une standardisation complexe (largeur du scratch, prise de lecture, etc.). En effet, en l'absence d'une caméra en temps-réel, l'obtention de résultats constants en scratch-assay exige un grand nombre de pétris permettant un suivi temporel. En somme, la grande difficulté du volet *in vitro* fut l'obtention d'un nombre suffisant de fibroblastes pour que les expérimentations produisent des résultats atteignant le seuil de significativité.

4.5 Perspectives

Les résultats obtenus dans le premier article montrant que le HIF1A est constitutivement exprimé dans les kératinocytes ouvrent la porte à des études sur le mécanisme de stabilisation de la protéine et sur les mécanismes et les cascades de signalisation derrière son action sur l'homéostasie de l'épithélium. Des études futures permettraient de voir si la stabilisation oxygène-indépendante est réalisée par l'action des ROS via l'activation de la cascade MEK/ERK, tout comme il a été démontré chez d'autres espèces (Cho, Bae *et al.*, 2008).

Pour poursuivre dans le domaine de recherche sur l'implication de l'hypoxie dans le développement du TGE, il serait intéressant d'étudier de façon systématique l'expression protéique du HIF1A par le TGE. La mesure

de l'expression du HIF1A durant le développement et la croissance du bouton de chair est de mise, comme l'est la comparaison des niveaux de HIF1A entre son centre avec ceux de sa périphérie. Cette information permettrait de voir à quel moment et à quel endroit dans le TGE, un traitement visant l'inhibition du HIF1A serait le plus apte à être efficace. L'utilisation du HIF1A comme cible pharmacologique et/ou comme marqueur d'hypoxie pour l'étude du TGE est appropriée, car le TGE est composé principalement de fibroblastes et de cellules endothéliales, sans être épithélialisé. L'expression du HIF1A donnera plusieurs renseignements pertinents, par contre plusieurs autres protéines méritent également d'être étudiées. Parmi les protéines intéressantes figurent également le VEGF A, les MMPs et les TIMPs, le collagène de types I et III, le TGF- β 1, 2 et 3 et des protéines liées à l'apoptose. Le VEGF A est une protéine cruciale à l'angiogenèse en plus d'être régulée par le HIF1A (Lee, Bae *et al.*, 2004), donc elle devrait être fortement exprimée dans le TGE. Les MMPs et les TIMPs sont responsables de la régulation du remodelage de la matrice extracellulaire (Gill et Parks, 2008). Dans le contexte de maladie fibroproliférative, les MMPs sont souvent insuffisantes et, inversement, les TIMPs sont abondantes. En partie dû à la présence importante de fibroblastes synthétiques dont l'apoptose semble dérégulée, le collagène est copieux dans le TGE (Lepault, Céleste *et al.*, 2005). Par ailleurs, le TGF- β 1 est également une protéine pro-fibrotique, donc son expression devrait être augmentée, inversement, le TGF- β 3 est reconnu pour avoir une action anti-fibrotique (Theoret, Barber *et al.*, 2001)

Dans le domaine de la guérison tissulaire, plusieurs crèmes topiques contenant diverses substances (facteurs de croissance, inhibiteur, hormone, etc.) sont utilisées afin de favoriser la guérison (Dioufa *et al.*, 2010). L'étude de l'efficacité d'une crème topique ou d'une solution injectable, à laquelle serait inséré un inhibiteur pharmacologique de HIF1A (Giaccia *et al.*, 2003), pour contrôler l'apparition et/ou la résorption d'un TGE, serait d'un intérêt clinique (Kim *et al.*, 2009). Puisque les propriétaires de chevaux consultent le plus

souvent lorsque le bouton de chair est déjà présent, il est important d'étudier si un tel traitement pourrait agir efficacement sur le tissu de granulation mature et non uniquement sur la surface de la plaie suite à une résection, comme plusieurs thérapies actuelles.

Dans la poursuite du projet *in vitro*, la mise au point de co-cultures (kératinocyte/fibroblaste et cellule endothéliale/fibroblaste) permettrait d'étudier les communications intercellulaires dans diverses situations (condition d'hypoxie, scratch assay, etc.) (Lim *et al.*, 2002; Ghahary et Ghaffari, 2007; Oberringer, Meins *et al.*, 2007; Oberringer, Meins *et al.*, 2008). Les co-cultures permettent de se rapprocher légèrement des conditions *in vivo*, par le fait qu'un type cellulaire peut avoir une influence sur un second soit par contact direct ou par la synthèse et la sécrétion de protéines (facteur de croissance, etc.) qui auront une action paracrine. Parmi les traitements efficaces actuellement utilisés pour contrer la formation du TGE, il y a la greffe de peau (Theoret et Wilmink, 2008). La greffe permet une communication étroite entre les kératinocytes et les fibroblastes qui pourrait être partiellement mimée à l'intérieur d'une co-culture kératinocytes/fibroblastes.

