

Université de Montréal

**Développement d'une méthode informatique appliquée à la quantification  
immunohistochimique du mastocyte et du macrophage M1 et M2 lors de la guérison  
cutanée chez le cheval**

**par Valérie Dubuc**

**Département de biomédecine vétérinaire  
Faculté de médecine vétérinaire**

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)  
en sciences vétérinaires option biomédecine

Août 2018

© Valérie Dubuc, 2018

## Résumé

Le but de cette étude randomisée et contrôlée était de développer une méthode quantitative fiable et accessible en immunohistochimie, puis de quantifier le patron temporel et anatomique des mastocytes et des macrophages M1 et M2 au cours de la guérison cutanée équine. Deux plaies de pleine épaisseur ont été créées sur le métacarpe et l'hémithorax chez quatre juments (n = 4). Des prélèvements ont été réalisés aux jours 2, 7, 14 et 21 et ces spécimens ont été archivés (n = 28). Une immunohistochimie a été effectuée pour étudier les mastocytes (CD117), puis les macrophages (pan : CD14, M1 : CD86 et M2 : CD204). Une méthode de quantification ImageJ a été développée et comparée à un comptage manuel sur 6 spécimens. Les 22 autres ont ensuite été quantifiés avec la méthode informatique. Pour la validation de la méthode (CD117), un coefficient de corrélation intraclass intra-, interopérateur et comparé avec le comptage manuel de 0,90 (p < 0,01), 0,69 (p < 0,01) et 0,67 (p < 0,05) ont été trouvés. Aucune différence significative du nombre de mastocytes en relation avec la localisation anatomique (thorax vs membre) et le temps de guérison n'a été trouvée. La morphologie des macrophages M2 était fusiforme ou ronde et celle des macrophages généraux était ronde, « fried egg » ou dendritique. La méthode quantitative développée est fiable, reproductible, accessible et gratuite. De futures études devraient, à l'aide d'anticorps spécifiques, caractériser davantage l'implication du mastocyte et du macrophage dans la guérison cutanée et l'inflammation chronique chez le cheval.

**Mots-clés :** cheval, immunohistochimie, quantification, macrophages M1 et M2, mastocytes, peau

## **Abstract**

The goal of this randomized and controlled study was to develop a reliable and accessible quantification method for immunohistochemically-stained tissues and to quantify the temporal and anatomical pattern of mast cells and M1/M2 macrophages during equine wound healing. Two full-thickness skin wounds were created on each distal forelimb and hemithorax, respectively, of four mixed breed mares (n= 4). Samples were taken at days 2, 7, 14 and 21 post wounding and stored (n = 28). Immunohistochemistry was performed to study mast cell (CD117) distribution and double immunohistochemistry was performed with M1 (CD86), M2 (CD204) and pan macrophage (CD14) markers. An ImageJ quantification method was developed and compared with a traditional manual counting on 6 specimens. Stained cells on the other 22 samples were then quantified with the computer-based method. For the validation of the method, an intra- and interoperator Intraclass correlation coefficient (ICC) of 0.90 ( $p < 0.01$ ) and 0.69 ( $p < 0.01$ ) were found. An ICC value of 0.67 ( $p < 0.05$ ) was found between the ImageJ method and manual counting. No significant difference of mast cell numbers was observed in relation to anatomical location (thorax vs limb) or time of healing. M2 macrophages showed a spindle or rounded shape while general macrophages showed a round, fried-egg or dendritic morphology. The quantification method developed is reliable, reproducible, available and free. Future studies should, with equine-specific antibodies, further characterize mast cell and macrophage implication in wound healing and chronically-inflamed limb wounds of horses.

**Keywords** : equine, immunohistochemistry, quantification, M1 and M2 macrophages, mast cells, skin

# Table des matières

Résumé .....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des sigles et des abréviations .....	xii
Remerciements.....	xv
Introduction.....	1
Revue de littérature .....	3
1.0 Inflammation.....	3
1.1 Définition .....	3
1.2 Techniques utilisées pour étudier l'inflammation dans le contexte de la guérison cutanée .....	3
1.2.1 Aspect macroscopique de la plaie et des tissus environnants .....	3
1.2.2 Mesure de médiateurs d'inflammation libérés dans des cultures cellulaires .....	4
1.2.3 Mesure de l'infiltration leucocytaire.....	4
1.2.4 Caractérisation et identification des différents types de leucocytes .....	6
1.2.4.1 Cytométrie en flux .....	6
1.2.4.2 Immunohistochimie et immunofluorescence.....	6
1.2.4.2.1 <i>Quantification</i> .....	7
1.2.5 Mesure de facteurs métaboliques .....	8
1.2.6 Mesure de l'expression génique des facteurs pro-inflammatoires libérés dans l'environnement de la plaie.....	9
1.2.6.1 RT-qPCR.....	9
1.2.6.2 Immunobuvardage de type Western .....	10
1.2.7 Liens entre études macroscopique et histologique de la plaie.....	10
2.0 Biologie du mastocyte .....	12
2.1 Origine et précurseurs.....	12
2.2 Caractéristiques du mastocyte.....	12

2.2.1	Activation IgE-dépendante.....	12
2.2.2	Activation IgE-indépendante.....	13
2.3	Rôles dans la guérison tissulaire .....	14
3.0	Étude du mastocyte via des techniques de laboratoire .....	18
3.1	Modèles animaux .....	18
3.2	Identification et caractérisation du mastocyte.....	18
3.2.1	Colorations histologiques.....	18
3.2.2	Immunohistochimie .....	19
3.2.2.1	Quantification .....	20
4.0	Biologie du macrophage .....	21
4.1	Provenance et précurseurs.....	21
4.2	Caractéristiques du monocyte/macrophage .....	22
4.2.1	Monocytes Ly6C <sup>+</sup> .....	22
4.2.2	Monocytes Ly6C <sup>-</sup> .....	22
4.2.3	Monocytes classiques, intermédiaires et non classiques chez l'humain.....	22
4.2.4	Macrophages .....	23
4.3	Rôles dans la guérison tissulaire .....	23
4.3.1	Promotion de l'inflammation .....	24
4.3.2	Résolution de l'inflammation.....	24
4.3.3	Prolifération cellulaire et restauration tissulaire.....	25
4.3.4	Synthèse et remodelage du collagène .....	25
4.4	Phénotypes M1 et M2.....	27
4.4.1	Macrophages de phénotype M1.....	27
4.4.2	Macrophages de phénotype M2.....	27
4.4.3	Transition du phénotype M1 au phénotype M2 .....	30
5.0	Étude du macrophage via des techniques de laboratoire .....	31
5.1	Modèles animaux .....	31
5.2	Morphologie cellulaire.....	31
5.2.1	Culture cellulaire .....	31
5.2.2	Microscopie .....	32
5.3	Réponse aux stimulations <i>in vitro</i> .....	32

5.3.1 Stimulation avec des facteurs pro- et anti-inflammatoires.....	32
5.3.2 Polarisation des macrophages après stimulation .....	32
5.4 Identification et caractérisation du macrophage et de ses phénotypes .....	33
5.4.1 Cytométrie en flux .....	33
5.4.2 Immunohistochimie et immunofluorescence .....	33
5.4.2.1 Quantification .....	37
5.5 Détection des facteurs de croissance, cytokines pro- et anti-inflammatoires, enzymes protéolytiques et des ROS sécrétés dans l’environnement .....	38
5.5.1 RT-qPCR.....	38
5.5.2 Immunobuvardage de type Western .....	38
5.6 Séquençage génomique du macrophage .....	38
Résumé .....	39
Hypothèses et objectifs.....	40
Hypothèses.....	40
Objectifs.....	40
Résultats : Articles scientifiques.....	41
Article #1: Development of a computer-based quantification method for immunohistochemically-stained tissues and its application to study mast cells in equine wound healing (proof of concept) .....	42
Summary.....	44
Introduction.....	45
Materials and methods.....	46
Results .....	48
Discussion.....	49
Supplementary information 1 (for online publication only).....	55
Supplementary information 2 (for online publication only).....	56
Supplementary information 3 (for online publication only).....	61
Supplementary figures (for online publication only) .....	62
.....	65
Article #2: Immunohistochemical characterization and quantification of M1 and M2 macrophage phenotypes during equine cutaneous wound healing .....	66