De plus, il serait intéressant de mettre en culture des fibroblastes prélevés depuis le centre d'un TGE afin de vérifier si une fois la pathologie installée, les caractéristiques fonctionnelles des fibroblastes sont modifiées et si cela influence la synthèse matricielle, la prolifération et l'apoptose de ces fibroblastes par rapport aux fibroblastes issus de peau normale, comme il est démontré pour les fibroblastes en provenance de chéloïde humaine (Calderon *et al.*, 1996). Il serait également intéressant d'étudier le potentiel de l'échinomycine (inhibiteur du HIF1A) à ralentir la prolifération, la migration et la synthèse protéique pro-fibrotique des FDE provenant de peau normale et/ou de TGE cultivés en hypoxie afin d'évaluer la capacité thérapeutique de cet inhibiteur à agir sur la fibrose.

Finalement, une autre protéine souvent inculpée dans cette pathologie est le TGF- β . La fibrose est caractérisée par la relâche de TGF- β 1 et l'activation des fibroblastes qui ont pour conséquence l'augmentation de la synthèse de collagène et la diminution du remodelage matriciel (Kisseleva et Brenner, 2008). C'est d'ailleurs la raison pour laquelle l'usage des corticostéroïdes comme traitement pour le TGE est employé. Parmi les cibles des corticostéroïdes se retrouve le TGF- β 1, dont l'expression est diminuée par ceux-ci (Theoret et Wilmink, 2008). Son effet sur des FDE (cultivés en normoxie ou en hypoxie) ainsi que l'effet de son inhibition seraient potentiellement révélateurs. Par contre, l'une des problématiques de l'utilisation des corticostéroïdes est la non-spécificité de ceux-ci, l'étude de leur action devrait également être réalisée en co-culture.

En somme, afin d'obtenir de nouvelles avenues pour des cibles pharmacologiques possiblement efficaces, il est crucial de poursuivre ces études afin d'élucider les mécanismes régulant la prolifération cellulaire et la synthèse matricielle excessive caractérisant le bouton de chair équin.

CONCLUSIONS

Les expériences réalisées durant ce programme de doctorat avaient pour but de vérifier l'hypothèse suivante : chez le cheval, les complications de la guérison cutanée en lien avec le site anatomique (TGE au niveau des plaies du membre) sont associées à la présence d'une hypoxie tissulaire locale.

Le premier volet portant sur des échantillons prélevés à divers temps de la guérison a permis d'étudier l'épithélialisation, car la protéine HIF1A est exprimée en présence d'hypoxie dans la majorité des types cellulaires, mais également de façon constitutive par les kératinocytes en condition de normoxie. L'étude *in vivo* a démontré que le HIF1A dans les kératinocytes servait à l'homéostasie de l'épithélium. Il régule l'expression du CDKN1A qui permet l'arrêt du cycle cellulaire en G1 lorsque la densité cellulaire appropriée est atteinte. En somme, les diverses expériences réalisées dans le volet *in vivo* ont permis d'identifier un rôle important du HIF1A dans les kératinocytes équins. Afin de vérifier l'hypothèse qu'il y a présence d'hypoxie locale au niveau des plaies appendiculaires et que ceci peut être un facteur important dans le développement du TGE (Figure 19), de nouvelles études devront être réalisées soit sur des biopsies de centre de plaie, sur des TGE ou à l'aide d'un autre marqueur d'hypoxie.

Le second volet portant sur des FDE cultivés en présence d'un mimétique de l'hypoxie (CoCl_2) a démontré que l'hypoxie favorise le développement de fibrose via l'entremise d'une expression accrue du collagène de type 1 et d'une pénurie de MMP 2. En plus de l'effet sur la synthèse protéique, l'hypoxie accélère le taux de prolifération des fibroblastes. Les diverses expériences exécutées *in vitro* ont également permis de conclure que les FDE en provenance du corps ne se comportent pas différemment de ceux provenant du membre. Les différences rencontrées semblent plutôt

gouvernées par des facteurs extrinsèques. Ces observations permettent d'appuyer l'hypothèse du projet en suggérant que l'hypoxie est une condition environnementale qui favorise la formation d'un TGE au niveau des membres chez le cheval (Figure 19).

En conclusion, cette étude suggère que l'hypoxie tissulaire locale rapportée antérieurement (Lepault, Céleste *et al.*, 2005; Dubuc, Lepault *et al.*, 2006; Céleste, Deschene *et al.*, 2011; Céleste, Deschene *et al.*, In press) peut être un facteur important qui favorise le développement du TGE sur les plaies appendiculaires du cheval. La présence d'hypoxie relative au niveau des plaies appendiculaires en comparaison aux plaies corporelles explique la prévalence du TGE à ce site, étant donné que le comportement du FDE ne varie pas en fonction de sa provenance anatomique.

Les résultats obtenus permettent d'élucider une partie de la cascade d'événements qui ont lieu durant la formation du TGE. Afin de comprendre les interactions intercellulaires, l'étude du mécanisme de réponse à l'hypoxie devrait être au centre de futures études faites directement sur des TGE, sur diverses populations de FDE et sur des co-cultures. L'étude approfondie des mécanismes moléculaires pourrait mener à une meilleure compréhension de cette pathologie, et, par la suite, à l'élaboration d'un traitement efficace ou même à une méthode de prévention.

BIBLIOGRAPHIE

- AbateAcne.com. «Collagen Synthesis.» Retrieved october, 31, 2011.
- Abdi, H. (2007). Bonferroni et Šidák corrections for multiple comparisons. Encyclopedia of Measurement and Statistics. N. J. Salkind. Thousand Oaks, Sage.
- Akasaka, Y., Ishikawa, Y., *et al.* (2000). «Enhanced expression of caspase-3 in hypertrophic scars and keloid: induction of caspase-3 and apoptosis in keloid fibroblasts in vitro.» Lab Invest **80**(3): 345-57.
- Albina, J. E., Mastrofrancesco, B., *et al.* (2001). «HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1alpha induction in primary inflammatory cells by TNF-alpha.» Am J Physiol Cell Physiol **281**(6): C1971-7.
- Allen, D. B., Maguire, J. J., *et al.* (1997). «Wound hypoxia and acidosis limit neutrophil bacterial killing mechanisms.» Arch Surg **132**(9): 991-6.
- Atiyeh, B. S., Costagliola, M., *et al.* (2005). «Keloid or hypertrophic scar: the controversy: review of the literature.» Ann Plast Surg **54**(6): 676-80.
- Berra, E., Ginouves, A., *et al.* (2006). «The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling.» EMBO Rep **7**(1): 41-5.
- Berry, D. B., 2nd and Sullins, K. E. (2003). «Effects of topical application of antimicrobials and bandaging on healing and granulation tissue formation in wounds of the distal aspect of the limbs in horses.» Am J Vet Res **64**(1): 88-92.
- Bertone, A. L. (1989). «Management of exuberant granulation tissue.» Vet Clin North Am Equine Pract **5**(3): 551-62.
- Boraldi, F., Annovi, G., *et al.* (2007). «Hypoxia influences the cellular cross-talk of human dermal fibroblasts. A proteomic approach.» Biochim Biophys Acta **1774**(11): 1402-13.

- Botusan, I. R., Sunkari, V. G., *et al.* (2008). «Stabilization of HIF-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice.» Proc Natl Acad Sci U S A **105**(49): 19426-31.
- Bragard, C., Goubau, P., *et al.* (2011-06-23). «Initiation à la virologie.» Retrieved 2011-07-25, from http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/content.php?page=interaction.
- Brem, H. and Tomic-Canic, M. (2007). «Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes.» J Clin Invest **117**(5): 1219-22.
- Broughton, G., 2nd, Janis, J. E., *et al.* (2006a). «The basic science of wound healing.» Plast Reconstr Surg **117**(7 Suppl): 12S-34S.
- Broughton, G., 2nd, Janis, J. E., *et al.* (2006b). «Wound healing: an overview.» Plast Reconstr Surg **117**(7 Suppl): 1e-S-32e-S.
- Brune, B. and Zhou, J. (2007). «Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling.» Cardiovasc Res **75**(2): 275-82.
- Bullard, K. M., Longaker, M. T., *et al.* (2003). «Fetal wound healing: current biology.» World J Surg **27**(1): 54-61.
- Calderon, M., Lawrence, W. T., *et al.* (1996). «Increased proliferation in keloid fibroblasts wounded in vitro.» J Surg Res **61**(2): 343-7.
- Céleste, C., Deschene, K., *et al.* (In press). «Kinetics of blood flow and anatomical-site differences in tissue perfusion during wound healing in an equine model of cutaneous fibroproliferative disorder.» Vet Surg.
- Céleste, C. J., Deschene, K., *et al.* (2011). «Regional differences in wound oxygenation during normal healing in an equine model of cutaneous fibroproliferative disorder.» Wound Repair Regen **19**(1): 89-97.
- Chachami, G., Paraskeva, E., *et al.* (2009). «Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha into the nucleus involves importins 4 and 7.» Biochem Biophys Res Commun **390**(2): 235-40.
- Chang, H. Y., Chi, J. T., *et al.* (2002). «Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts.» Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 12877-82.

- Chen, E. Y., Mazure, N. M., *et al.* (2001). «Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation.» Cancer Res **61**(6): 2429-33.
- Chen, S., Jiang, X., *et al.* (2010). «Differentiating keloids from normal and hypertrophic scar Based on multiphoton microscopy.» Laser Physics **20**(4): 900-903.
- Cho, Y. S., Bae, J. M., *et al.* (2008). «HIF-1alpha controls keratinocyte proliferation by up-regulating p21(WAF1/Cip1).» Biochim Biophys Acta **1783**(2): 323-33.
- Clark, R. A. F. (1996). The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. New York, Plenum.
- Cochrane, C. A., Freeman, K. L., *et al.* (1996). «Effect of growth factors on the characteristics of cells associated with equine wound healing and sarcoid formation.» Wound Repair Regen **4**(1): 58-65.
- Corral, C. J., Siddiqui, A., *et al.* (1999). «Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing.» Arch Surg **134**(2): 200-5.
- De Felice, B., Garbi, C., *et al.* (2009). «Differential apoptosis markers in human keloids and hypertrophic scars fibroblasts.» Mol Cell Biochem **327**(1-2): 191-201.
- De Martin, I. and Theoret, C. L. (2004). «Spatial and temporal expression of types I and II receptors for transforming growth factor beta in normal equine skin and dermal wounds.» Vet Surg **33**(1): 70-6.
- Dehne, N. and Brune, B. (2009). «HIF-1 in the inflammatory microenvironment.» Exp Cell Res **315**(11): 1791-7.
- Deschene, K., Celeste, C., *et al.* (2011). «Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in keratinocytes during the repair of skin wounds in horses.» Wound Repair Regen **19**(2): 250-9.