Summary.....	67
Introduction.....	68
Materials et methods .....	69
Results .....	72
Discussion.....	73
Discussion générale.....	80
Développement et validation de la méthode de quantification.....	80
Caractérisation et quantification des mastocytes au cours de la guérison cutanée chez le cheval.....	81
Comparaison plaies saines (appendiculaires vs thoraciques) .....	82
Observations plaies atteintes de TGE.....	83
Perspectives.....	84
Caractérisation et quantification des macrophages de phénotype M1 et M2 au cours de la guérison cutanée chez le cheval .....	85
Anticorps CD86 marquant les macrophages de type M1 .....	86
Disposition et morphologie des pan macrophages et macrophages M2.....	86
Perspectives.....	87
Conclusion .....	90
Bibliographie .....	91

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b>	<b>Caractéristiques et fonctions principales du macrophage M1 et M2 et du mastocyte selon la littérature. ....</b>	<b>29</b>
<b>Tableau II.</b>	<b>Anticorps ciblant les différents phénotypes du macrophage équin applicables en immunohistochimie et disponibles commercialement .....</b>	<b>35</b>
<b>Tableau III.</b>	<b>Validation of the quantification method using statistical analysis (n =6). .....</b>	<b>53</b>
<b>Tableau IV.</b>	<b>Numbers and characteristics of the healthy and EGT-affected samples included in the study .....</b>	<b>63</b>
<b>Tableau V.</b>	<b>Macroscopic evaluation for EGT in limb wounds, using Bigbie <i>et al.</i> grading scale .....</b>	<b>64</b>
<b>Tableau VI.</b>	<b>Antibody origin and details for the double immunohistochemistry .....</b>	<b>76</b>
<b>Tableau VII.</b>	<b>Summary of the various tests carried out for the CD86 antibody used as an M1 marker .....</b>	<b>77</b>

## Liste des figures

- Figure 1. Tissu de granulation provenant d'une plaie appendiculaire de 7 jours coloré au HPS.** Des cellules poly- (▷) et mononucléaires (↑) sont présentes dans l'importante infiltration leucocytaire. Les érythrocytes sont colorés en rouge alors que les fibres de collagène ont une teinte orangée. L'image en grossissement représente la cellule polymorphonucléaire pointée. La barre d'échelle représente 200 µm. .... 5
- Figure 2. Différentes molécules sécrétées par le mastocyte et leurs effets sur la guérison cutanée (66).** *PAR: protease activated receptor, ECM : extracellular matrix, LT : leucotriènes, PGD<sub>2</sub> : prostaglandins D2, SMA : smooth muscle actin, MCP : mast cell protease, VEGF: vascular endothelial growth factor.* .... 15
- Figure 3. Coloration histologique des mastocytes équins à l'H&E et au bleu de toluidine (81).** La flèche montre une anisocaryose (différence de la taille du noyau chez des cellules du même type) entre les différents mastocytes colorés à l'H&E provenant d'une tumeur mastocytaire cutanée équine tandis que la tête de flèche montre une cellule en mitose. Le carré illustre des mastocytes équins ayant leurs granules colorés au bleu de toluidine. Les barres d'erreurs correspondent à 20 µm. .... 19
- Figure 4. Principales étapes de différenciation des précurseurs monocytaires en macrophages résidents ou dérivés de la circulation sanguine (90).** *HSC: haematopoietic stem cell, GM-CFU: granulocyte-macrophage colony-forming unit, M-CFU : macrophage colony-forming unit.* .... 21
- Figure 5. Caractéristiques des macrophages de phénotype M1 et M2 et leur transition lors de la guérison cutanée (98).** L'expression de molécules associées au danger telles que des *damaged associated molecular patterns* (DAMPs) et des *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs); et des molécules pro-inflammatoires (cytokines et interférons (IFNs), suite à des dommages tissulaires, activent les macrophages qui acquièrent un phénotype M1. Le phénotype M1, étant associé à l'inflammation, va induire la phagocytose des micro-organismes, l'élimination des débris cellulaires et la production de médiateurs pro-inflammatoires. Ces macrophages semblent ensuite phagocyter des neutrophiles apoptotiques (*efferoctosis*) et acquérir un phénotype réparateur appelé phénotype M2. Les macrophages de phénotype M2 sécrètent ensuite des médiateurs anti-inflammatoires et des facteurs de croissance sous

l'influence de molécules telles qu'IL-4, IL-10, IL-13 et le TGF- $\beta$ , ce qui occasionnerait le passage de la phase inflammatoire à la phase proliférative de la guérison cutanée. .... 28

**Figure 6. Exemple de double marquage, par immunofluorescence, des phénotypes M1 et M2 du macrophage présents lors de la guérison de tendons équin (35).** Le fluorochrome rouge représente le phénotype M1 (CD14) alors que le fluorochrome vert représente le phénotype M2 (CD206). La couleur bleue illustre la contre-coloration des noyaux cellulaires à la coloration Hoechst. La barre d'échelle représente 12  $\mu\text{m}$ . .... 36

**Figure 7. Principal steps of mast cell quantification protocol using ImageJ software program.** a) Original photo illustrating the subepidermal layer of a one-day old skin wound on the limb. The blue line represents the border between the subepidermal and the deeper dermal layer. b) Staining of CD117+ mast cells after colour deconvolution and c) its binary transformation. d) Manual subtraction of stained skin structures (epidermis, hair follicles, sebaceous and sweat glands, blood vessels); the deeper dermal region below the blue line was also deleted. e) Remaining cells stained by the antibody; blue cells are those included in the count by the software (cell area between 8-300  $\mu\text{m}^2$ ). The original photo was taken at a 200X magnification. ▶ :example of a stained mast cell. .... 52

**Figure 8. Photographs and quantification of CD117 positive mast cells stained by immunohistochemistry in equine healthy cutaneous wounds.** a) Photographs showing distribution of CD117+ mast cells in the granulation tissue of a thoracic wound and a limb wound created on the same horse. Scale bar represent 200  $\mu\text{m}$ . Graphs showing evolution of mast cells numbers (/mm<sup>2</sup>) over time and anatomical location in the b) subepidermal layer, c) deep dermal layer, and d) granulation tissue. Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 4 for day 2, n = 3 for day 7, 14 and n = 2 for day 21 for limb group; n = 4 for thorax group in subepidermal et deep dermal layer). In the granulation tissue, n = 3 for day 2, n = 2 for day 7, n = 2 for day 14 and n = 1 for day 21 for limb group; and n = 3 for thorax group. No significant difference was observed either for time or for anatomical location according to the linear model used for repeated measures. .... 54

**Figure 9. Study design.** Two full thickness wounds including epidermis, dermis, hypodermis up to the fascia for thoracic wounds (15 cm<sup>2</sup>) and up to the periosteum for limb wounds (6 cm<sup>2</sup>) were created per anatomical site on 4 mixed breed mares. Wounds healed by second intention and samples were taken alternatively between the two wounds on days 2, 7,

14 and 21. Based on exclusion criteria, a total of 26 healthy (10 from limb wounds (pink) and 16 from thoracic wounds (black)) and 2 exuberant granulation tissue (EGT)-affected specimens (purple), harvested from limb wounds, were included in the study. More detail on the sample collection and macroscopic evaluation is presented in table IV and V. Samples were fixed and paraffin-embedded. Immunohistochemistry was performed to stain mast cells with an CD117/c-kit antibody. Quantification of mast cells was performed with a newly-developed computer-based quantification method using ImageJ software program and with a manual counting done by a pathologist. The ImageJ method was validated after a statistical analysis compared the method with the manual counting. Mast cell number comparisons between healthy wounds on the limb and thorax and observations of the EGT-affected specimens were made. NPWT: negative pressure wound therapy, EGT: exuberant granulation tissue. .... 62

**Figure 10. Mast cell numbers in the granulation tissue of the EGT-affected mare. ..65**

**Figure 11. Photomicrographs of M2 and pan macrophages double immunohistochemistry in healthy granulation tissue from a cutaneous wound on the limb/thorax of a horse. Scale bar represent 200  $\mu$ m. .... 78**

**Figure 12. M2 and pan macrophages cellular morphology.** Pan macrophages (CD14<sup>+</sup>CD204<sup>-</sup>) with a a) round, b) fried-egg or c) dendritic morphology. D) CD14<sup>-</sup>CD204<sup>+</sup> had a round shape and were suspected to be resident dermal macrophages. Numerous M2 macrophages (CD14<sup>+</sup>CD204<sup>+</sup>) showed a e) spindle shape morphology. Scale bar represents 10  $\mu$ m. ....79

## Liste des sigles et des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

bFGF: Facteur de croissance de base des fibroblastes (*basic fibroblast growth factor*)

CCR2 : Récepteur de type 2 des chimiokines à motif C-C (*C-C chemokine receptor type 2*)

CD : Classe de différenciation (*Cluster of differentiation*)

CL: Cellules de Langerhans

CMH-II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CXCL1 : Ligand 1 des chimiokines à motif C-X-C (*chemokine C-X-C ligand 1*)

CX3CR1 : Récepteur de type 1 des chimiokines à motif CX3C (*CX3C receptor type 1*)

DAMPS : Motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (*damage associated molecular patterns*)

EGT: *Exuberant granulation tissue*

ELISA : Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes (*fibroblast growth factor*)

Fig : *Figure*

GAPDH : Glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase

GM-CFU: *Granulocyte-macrophage colony-forming unit*

GM-CSF: *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

H&E : Hématoxyline et éosine

HGF : Facteur de croissance hépatique (*hepatic growth factor*)

HPI : Hypersensibilité aux piqûres d'insectes

HPS : Hématoxyline phloxine safran

HSC : Cellule souche hématopoïétique (*haematopoietic stem cell*)

ICC : Coefficient de corrélation intra classe (*Intraclass correlation coefficient*)

IL : Interleukine

IFN $\gamma$  : Interféron gamma

Igs : Immunoglobulines

IgE : Immunoglobulines de classe E

IgG : Immunoglobulines de classe G  
IL-1Ra : Antagoniste du récepteur à l'IL-1 (*IL-1 receptor antagonist*)  
iNOS : Oxyde nitrique synthase induite (*inducible nitric oxide synthase*)  
LH2 : Lysine hydroxylase 2  
LOP : Lymphœdème chronique progressif  
LPS : Lipopolysaccharide  
LT : Leucotriènes  
mAb : Anticorps monoclonal (*monoclonal antibody*)  
M-CFU : *Macrophage colony-forming unit*.  
M-CSF: *Macrophage colony-stimulating factor*  
MCIP-1 : Facteur chimioattractant des monocytes 1 (*monocyte chemoattractant factor 1*)  
MCP : Protéase mastocytaire (*mast cell protease*)  
MC<sub>T</sub> : Mastocyte positif pour tryptase (*mast cell tryptase positive*)  
MC<sub>TC</sub> : Mastocyte positif pour la tryptase-chymase (*mast cell tryptase-chymase positive*)  
MEC : Matrice extracellulaire (*ECM : extracellular matrix*)  
Mitf: Facteur de transcription associé à la microphthalmie (*microphthalmia-associated transcription factor*)  
MMPs : Métalloprotéases matricielles (*matrix metalloproteases*)  
N/A : Non-applicable  
NGF : Facteur de croissance des nerfs (*nerve growth factor*)  
NIH : Instituts américains de la santé (*National institutes of health*)  
Ov : *overnight*  
pAb : Anticorps polyclonal (*polyclonal antibody*)  
PAMPs : Motifs moléculaires associés aux pathogènes (*pathogen associated molecular patterns*)  
PAR2 : *Protease-Activated Receptor-2*  
PGD : Prostaglandines de la série D  
RELM $\alpha$  : *Resistin-like molecule alpha*  
RM : Récepteur au mannose  
RT : *Room temperature*  
RT-qPCR : Réaction en chaîne par polymérase quantitative avec rétro-transcriptase

SCF: Facteur de cellules souches (*stem cell factor*)

SMA : Actine de muscle lisse (*smooth muscle actin*)

Tab : *Table*

TGE : Tissu de granulation exubérant

TGF- $\beta$  : Facteur de croissance transformant bêta (*transforming growth factor beta*)

TL : *Toll-like*

TNF : Facteur de nécrose tumorale (*Tumour necrosis factor*)

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*vascular endothelial growth factor*)

Vs : versus

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Dre Christine Theoret pour son écoute, sa confiance, sa disponibilité, son humanité et ses excellents conseils autant sur la vie professionnelle que personnelle. Je vous remercie de m'avoir poussé à dépasser mes limites, mais aussi de m'avoir fait prendre conscience de leur existence. Votre cœur de mère amène votre enseignement à un autre niveau, je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que j'ai acquis avec vous. Je me sens privilégiée et je sens que j'ai grandi comme personne. Je me sens prête et beaucoup plus solide à affronter les prochaines portes qui s'ouvriront devant moi. Bien que la maîtrise tire à sa fin, une grande partie de moi souhaite que ce ne soit que le début de la belle relation que nous avons.

J'aimerais remercier ma co-directrice la Dre Sheila Laverty pour son implication et son intérêt envers mon projet, sa discipline et sa bonne humeur contagieuse. Merci d'être une personne aussi marquante et charmante.

J'aimerais remercier Hélène sans qui je n'aurais pas accompli le quart de ce qui a été fait. Ta supervision m'a permis de finalement, voler de mes propres ailes et de maîtriser plus qu'adéquatement la technique d'immunohistochimie. Partager mon quotidien avec toi est un réel plaisir et sache que tu participes activement à l'épanouissement des étudiants.

J'aimerais ensuite remercier les Dr Louis Kamus, Jean Sirois et Monique Doré pour leur collaboration et leur intérêt envers mon projet.

Merci à mes parents et à ma mamie qui me poussent et m'encouragent à réaliser mes rêves. Merci de croire en moi plus que je ne crois en moi-même. Merci à Guillaume et Olivier, mes frères, de me rappeler que la vie n'est pas si sérieuse qu'elle en a l'air.

Merci à mes meilleures amies, Marie-Ève et Noémie, qui malgré la distance restent en contact avec moi et m'encouragent dans mes choix de vie. Vous avez contribué au développement de la personne que je suis aujourd'hui.

J'aimerais remercier Maxime qui fut ma tendre moitié pendant plus de trois ans. Tu m'as fait croire en moi-même et en l'atteinte de mes rêves, je ne te remercierai assez pour cela.