- Deschene, K., Celeste, C., *et al.* (In press). «Hypoxia regulates the expression of extracellular matrix associated proteins in equine dermal fibroblasts via HIF1.» J Dermatol Sci.
- Desmouliere, A., Redard, M., *et al.* (1995). «Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar.» Am J Pathol **146**(1): 56-66.
- Diegelmann, R. F. and Evans, M. C. (2004). «Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing.» Front Biosci **9**: 283-9.
- Dioufa, N., Schally, A. V., *et al.* (2010). «Acceleration of wound healing by growth hormone-releasing hormone and its agonists.» Proc Natl Acad Sci U S A **107**(43): 18611-5.
- Distler, J. H., Jungel, A., *et al.* (2007). «Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis.» Arthritis Rheum **56**(12): 4203-15.
- Distler, J. H., Wenger, R. H., *et al.* (2004). «Physiologic responses to hypoxia and implications for hypoxia-inducible factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.» Arthritis Rheum **50**(1): 10-23.
- Droge, W. (2002). «Free radicals in the physiological control of cell function.» Physiol Rev **82**(1): 47-95.
- Dubuc, V., Lepault, E., *et al.* (2006). «Endothelial cell hypertrophy is associated with microvascular occlusion in horse wounds.» Can J Vet Res **70**(3): 206-10.
- Ducharme-Desjarlais, M., Celeste, C. J., *et al.* (2005). «Effect of a silicone-containing dressing on exuberant granulation tissue formation and wound repair in horses.» Am J Vet Res **66**(7): 1133-9.
- Elson, D. A., Ryan, H. E., *et al.* (2000). «Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1 α and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing.» Cancer Res **60**(21): 6189-95.
- English, R. S. and Shenefelt, P. D. (1999). «Keloids and hypertrophic scars.» Dermatol Surg **25**(8): 631-8.

- Falanga, V., Martin, T. A., *et al.* (1993). «Low oxygen tension increases mRNA levels of alpha 1 (I) procollagen in human dermal fibroblasts.» J Cell Physiol **157**(2): 408-12.
- Falanga, V., Qian, S. W., *et al.* (1991). «Hypoxia upregulates the synthesis of TGF-beta 1 by human dermal fibroblasts.» J Invest Dermatol **97**(4): 634-7.
- Fan, R. H., Chen, P. S., *et al.* (2007). «[Hypoxia induced by CoCl₂ influencing the expression and the activity of matrix metalloproteinase-2 in rat hepatic stellate cells].» Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi **15**(9): 654-7.
- Folkman, J. and Shing, Y. (1992). «Angiogenesis.» J Biol Chem **267**(16): 10931-4.
- Frank, S. M. (2001). «Focus on: perioperative hypothermia Consequences of hypothermia.» Curr Anaesth Crit Care **12**: 79-86.
- Funayama, E., Chodon, T., *et al.* (2003). «Keratinocytes promote proliferation and inhibit apoptosis of the underlying fibroblasts: an important role in the pathogenesis of keloid.» J Invest Dermatol **121**(6): 1326-31.
- Gastman, B. R. (2001). «Apoptosis and its clinical impact.» Head Neck **23**(5): 409-25.
- Gauldie, J. (2007). «Inflammation and the aging process: devil or angel.» Nutr Rev **65**(12 Pt 2): S167-9.
- Ghahary, A. and Ghaffari, A. (2007). «Role of keratinocyte-fibroblast cross-talk in development of hypertrophic scar.» Wound Repair Regen **15 Suppl 1**: S46-53.
- Giaccia, A., Siim, B. G., *et al.* (2003). «HIF-1 as a target for drug development.» Nat Rev Drug Discov **2**(10): 803-11.
- Gill, S. E. and Parks, W. C. (2008). «Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing.» Int J Biochem Cell Biol **40**(6-7): 1334-47.
- Gilliver, S. C. and Ashcroft, G. S. (2007). «Sex steroids and cutaneous wound healing: the contrasting influences of estrogens and androgens.» Climacteric **10**(4): 276-88.