## Introduction

La guérison cutanée est un processus dynamique, complexe et hautement conservé dans l'évolution, ce qui a permis aux différentes espèces animales de survivre. Cette survie a été possible grâce à une sélection naturelle qui avantageait les individus dont les blessures guérissaient plus rapidement. Pour se faire, la nature a favorisé la cicatrisation, un processus qui permet de rétablir la continuité du tissu lésé via le remplacement rapide de celui-ci par un tissu fibreux indifférencié, plutôt que la régénération qui remplace le tissu lésé via la mitose de cellules provenant du même type de tissu, un processus plus long. La rapidité de la guérison est un facteur important pour la perpétuité de l'espèce surtout lorsque l'individu en question est une proie. C'est le cas du cheval où la fuite constitue son seul moyen de défense. La guérison des plaies au niveau appendiculaire du cheval ressemble fortement à celle retrouvée chez l'humain, c'est-à-dire une guérison qui s'opère majoritairement par épithélialisation plutôt que par contraction. Les vétérinaires traitent souvent des plaies chez les chevaux et celles-ci constituent la première cause de décès chez les poulains âgés de moins de six mois aux États-Unis (1). Par ailleurs, la guérison cutanée chez le cheval est souvent compliquée et peut mener au développement de tissu de granulation exubérant (TGE) ou *proud flesh*, une pathologie fibroproliférative qui ressemble à la chéloïde retrouvée chez l'humain. Malgré l'usage de traitements conventionnels, c'est-à-dire la résection chirurgicale et les antibiotiques topiques, le vétérinaire n'en vient généralement pas à éradiquer le TGE. Pour trouver des traitements efficaces possiblement basés sur de nouvelles molécules thérapeutiques dirigées contre le TGE, les principaux acteurs cellulaires entièrement ou en partie responsables du développement du TGE doivent d'abord être étudiés afin d'établir un ou des moments particuliers où une intervention serait bénéfique.

Deux types cellulaires trouvés dans l'environnement de la plaie semblent intéressants et pourraient jouer un rôle important dans les problèmes liés à la guérison : le macrophage et le mastocyte. Ces cellules ont fait l'objet de plusieurs études chez l'humain et les animaux de laboratoire qui ont permis de démontrer leur importance dans la chéloïde, la cicatrice hypertrophique et dans les problèmes de cicatrisation liés au diabète (2-4).

En ce qui concerne le mastocyte, une étude a montré que leur nombre semble être augmenté dans la chéloïde et qu'ils pourraient contribuer à l'inflammation chronique observée dans cette pathologie qui partage de nombreuses similitudes avec le TGE (5). Cette cellule semble intéressante et pourrait avoir un ou des rôles potentiels dans le développement du TGE.

Récemment, deux phénotypes du macrophage ont fait l'objet d'études sur la guérison cutanée (2, 6). Le phénotype M1, considéré comme pro-inflammatoire, semble être présent dans la phase inflammatoire de la guérison et laisserait place au phénotype M2 considéré comme pro-réparateur, présent lors de la phase proliférative. Cette transition semble perturbée lors de pathologies, notamment dans des cas de diabète, et pourrait expliquer l'emprisonnement des plaies appendiculaires dans le cercle vicieux d'inflammation chronique observé. Or, la distinction entre le phénotype M1 et le phénotype M2 n'est pas claire et aucune étude n'a ciblé ces différents phénotypes au cours de la guérison cutanée chez le cheval.

En général, les principales méthodes utilisées pour quantifier les résultats de marquage des tissus équins par immunohistochimie sont les grades semi-quantitatifs et le comptage manuel (4, 7-9). Or, les avancées technologiques des dernières années permettent le développement de méthodes informatiques rapides et efficaces, d'intérêt pour l'étude et la quantification de tissus marqués par immunohistochimie en recherche.

En raison de cet intérêt grandissant pour le macrophage et le mastocyte en guérison cutanée équine et à l'utilisation de méthodes informatiques pour la quantification de tissus marqués par immunohistochimie en recherche, l'étude suivante consiste à développer une méthode de quantification informatique efficace, reproductible, sans coût et accessible à la communauté scientifique et d'utiliser cette méthode en guise d'application pour caractériser le mastocyte et les phénotypes M1 et M2 du macrophage lors de la guérison cutanée chez le cheval.

# Revue de littérature

## 1.0 Inflammation

### 1.1 Définition

« Manière fondamentale dans laquelle le corps réagit aux infections, irritations ou toutes autres blessures et ayant comme caractéristiques clés la rougeur, la chaleur, l'enflure et la douleur. L'inflammation est maintenant reconnue comme étant une réponse immunitaire non-spécifique. » (10)

Lors d'inflammation, les populations cellulaires présentes dans l'environnement de la plaie sécrètent une variété de facteurs. Ces facteurs peuvent avoir une activité pro- ou anti-inflammatoire (cytokines, chimiokines), une activité régulant la prolifération et/ou la migration cellulaire (facteurs de croissance, chimiokines) ou même une activité métabolique (glucose, lactate, pyruvate etc.). L'étude de ces facteurs peut être faite via des techniques de laboratoire permettant ainsi de quantifier l'inflammation présente.

### 1.2 Techniques utilisées pour étudier l'inflammation dans le contexte de la guérison cutanée

#### 1.2.1 Aspect macroscopique de la plaie et des tissus environnants

Une méthode de base pour déceler l'inflammation est d'observer la plaie macroscopiquement. La présence de chaleur, d'œdème et d'érythème sont des indices qui évoquent la présence d'inflammation dans l'environnement de la plaie. La présence de boiterie peut être aussi un bon indice de l'état inflammatoire et de la douleur qu'occasionne une plaie appendiculaire chez le cheval. Il est aussi possible de grader macroscopiquement une plaie en octroyant un score pour le développement du tissu de granulation afin de constater si la guérison s'opère de façon normale ou si une pathologie est en cours ou déjà installée. En effet, l'échelle de Bigbie *et al.* permet de donner un score compris entre 1 et 4 pour le développement du tissu de granulation, 1 correspondant à une élévation du tissu de granulation qui ne dépasse pas les bords de la plaie,

2 à une élévation se situant au même niveau des bordures de la plaie, 3 à une élévation du tissu de granulation se trouvant au-delà des bords de la plaie et 4 à une élévation au-delà des bords de la plaie et qui se projette par-dessus l'épithélium (11). L'observation macroscopique des plaies constitue une bonne méthode clinique pour identifier la présence d'inflammation, d'infection et de cicatrisation anormale, par contre, des méthodes additionnelles sont requises pour quantifier l'ampleur des délais ou de l'anormalité de la guérison (12).