- Gordillo, G. M. and Sen, C. K. (2003). «Revisiting the essential role of oxygen in wound healing.» Am J Surg **186**(3): 259-63.
- Goren, I., Allmann, N., *et al.* (2009). «A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes.» Am J Pathol **175**(1): 132-47.
- Gottrup, F. (2004). «Oxygen in wound healing and infection.» World J Surg **28**(3): 312-5.
- Greenhalgh, D. G. (1998). «The role of apoptosis in wound healing.» Int J Biochem Cell Biol **30**(9): 1019-30.
- Greijer, A. E., van der Groep, P., *et al.* (2005). «Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1).» J Pathol **206**(3): 291-304.
- Grigsby, P. W., Malyapa, R. S., *et al.* (2007). «Comparison of molecular markers of hypoxia and imaging with (60)Cu-ATSM in cancer of the uterine cervix.» Mol Imaging Biol **9**(5): 278-83.
- Guo, S. and Dipietro, L. A. (2010). «Factors affecting wound healing.» J Dent Res **89**(3): 219-29.
- Gurtner, G. C., Werner, S., *et al.* (2008). «Wound repair and regeneration.» Nature **453**(7193): 314-21.
- Hinz, B., Phan, S. H., *et al.* (2007). «The myofibroblast: one function, multiple origins.» Am J Pathol **170**(6): 1807-16.
- Holder, T. E., Schumacher, J., *et al.* (2008). «Effects of hyperbaric oxygen on full-thickness meshed sheet skin grafts applied to fresh and granulating wounds in horses.» Am J Vet Res **69**(1): 144-7.
- Imaizumi, R., Akasaka, Y., *et al.* (2009). «Promoted activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 in keloid fibroblasts and increased expression of MMP-2 in collagen bundle regions: implications for mechanisms of keloid progression.» Histopathology **54**(6): 722-30.

- Jacobs, K. A., Leach, D. H., *et al.* (1984). «Comparative aspects of healing of excisional wound on the leg and body of horses.» Vet Surg **13**(2): 83-90.
- Jewell, U. R., Kvietikova, I., *et al.* (2001). «Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous.» Faseb J **15**(7): 1312-4.
- Kasper, L. H., Boussouar, F., *et al.* (2005). «Two transactivation mechanisms cooperate for the bulk of HIF-1-responsive gene expression.» Embo J **24**(22): 3846-58.
- Kenneth, N. S. and Rocha, S. (2008). «Regulation of gene expression by hypoxia.» Biochem J **414**(1): 19-29.
- Khanna, S., Roy, S., *et al.* (2006). «Oxygen-sensitive reset of hypoxia-inducible factor transactivation response: prolyl hydroxylases tune the biological normoxic set point.» Free Radic Biol Med **40**(12): 2147-54.
- Kim, J., Bagchi, I. C., *et al.* (2009). «Signaling by hypoxia-inducible factors is critical for ovulation in mice.» Endocrinology **150**(7): 3392-400.
- Kischer, C. W. (1984). «Comparative ultrastructure of hypertrophic scars and keloids.» Scan Electron Microsc(Pt 1): 423-31.
- Kischer, C. W. (1992). «The microvessels in hypertrophic scars, keloids and related lesions: a review.» J Submicrosc Cytol Pathol **24**(2): 281-96.
- Kisseleva, T. and Brenner, D. A. (2008). «Mechanisms of fibrogenesis.» Exp Biol Med (Maywood) **233**(2): 109-22.
- Knottenbelt, D. C. (1997). «Equine wound management: are there significant differences in healing at different site on the body?» Vet Dermatol **8**: 273-90.
- Knottenbelt, D. C. (2003). Basic wound management. Handbook of Equine Wound Management. D. C. Knottenbelt. London, Saunders: 54-73.
- Koshiji, M., Kageyama, Y., *et al.* (2004). «HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc.» Embo J **23**(9): 1949-56.
- Ladin, D. A., Hou, Z., *et al.* (1998). «p53 and apoptosis alterations in keloids and keloid fibroblasts.» Wound Repair Regen **6**(1): 28-37.

- Lando, D., Peet, D. J., *et al.* (2002). «FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor.» Genes Dev **16**(12): 1466-71.
- Laurent, A., Mistretta, F., *et al.* (2007). «Echographic measurement of skin thickness in adults by high frequency ultrasound to assess the appropriate microneedle length for intradermal delivery of vaccines.» Vaccine **25**(34): 6423-30.
- Lauzier, M. C., Michaud, M. D., *et al.* (2006). «[HIF-1 activation during tumor progression: implications and consequences].» Bull Cancer **93**(4): 349-56.
- Lee, H. B., Yu, M. R., *et al.* (2003). «Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy.» J Am Soc Nephrol **14**(8 Suppl 3): S241-5.
- Lee, J. W., Bae, S. H., *et al.* (2004). «Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions.» Exp Mol Med **36**(1): 1-12.
- Lee, S. H., Wolf, P. L., *et al.* (2000). «Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction.» N Engl J Med **342**(9): 626-33.
- Lepault, E., Céleste, C., *et al.* (2005). «Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse.» Wound Repair Regen **13**(5): 520-9.
- Li, J., Chen, J., *et al.* (2007a). «Pathophysiology of acute wound healing.» Clin Dermatol **25**(1): 9-18.
- Li, J., Zhang, Y. P., *et al.* (2003). «Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix.» Microsc Res Tech **60**(1): 107-14.
- Li, W., Li, Y., *et al.* (2007b). «Extracellular heat shock protein-90alpha: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing.» Embo J **26**(5): 1221-33.
- Liekens, S., De Clercq, E., *et al.* (2001). «Angiogenesis: regulators and clinical applications.» Biochem Pharmacol **61**(3): 253-70.