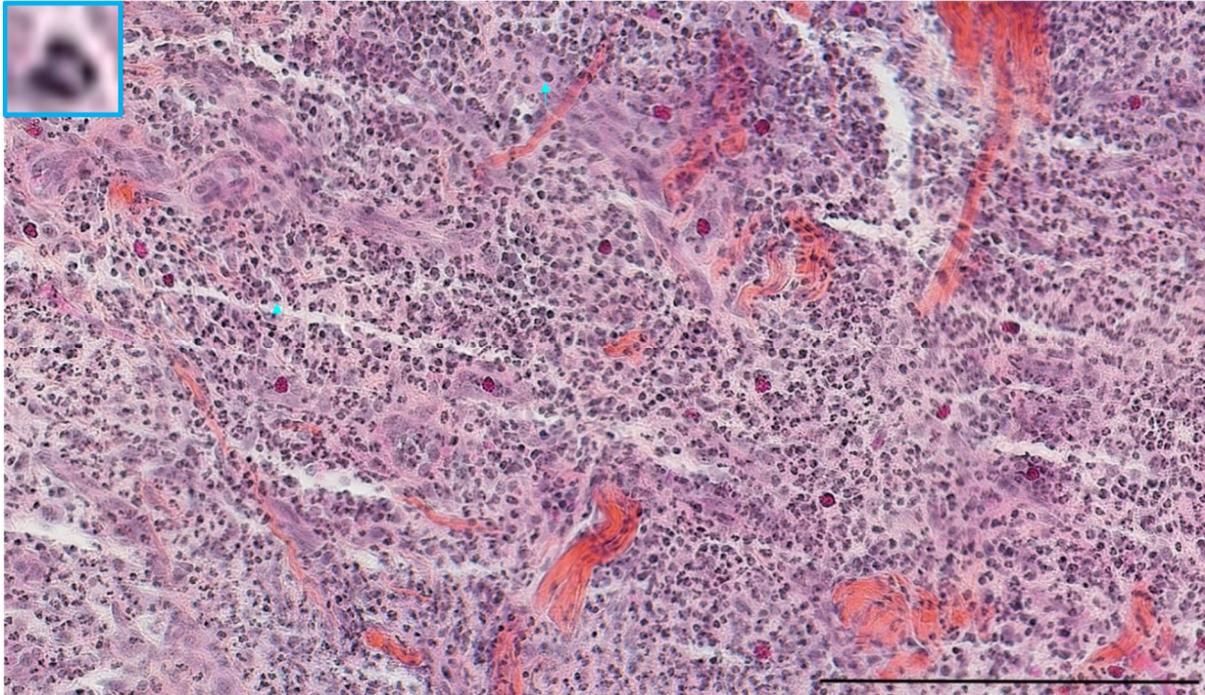
### **1.2.2 Mesure de médiateurs d'inflammation libérés dans des cultures cellulaires**

La culture cellulaire est une excellente méthode pour l'étude des propriétés intrinsèques d'un ou de plusieurs types cellulaires. Les fibroblastes, les myofibroblastes, les kératinocytes, les cellules endothéliales et les macrophages ont fait l'objet de nombreuses études dont certaines chez le cheval (13-18). Pour l'étude de l'inflammation, les cellules sont souvent cultivées en présence de facteurs pro- ou anti-inflammatoires afin de stimuler leur libération de facteurs eux aussi pro- ou anti-inflammatoires. Par exemple, l'étude de Bussche *et al.* (2015) a démontré qu'en stimulant des fibroblastes dermiques équins au *Tumour necrosis factor* (TNF)- $\alpha$ , une augmentation significative de la quantité d'ARN messager d'interleukine (IL)-8 libéré survient chez ces fibroblastes dermiques cultivés dans un milieu dérivé de cellules souches mésenchymateuses comparativement au milieu contrôle (19). D'autres études chez le cheval seraient nécessaires afin de mieux caractériser les propriétés intrinsèques de chaque type cellulaire impliqué dans la guérison cutanée et ainsi mieux contrôler leur comportement *in vivo*.

### **1.2.3 Mesure de l'infiltration leucocytaire**

La présence de leucocytes dans une plaie évoque de l'inflammation et cette inflammation peut nuire à long terme à la guérison cutanée. Une façon simple et efficace de mesurer l'infiltration leucocytaire est d'effectuer une coloration hématoxyline et éosine (H&E) ou hématoxyline phloxine safran (HPS) sur des lames histologiques d'échantillons prélevés de la plaie. Ces colorations permettent non seulement d'observer tous les types cellulaires présents dans la plaie, mais aussi d'établir vaguement de quels types cellulaires il s'agit. Les cellules peuvent

être identifiées selon la forme et la structure de leur noyau (mono ou polymorphonucléaire), car celui-ci est coloré en mauve et est facilement observable. De plus, la coloration HPS permet de localiser les fibres de collagène colorées orange dans le tissu. Ces colorations permettent d'avoir une vue d'ensemble sur tout l'échantillon tissulaire mais aussi de définir la localisation anatomique des cellules dans le tissu. Un exemple de plaie colorée au HPS est montré dans la figure 1.



**Figure 1.** Tissu de granulation provenant d'une plaie appendiculaire de 7 jours coloré au HPS. Des cellules poly- (▲) et mononucléaires (▲) sont présentes dans l'importante infiltration leucocytaire. Les érythrocytes sont colorés en rouge alors que les fibres de collagène ont une teinte orangée. L'image en grossissement représente la cellule polymorphonucléaire pointée. La barre d'échelle représente 200  $\mu\text{m}$ .

Les cellules colorées à l'H&E et au HPS peuvent aussi être dénombrées via des grades semi-quantitatifs pouvant être exprimés en pourcentage de coloration, ou via des logiciels comme ImageJ (NIH) qui permettent la reconnaissance des changements de couleurs et le comptage des particules. Les études ayant pour but l'observation de l'inflammation au cours de la guérison cutanée utilisent fréquemment ces colorations qui peuvent être jumelées à de l'immunohistochimie (20-22).

Bien qu'un aperçu histologique d'un tissu soit suffisant pour déterminer la présence ou l'absence d'inflammation, d'autres techniques utilisées en laboratoire permettent d'identifier les types de leucocytes présents dans le foyer inflammatoire.

## **1.2.4 Caractérisation et identification des différents types de leucocytes**

L'identification des leucocytes peut se faire via le marquage de récepteurs présents à la membrane cellulaire, dans le cytoplasme ou même via le marquage de récepteurs nucléaires. Ce marquage peut être fait avec des techniques utilisant des anticorps tels que la cytométrie en flux, l'immunohistochimie et l'immunofluorescence.

### **1.2.4.1 Cytométrie en flux**

La cytométrie en flux a été, jusqu'à présent, souvent utilisée pour caractériser les leucocytes et leurs différents phénotypes chez le cheval (23-27). Cette technique est employée pour étudier les macrophages présents dans les plaies en les faisant passer à très grande vitesse dans le faisceau d'un laser (28). Les macrophages sont préalablement marqués par des anticorps qui émettent de la fluorescence et sont ainsi comptabilisés et caractérisés en fonction des différents marqueurs (24-27). La technique utilisée pour les macrophages sera discutée plus en détail un peu plus tard. Bien que cette technique permette une analyse quantitative à l'aide de plusieurs anticorps simultanément, cette technique n'utilise que des cellules en suspension, plusieurs séparations et isolations sont nécessaires avant d'obtenir la ou les cellules marquées désirées et cette technique ne permet pas d'évaluer la distribution tissulaire des marqueurs étudiés (23-28).

### **1.2.4.2 Immunohistochimie et immunofluorescence**

L'immunohistochimie et l'immunofluorescence sont d'excellentes techniques permettant de suivre la présence de différents marqueurs pro-inflammatoires dans un tissu donné. L'immunohistochimie ou l'immunofluorescence est une technique de marquage utilisant un anticorps (d'où la partie « immuno ») dirigé contre une petite séquence spécifique d'un antigène nommé épitope et situé dans un tissu (« histo ») ou sur une cellule (« cyto »). La réaction se fait soit à l'aide d'une enzyme qui dégrade un substrat produisant ainsi de la couleur dans le cas l'immunohistochimie, ou à l'aide d'un fluorochrome excité par une lumière ayant une longueur

d'onde définie pour l'immunofluorescence (29). Ces techniques peuvent être effectuées en simple ou en double lorsque deux anticorps primaires visent deux antigènes différents. L'immunohistochimie permet d'examiner les lames histologiques longtemps après la révélation de l'antigène, contrairement à l'immunofluorescence où des photos des lames doivent être prises dans les plus brefs délais après la révélation, car l'intensité fluorescente du ou des fluorochromes diminue avec le temps. Par contre, l'immunofluorescence comporte un nombre moins élevé d'étapes à effectuer que l'immunohistochimie. Chez le cheval, ces techniques ont été utilisées pour marquer des leucocytes particuliers dans des sites anatomiques bien précis pour un tissu donné (21, 30-38). L'immunohistochimie et l'immunofluorescence permettent non seulement de connaître l'emplacement d'un marqueur dans un tissu, mais aussi d'identifier le ou les types cellulaires qui expriment ce marqueur. Ces techniques peuvent être utilisées à des fins descriptives, mais les cellules marquées peuvent aussi être quantifiées.

#### ***1.2.4.2.1 Quantification***

Quel que soit la méthode de quantification utilisée, celle-ci devrait préférablement être validée avant d'être utilisée et avoir le moins de subjectivité possible. Certains paramètres comme la fiabilité, la répétabilité et la reproductibilité peuvent être calculés et peuvent aider à la validation de la méthode par le biais d'une analyse statistique. Lorsque la fiabilité est calculée, celle-ci indique l'ampleur des erreurs de mesure liée à la variabilité inhérente des mesures sans erreur entre les sujets (39). Un bon moyen de déterminer la fiabilité d'une méthode est de calculer un *Intraclass correlation coefficient* (ICC) dans le cas de mesures quantitatives ou un test de Kappa lorsque les mesures sont qualitatives. Dans le même ordre d'idée, la répétabilité permet d'établir la variabilité entre des mesures répétées faites sur les mêmes sujets dans des conditions identiques, alors que la reproductibilité possède la même définition mais se détermine à partir de conditions différentes (39). Ces paramètres peuvent être utilisés lorsqu'une méthode nouvellement développée est comparée à une méthode traditionnelle ou lorsque plusieurs observateurs évaluent les mêmes échantillons avec la même méthode. Les avancées technologiques permettent le développement de nouvelles méthodes de quantification souvent informatiques et très intéressantes pour la communauté scientifique, d'où l'importance de faire une évaluation approfondie de la puissance statistique de ces nouvelles méthodes.

### 1.2.5 Mesure de facteurs métaboliques

La mesure des facteurs métaboliques peut se faire directement dans l'environnement de la plaie en prélevant du sang et/ou du liquide interstitiel (40, 41). Des études ont mesuré divers métabolites présents dans les plaies cutanées équine tels que le glucose, le lactate, le pyruvate et l'urée. Ceci a permis de comparer la concentration de ces métabolites présents dans des plaies appendiculaires et des plaies thoraciques (40, 41).

Des études ont eu pour cible le protéome de certaines structures équine ayant des effets sur la guérison cutanée. En effet, l'étude protéomique du colostrum de jument a permis de découvrir que celui-ci améliorerait significativement ou même permettait la guérison complète d'ulcères diabétiques qui persistaient depuis 10 ans chez certains patients humains via l'activation des fibroblastes par la lactadhérine et l'adipophiline (42). Une autre étude a ciblé le protéome de la membrane amniotique équine afin de caractériser les protéines présentes dans cette membrane connue pour avoir des bénéfices sur la guérison de plaies appendiculaires chez les poneys (43, 44).

D'autres études ont utilisé la méthode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) pour quantifier certains métabolites ou protéines. Cette méthode peut être utilisée à des fins diagnostiques (45-49), mais aussi pour marquer différentes protéines ou métabolites (50-54) ou pour tester l'efficacité de potentiels traitements lors de la guérison cutanée équine (55). En effet, l'ELISA a été utilisé pour la détection d'IgE spécifiques à certains antigènes (46) et la détection d'histamine chez des chevaux souffrant d'hypersensibilité cutanée (48); pour la détection du virus de l'herpès équin 1 (47) et pour la quantification d'IgE chez des poneys Shetland et Islandais souffrant d'hypersensibilité aux piqures d'insectes (HPI)(49). L'étude de De Keyser *et al.* (2015) a aussi tenté de développer un test diagnostique contre le lymphœdème chronique progressif (LOP) chez les chevaux de trait Belges (45). Dans le cas de l'étude de Matil-Fritz *et al.*(2008), l'ELISA a permis de découvrir que l'immunothérapie faite à l'aide de particules chimériques du virus papillome pouvait servir de traitement adjoint à la résection chirurgicale chez des chevaux ayant quelques sarcoïdes de petite taille (55).

## 1.2.6 Mesure de l'expression génique des facteurs pro-inflammatoires libérés dans l'environnement de la plaie

### 1.2.6.1 RT-qPCR

La réaction en chaîne par polymérase quantitative avec rétro-transcriptase (RT-qPCR) est une technique abordable et populaire pour étudier l'expression génique de facteurs pro-inflammatoires libérés ou stockés dans l'environnement de la plaie. Comparativement aux anticorps utilisés pour l'immunobuvardage de type Western (*Western blot*), la création d'amorces encadrant des séquences d'ADN équin est facilement accessible. En effet, des bases de données et des logiciels tels que Primer Express software (15, 56) sont disponibles pour concevoir ces amorces. Cette technique permet de mesurer l'expression génique de plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'IL-6 et le *monocyte chemoattractant factor 1* (MCP-1) ainsi que celle de plusieurs facteurs de croissance impliqués dans l'inflammation comme le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), le *fibroblast growth factor* (FGF) et le *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) (18, 57, 58). L'utilisation de la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) comme gène contrôle permet la quantification des gènes d'intérêt lors de la guérison cutanée chez le cheval (18, 57). L'actine, la microglobuline  $\beta$ 2 et la protéine ribosomale 18s sont d'autres gènes utilisés à titre de contrôles populaires pour les études faites en guérison cutanée chez l'humain, la souris et le porc (59). Le choix d'un gène contrôle approprié pour le modèle utilisé est primordial, car il semblerait que l'expression génique des gènes contrôles dans une peau saine pourrait différer de celle observée lors de la guérison cutanée. Cette expression pourrait aussi être différente selon certaines conditions, par exemple lors de plaies aiguës versus plaies chroniques et lors d'ischémie (59-61). La RT-qPCR peut être utilisée pour quantifier l'expression génique à la fois *in vitro* et *in vivo*. L'analyse des résultats doit, par contre, être faite avec prudence pour les études impliquant des échantillons tissulaires, car il est difficile de savoir précisément par quel(s) type(s) cellulaire(s) ces cytokines ou facteurs de croissance sont produits, contrairement aux études qui impliquent un seul type cellulaire.

### **1.2.6.2 Immunobuvardage de type Western**

L'immunobuvardage de type Western (*Western blot*) est l'analogue de la RT-qPCR mais est utilisée pour quantifier l'expression des protéines plutôt que celle des ARNs. Comme pour la cytométrie en flux et l'immunohistochimie/immunofluorescence, une des principales difficultés lorsque cette technique est utilisée chez l'espèce équine est l'obtention d'anticorps montrant une réactivité croisée. Peu d'anticorps commercialement disponibles sont dirigés spécifiquement contre les antigènes équins et ainsi, seuls quelques-uns ont été testés par la compagnie les produisant pour confirmer une réaction avec les séquences équines. Toutefois, certaines études réalisées par des chercheurs du domaine vétérinaire ont utilisés l'immunobuvardage de type Western pour mesurer la spécificité d'anticorps commercialement disponibles envers la séquence équine ou même produits contre la séquence équine (23, 62-64). L'immunobuvardage de type Western permet aussi de confirmer la spécificité de ces anticorps envers les tissus équins lorsqu'ils sont utilisés dans d'autres techniques de laboratoire comme l'immunohistochimie (64). D'autres ont aussi utilisé cette technique pour mesurer l'expression en protéines de diverses molécules de signalisation, d'enzymes et de protéines structurales comme le collagène dans les plaies (15, 65).