- Lim, I. J., Phan, T. T., *et al.* (2002). «Fibroblasts cocultured with keloid keratinocytes: normal fibroblasts secrete collagen in a keloidlike manner.» *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(1): C212-22.
- Liu, L., Marti, G. P., *et al.* (2008). «Age-dependent impairment of HIF-1alpha expression in diabetic mice: Correction with electroporation-facilitated gene therapy increases wound healing, angiogenesis, and circulating angiogenic cells.» *J Cell Physiol*.
- Lum, H. and Roebuck, K. A. (2001). «Oxidant stress and endothelial cell dysfunction.» *Am J Physiol Cell Physiol* **280**(4): C719-41.
- Luo, S., Benathan, M., *et al.* (2001). «Abnormal balance between proliferation and apoptotic cell death in fibroblasts derived from keloid lesions.» *Plast Reconstr Surg* **107**(1): 87-96.
- Lysiak, J. J., Kirby, J. L., *et al.* (2009). «Hypoxia-inducible factor-1alpha is constitutively expressed in murine Leydig cells and regulates 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promoter activity.» *J Androl* **30**(2): 146-56.
- Mace, K. A., Yu, D. H., *et al.* (2007). «Sustained expression of Hif-1alpha in the diabetic environment promotes angiogenesis and cutaneous wound repair.» *Wound Repair Regen* **15**(5): 636-45.
- Martin, P., D'Souza, D., *et al.* (2003). «Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells.» *Curr Biol* **13**(13): 1122-8.
- Mathieu, D. and Mani, R. (2007). «A review of the clinical significance of tissue hypoxia measurements in lower extremity wound management.» *Int J Low Extrem Wounds* **6**(4): 273-83.
- Medina-Torres, C. E., Mason, S. L., *et al.* (2011). «Hypoxia and a hypoxia mimetic up-regulate matrix metalloproteinase 2 and 9 in equine laminar keratinocytes.» *Vet J*.
- Medina, A., Scott, P. G., *et al.* (2005). «Pathophysiology of chronic nonhealing wounds.» *J Burn Care Rehabil* **26**(4): 306-19.

- Menke, N. B., Ward, K. R., *et al.* (2007). «Impaired wound healing.» Clin Dermatol **25**(1): 19-25.
- Messadi, D. V., Doung, H. S., *et al.* (2004). «Activation of NFkappaB signal pathways in keloid fibroblasts.» Arch Dermatol Res **296**(3): 125-33.
- Miller, C. B., Wilson, D. A., *et al.* (2000). «Growth characteristics of fibroblasts isolated from the trunk and distal aspect of the limb of horses and ponies.» Vet Surg **29**(1): 1-7.
- Mirza, R., DiPietro, L. A., *et al.* (2009). «Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice.» Am J Pathol **175**(6): 2454-62.
- Mogford, J. E., Tawil, N., *et al.* (2002). «Effect of age and hypoxia on TGFbeta1 receptor expression and signal transduction in human dermal fibroblasts: impact on cell migration.» J Cell Physiol **190**(2): 259-65.
- Mollenhauer, J. and Bayreuther, K. (1986). «Donor-age-related changes in the morphology, growth potential, and collagen biosynthesis in rat fibroblast subpopulations in vitro.» Differentiation **32**(2): 165-72.
- Moulin, V., Larochelle, S., *et al.* (2004). «Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblasts have differential responses to apoptotic inducers.» J Cell Physiol **198**(3): 350-8.
- Moulin, Y. (2001). «Comprendre le processus de cicatrisation.» Infirm Que **9**(1): 37-40.
- Niessen, F. B., Spauwen, P. H., *et al.* (1999). «On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review.» Plast Reconstr Surg **104**(5): 1435-58.
- Norman, J. T., Clark, I. M., *et al.* (2000). «Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts.» Kidney Int **58**(6): 2351-66.
- O'Toole, E. A., Goel, M., *et al.* (1996). «Hydrogen peroxide inhibits human keratinocyte migration.» Dermatol Surg **22**(6): 525-9.
- O'Toole, E. A., Marinkovich, M. P., *et al.* (1997). «Hypoxia increases human keratinocyte motility on connective tissue.» J Clin Invest **100**(11): 2881-91.