La RT-qPCR et l'immunobuvardage de type Western sont souvent réalisés ensemble afin d'avoir le portrait réel de l'expression du ou des facteurs en question, puisque ces techniques évoquent deux étapes naturellement effectuées lors de la synthèse d'une protéine à partir d'un gène, c'est-à-dire la transcription et la traduction.

### **1.2.7 Liens entre études macroscopique et histologique de la plaie**

L'utilisation de plusieurs techniques discutées ci-dessus est recherchée pour déterminer l'état inflammatoire d'une plaie. En effet, une simple étude macroscopique ne suffit normalement pas à établir l'ampleur des résultats de l'inflammation ni les effets significatifs d'une molécule thérapeutique sur la guérison. Une étude macroscopique jumelée à une étude histologique procure un portrait global de la plaie à traiter et permet de mieux suivre l'évolution de la guérison puisque les composantes cellulaires sont à la base de ce processus.

Une des cellules du système immunitaire qui semble avoir un rôle controversé lors du processus de guérison cutanée est le mastocyte. Afin de mieux émettre ses rôles dans ce processus, la biologie du mastocyte sera discutée ci-après.

## 2.0 Biologie du mastocyte

### 2.1 Origine et précurseurs

Le mot mastocyte provient du mot allemand *mästen* qui signifie nourrir ou grossir (66). Le mastocyte provient de la moelle osseuse et dérive de cellules souches pluripotentes (66, 67) en passant par le stade de précurseur myéloïde commun comme les macrophages, mais pas par un stade de précurseur granulocyte-macrophage (67). Contrairement à d'autres leucocytes, le mastocyte quitte la moelle osseuse sous une forme de précurseur immature et rejoint les tissus périphériques où il va se différencier en mastocyte suite à sa stimulation par des cytokines locales (66, 67).

### 2.2 Caractéristiques du mastocyte

Les mastocytes sont caractérisés par la présence de granules cytoplasmiques. Ils expriment plusieurs récepteurs à leur surface dont les récepteurs *Toll like* (TL) 1 à 7 et le récepteur kit (CD117) liant le *stem cell factor* (SCF) (67, 68). Les mastocytes expriment aussi des récepteurs à l'IgE (FcεRI), qui ont la capacité de reconnaître les IgEs et les IgGs, et expriment des récepteurs reconnaissant les fragments peptidiques C3a et C5a du complément (67-69). Les mastocytes comportent principalement deux types d'activation, c'est-à-dire soit une activation IgE-dépendante ou IgE-indépendante (67).

#### 2.2.1 Activation IgE-dépendante

L'activation IgE-dépendante est associée principalement aux réactions allergiques, car elle provoque, la plupart du temps, de l'angioedème et un choc anaphylactique (66). Les IgEs liés à la surface des mastocytes vont provoquer la dégranulation de ceux-ci, suite à leur liaison à un antigène étranger lors d'une seconde exposition (66). La dégranulation va libérer certains facteurs comme l'histamine, qui a des propriétés vasodilatatrices, ainsi que des médiateurs pro-inflammatoires provoquant ainsi la réaction allergique (66).

### 2.2.2 Activation IgE-indépendante

Le mastocyte peut aussi s'activer d'une manière IgE-indépendante grâce à des protéases, des cytokines, des récepteurs TL et des neuropeptides; et via le complément, l'adénosine et l'hyperosmolarité (67). Le mastocyte joue aussi un rôle important lors de l'infestation de l'organisme par des vers. Il provoque la formation de granulomes et établit une réponse inflammatoire grâce à la réponse médiée aux IgEs qui s'enclenchent suite à la liaison de produits du métabolisme des vers sur les IgEs de surface liés aux FcεR1s (66).

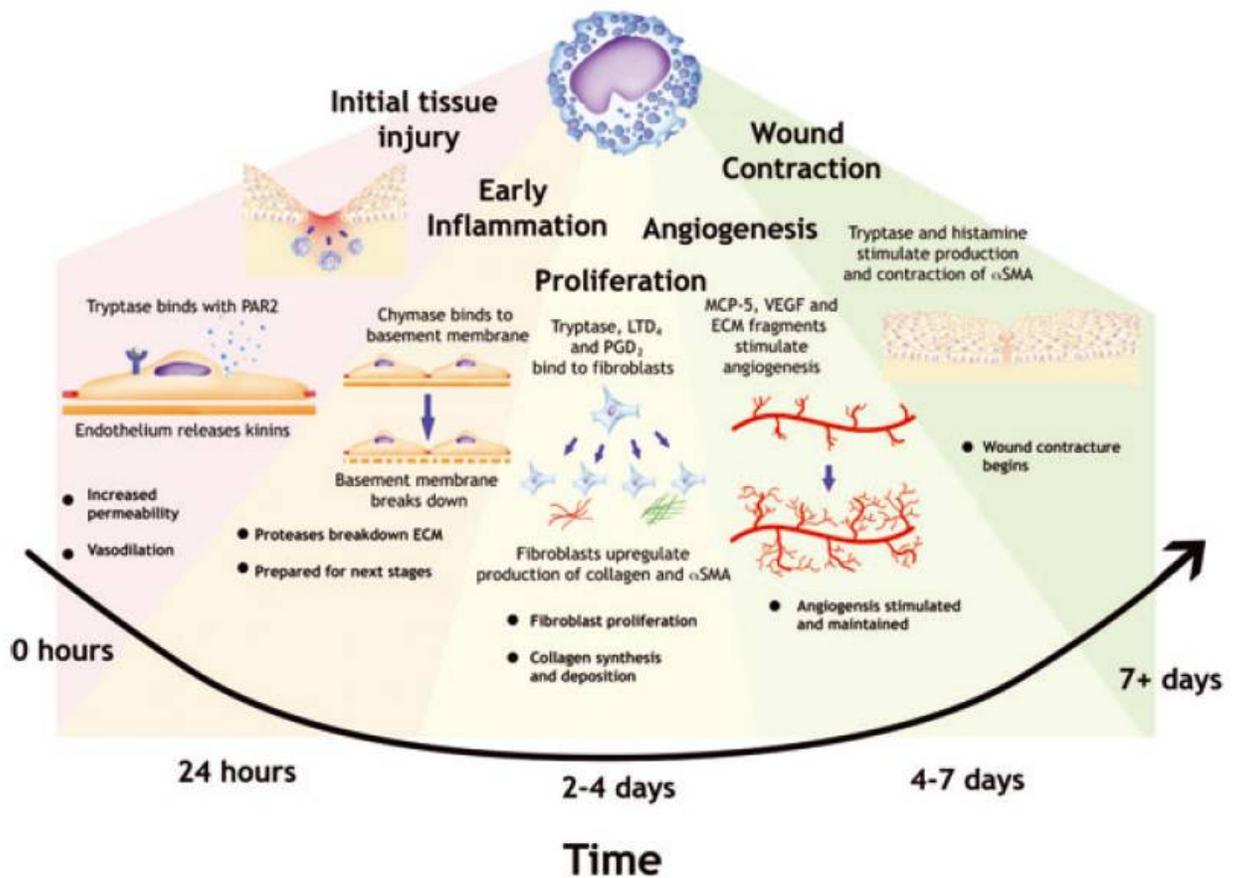
Grâce à ces différentes voies d'activation, le mastocyte aurait autant la capacité de stimuler que de supprimer le système immunitaire via la libération d'IL-1, IL-6, IL-8 et de TNF ainsi que d'IL-4, IL-10 et de TGF respectivement (70). Il libère aussi des facteurs de croissance tels que la *nerve growth factor* (NGF), le *platelet-derived growth factor* (PDGF), le VEGF et le FGF2 impliqués dans la prolifération de plusieurs types cellulaires qui seront abordés plus tard (67). Il synthétise et sécrète des enzymes en début de phase inflammatoire comme l'héparine, qui stimule la migration des cellules endothéliales, ainsi que la chymase et la tryptase qui sont toutes deux des protéases à sérines. La chymase dégrade la membrane basale de l'épiderme alors que la tryptase occasionne des changements dans la perméabilité vasculaire via la libération de kinines par le récepteur PAR2 (66). Par contre, les différentes espèces animales n'expriment pas nécessairement la chymase et la tryptase simultanément. En effet, une étude a montré que les mastocytes de la peau équine ne montraient pas de marquage positif pour la chymase (7). Or, contrairement aux mastocytes équins, les mastocytes canins semblent montrer un marquage positif à la fois pour la chymase et pour la tryptase (7, 71). En raison des différentes possibilités d'expression de ces enzymes, des sous-classes de mastocytes ont été établies. Les mastocytes appartiennent à la classe MC<sub>TC</sub> s'ils expriment la tryptase, la chymase et d'autres facteurs comme la carboxypeptidase mastocytaire et la cathepsine G, alors qu'ils appartiennent à la classe MC<sub>T</sub> s'ils expriment uniquement la tryptase (71). Les caractéristiques principales du mastocyte sont résumées dans le tableau I.