- Oberringer, M., Meins, C., *et al.* (2007). «A new in vitro wound model based on the co-culture of human dermal microvascular endothelial cells and human dermal fibroblasts.» Biol Cell **99**(4): 197-207.
- Oberringer, M., Meins, C., *et al.* (2008). «In vitro wounding: effects of hypoxia and transforming growth factor beta1 on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model.» J Mol Histol **39**(1): 37-47.
- Ong, C. T., Khoo, Y. T., *et al.* (2007). «Epithelial-mesenchymal interactions in keloid pathogenesis modulate vascular endothelial growth factor expression and secretion.» J Pathol **211**(1): 95-108.
- Palmer, L. A., Gaston, B., *et al.* (2000). «Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 expression and activity: redox-dependent effect of nitrogen oxides.» Mol Pharmacol **58**(6): 1197-203.
- Perkins, N. R., Reid, S. W., *et al.* (2005). «Profiling the New Zealand Thoroughbred racing industry. 2. Conditions interfering with training and racing.» N Z Vet J **53**(1): 69-76.
- Peyssonnaud, C., Boutin, A. T., *et al.* (2008). «Critical role of HIF-1alpha in keratinocyte defense against bacterial infection.» J Invest Dermatol **128**(8): 1964-8.
- Piret, J. P., Mottet, D., *et al.* (2002). «Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein?» Biochem Pharmacol **64**(5-6): 889-92.
- Pouyssegur, J., Dayan, F., *et al.* (2006). «Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression.» Nature **441**(7092): 437-43.
- Rai, N. K., Tripathi, K., *et al.* (2005). «Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing.» Int J Low Extrem Wounds **4**(3): 138-44.
- Rodriguez, P. G., Felix, F. N., *et al.* (2008). «The role of oxygen in wound healing: a review of the literature.» Dermatol Surg **34**(9): 1159-69.
- Rotmans, J. (2011). "The new frontier: growing large vessels as «auto-implants»." from <http://www.cardiovasculairegeneeskunde.nl/the-new-frontier-growing-large-vessels-as-auto-implants>.

- Roy, S., Khanna, S., *et al.* (2003). «Oxygen sensing by primary cardiac fibroblasts: a key role of p21(Waf1/Cip1/Sdi1).» Circ Res **92**(3): 264-71.
- Sadick, H., Herberger, A., *et al.* (2008). «TGF-beta1 antisense therapy modulates expression of matrix metalloproteinases in keloid-derived fibroblasts.» Int J Mol Med **22**(1): 55-60.
- Sarrazy, V., Billet, F., *et al.* (2011). «Mechanisms of pathological scarring: Role of myofibroblasts and current developments.» Wound Repair Regen **19 Suppl 1**: s10-5.
- Sayah, D. N., Soo, C., *et al.* (1999). «Downregulation of apoptosis-related genes in keloid tissues.» J Surg Res **87**(2): 209-16.
- Schreml, S., Szeimies, R. M., *et al.* (2010). «Oxygen in acute and chronic wound healing.» Br J Dermatol **163**(2): 257-68.
- Schwartz, A. J., Wilson, D. A., *et al.* (2002). «Factors regulating collagen synthesis and degradation during second-intention healing of wounds in the thoracic region and the distal aspect of the forelimb of horses.» Am J Vet Res **63**(11): 1564-70.
- Semenza, G. L. (2003). «Targeting HIF-1 for cancer therapy.» Nat Rev Cancer **3**(10): 721-32.
- Semenza, G. L. and Wang, G. L. (1992). «A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation.» Mol Cell Biol **12**(12): 5447-54.
- Sempowski, G. D., Borrello, M. A., *et al.* (1995). «Fibroblast heterogeneity in the healing wound.» Wound Repair Regen **3**(2): 120-31.
- Sen, C. K. (2009). «Wound healing essentials: let there be oxygen.» Wound Repair Regen **17**(1): 1-18.
- Sen, C. K. and Roy, S. (2010). «Oxygenation state as a driver of myofibroblast differentiation and wound contraction: hypoxia impairs wound closure.» J Invest Dermatol **130**(12): 2701-3.

- Siddiqui, A., Galiano, R. D., *et al.* (1996). «Differential effects of oxygen on human dermal fibroblasts: acute versus chronic hypoxia.» Wound Repair Regen **4**(2): 211-8.
- Singer, A. J. and Clark, R. A. (1999). «Cutaneous wound healing.» N Engl J Med **341**(10): 738-46.
- Spence, V. A. and Walker, W. F. (1976). «Measurement of oxygen tension in human skin.» Med Biol Eng **14**(2): 159-65.
- Stashak, T. S. (1991). Principles of wound healing. Equin Wound Management. T. S. Stashak. Philadelphia, Lea and Febiger: 11.
- Stramer, B. M., Mori, R., *et al.* (2007). «The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair.» J Invest Dermatol **127**(5): 1009-17.
- Tandara, A. A. and Mustoe, T. A. (2004). «Oxygen in wound healing--more than a nutrient.» World J Surg **28**(3): 294-300.
- Taub, R. (2004). «Liver regeneration: from myth to mechanism.» Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 836-47.
- Teofoli, P., Barduagni, S., *et al.* (1999). «Expression of Bcl-2, p53, c-jun and c-fos protooncogenes in keloids and hypertrophic scars.» J Dermatol Sci **22**(1): 31-7.
- Thackham, J. A., McElwain, D. L., *et al.* (2008). «The use of hyperbaric oxygen therapy to treat chronic wounds: A review.» Wound Repair Regen **16**(3): 321-30.
- Theoret, C. L. (2005). «The pathophysiology of wound repair.» Vet Clin North Am Equine Pract **21**(1): 1-13.
- Theoret, C. L. (2006). Wound Repair and Specific Tissue Reaction to Injury. Equine Surgery. Saunders. Philadelphia: 44-62.
- Theoret, C. L., Barber, S. M., *et al.* (2001). «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 **30**(3): 269-77.

- Theoret, C. L., Barber, S. M., *et al.* (2002). «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 **31**(3): 266-73.
- Theoret, C. L. and Wilmink, J. M. (2008). Chapter 8.3 Treatment of exuberant granulation tissue. Equine Wound Management. T. S. Stashak and C. L. Theoret. Ames, Willey-Blackwell: 445-463.
- Tizard, I. R. (2004). Veterinary Immunology : An Introduction. Philadelphia, Saunders.
- Toriseva, M. and Kahari, V. M. (2009). «Proteinases in cutaneous wound healing.» Cell Mol Life Sci **66**(2): 203-24.
- Turabelidze, A., Guo, S., *et al.* (2010). «Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model.» Wound Repair Regen **18**(5): 460-6.
- Turck, C. W., Dohlman, J. G., *et al.* (1987). «Immunological mediators of wound healing and fibrosis.» J Cell Physiol Suppl **Suppl 5**: 89-93.
- van den Boom, R., Wilmink, J. M., *et al.* (2002). «Transforming growth factor-beta levels during second-intention healing are related to the different course of wound contraction in horses and ponies.» Wound Repair Regen **10**(3): 188-94.
- Vincent, A. S., Phan, T. T., *et al.* (2008). «Human skin keloid fibroblasts display bioenergetics of cancer cells.» J Invest Dermatol **128**(3): 702-9.
- Vlaminck, B., Toffoli, S., *et al.* (2007). «Dual effect of echinomycin on hypoxia-inducible factor-1 activity under normoxic and hypoxic conditions.» Febs J **274**(21): 5533-42.
- Voet, D. and Voet, J. G. (2002). Biochimie. Paris, De Boeck Université.
- Wade, C. M., Giulotto, E., *et al.* (2009). «Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse.» Science **326**(5954): 865-7.

- Weidemann, A. and Johnson, R. S. (2008). «Biology of HIF-1alpha.» Cell Death Differ **15**(4): 621-7.
- Wenger, R. H. (2002). «Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression.» Faseb J **16**(10): 1151-62.
- Werner, S., Krieg, T., *et al.* (2007). «Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing.» J Invest Dermatol **127**(5): 998-1008.
- Westgate, S. J., Percival, S. L., *et al.* (2011). «Microbiology of equine wounds and evidence of bacterial biofilms.» Vet Microbiol **150**(1-2): 152-9.
- Wilmink, J. M. (2008). Differences in Wound Healing between Horses and Ponies. Equine Wound Management. T. S. Stashak and C. L. Theoret. Ames, Wiley-Blackwell: 29-46.
- Wilmink, J. M., Nederbragt, H., *et al.* (2001). «Differences in wound contraction between horses and ponies: the in vitro contraction capacity of fibroblasts.» Equine Vet J **33**(5): 499-505.
- Wilmink, J. M., Stolk, P. W., *et al.* (1999a). «Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopic aspects.» Equine Vet J **31**(1): 53-60.
- Wilmink, J. M., van Herten, J., *et al.* (2002). «Retrospective study of primary intention healing and sequestrum formation in horses compared to ponies under clinical circumstances.» Equine Vet J **34**(3): 270-3.
- Wilmink, J. M. and van Weeren, P. R. (2005). «Second-intention repair in the horse and pony and management of exuberant granulation tissue.» Vet Clin North Am Equine Pract **21**(1): 15-32.
- Wilmink, J. M., van Weeren, P. R., *et al.* (1999b). «Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects.» Equine Vet J **31**(1): 61-7.
- Wilmink, J. M., Veenman, J. N., *et al.* (2003). «Differences in polymorphonucleocyte function and local inflammatory response between horses and ponies.» Equine Vet J **35**(6): 561-9.

- Witte, M. B. and Barbul, A. (1997). «General principles of wound healing.» Surg Clin North Am **77**(3): 509-28.
- Wong, D., Buechner-Maxwell, V, Manning, T. (June 2005). «Equin Skin: Structure, Immunologic Function, and Methods of Diagnosing Disease.» Compendium: 463-473.
- Xing, D., Liu, L., *et al.* (2011). «Hypoxia and hypoxia-inducible factor in the burn wound.» Wound Repair Regen **19**(2): 205-13.
- Zhang, Q., Wu, Y., *et al.* (2003). «Mechanisms of hypoxic regulation of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression in keloid fibroblasts.» J Invest Dermatol **121**(5): 1005-12.
- Zhong, H., De Marzo, A. M., *et al.* (1999). «Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases.» Cancer Res **59**(22): 5830-5.

ANNEXE : RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Tableau III : Nombre de cellules dans les diverses conditions au temps initial, c'est-à-dire 24h après l'ensemencement

Condition	Nbre de cellules (moyenne) 10 ⁴
Ensemencé (T-24h)	6,5
FDE membre sans déplacement	7,1 ± 0,8
FDE membre avec déplacement	4,0 ± 0,9
FDE corps sans déplacement	3,6 ± 0,3
FDE corps avec déplacement	3,1 ± ,6