Bien que le mastocyte relâche plusieurs facteurs impliqués dans la promotion et dans la résolution de l'inflammation, son mode de synthèse et de libération de ces différentes substances est variable. En effet, le mastocyte peut synthétiser des médiateurs et les stocker

dans ses granules où un futur stimulus va provoquer leur libération. Il peut aussi synthétiser des médiateurs *de novo* (70). Suite à la synthèse de médiateurs, trois modes de libération sont possibles : le mastocyte peut libérer les médiateurs soit par une dégranulation complète, processus qui est déjà bien connu, ou par une dégranulation incomplète, caractérisée par; une libération des médiateurs mais sans dégranulation ou même par la sécrétion des médiateurs via des vésicules (70). Les modes de libération mentionnés ci-dessus tendent à démontrer qu'il y aurait peut-être eu une sous-estimation de la contribution du mastocyte à la guérison tissulaire, puisque ces deux mécanismes ne sont pas facilement observables *in vivo*, laissant croire que le mastocyte ne provoquait pas d'effets alors que ce ne serait pas nécessairement le cas (70).

### **2.3 Rôles dans la guérison tissulaire**

Il y a encore beaucoup à apprendre sur la contribution du mastocyte à la guérison tissulaire, car les résultats des études précédentes sont plutôt contradictoires et ne mènent pas à un consensus. Le mastocyte est une des premières cellules à intervenir en réponse à une lésion tissulaire vue sa localisation qui prédomine au niveau des barrières protégeant l'organisme de l'environnement externe (66). Sa présence au niveau des muqueuses et des tissus conjonctifs lui permet de sécréter rapidement des médiateurs comme l'histamine, des prostaglandines et des leucotriènes occasionnant une dilatation des vaisseaux sanguins permettant le recrutement de cellules inflammatoires comme des neutrophiles et des macrophages (66). Il sécrète aussi des molécules pro-inflammatoires qui renforcent le recrutement de ces cellules (Figure 2).



**Figure 2. Différentes molécules sécrétées par le mastocyte et leurs effets sur la guérison cutanée (66).** *PAR*: protease activated receptor, *ECM*: extracellular matrix, *LT*: leucotriènes, *PGD<sub>2</sub>*: prostaglandins D2, *SMA*: smooth muscle actin, *MCP*: mast cell protease, *VEGF*: vascular endothelial growth factor.

Selon certaines études, le mastocyte semblerait jouer un rôle important lors de la phase précoce de la guérison tissulaire et lors de la phase tardive concernant plus précisément la formation de cicatrices. En effet, l'étude de Chen *et al.* vient appuyer ce fait. Les auteurs ont étudié les effets de l'inhibition de la dégranulation des mastocytes par un agent pharmacologique sur différents paramètres de la guérison tissulaire dont la libération de cytokines pro-inflammatoires, l'organisation des fibres de collagène, la ré-épithélialisation, la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et la largeur de la cicatrice (72). Ils ont observé qu'en inhibant la dégranulation des mastocytes et donc la libération de nombreux médiateurs, l'inflammation au niveau de la plaie était réduite et serait causée par la diminution de relâche de cytokines telles

que l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et la chemokine *C-X-C ligand 1* (CXCL1). L'organisation des fibres de collagène semblait se rapprocher de celle observée dans la peau intacte et était plus structurée que celle observée chez les plaies contrôles où la dégranulation des mastocytes n'était pas inhibée. La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes semblait être augmentée suite à la stimulation de fibroblastes par la tryptase *in vitro*, montrant ainsi le rôle important de la tryptase libérée par les mastocytes. La largeur de la cicatrice était nettement diminuée par rapport aux plaies contrôles suggérant ainsi que l'inhibition des mastocytes diminue la cicatrisation. Par contre, les auteurs n'ont observé aucun changement pour la ré-épithélialisation entre les deux groupes (72). Les mastocytes seraient aussi fortement impliqués dans le processus de la cicatrisation, car leur présence suite à leur injection chez des fœtus de souris déficients en mastocytes provoque une cicatrisation, qui normalement est absente chez le fœtus en situation physiologique (70). Une autre étude faite par Younan *et al.* mentionne aussi l'importance du mastocyte lors des phases précoce et tardive de la guérison, mais elle ajoute que le mastocyte serait aussi important lors de la phase proliférative (73). Celui-ci viendrait promouvoir l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et la ré-épithélialisation via une relâche de médiateurs tels que le VEGF, le PDGF, le FGF ainsi que l'IL-6 et l'IL-8. Le mastocyte viendrait aussi aider au remodelage du tissu cicatriciel, car il sécrète des protéases et des métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui digèrent la matrice extracellulaire (MEC) afin de contrôler le dépôt de molécules sur celle-ci et sa maturation vers un tissu stable (73). Une caractéristique particulière des mastocytes est qu'ils sembleraient intimement liés à certaines cellules résidentes. Ceci semblerait être le cas avec les fibroblastes, car ils communiqueraient directement avec eux via des jonctions communicantes (70, 73). Certaines études ont aussi montré que les mastocytes ne seraient pas nécessaires à certaines phases de la guérison tissulaire (74-76). C'est le cas de l'étude de Nauta *et al.* qui a montré que le mastocyte n'exercerait pas de fonctions essentielles et non-redondantes avec d'autres types cellulaires. Les auteurs ont observé que la ré-épithélialisation, le dépôt de collagène et la maturation ne montraient pas une différence significative entre les souris déficientes en mastocytes et leur contrôle respectif. Un fait intéressant est que les auteurs ont étudié les trois modèles de souris les plus utilisés pour provoquer une déficience en mastocytes, c'est-à-dire le modèle *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* (*C57BL/6-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>*), le modèle *Kit<sup>W/W-v</sup>* (*WBB6F1-Kit<sup>W/W-v</sup>*) et le modèle *Cpa3-Cre; Mcl-1<sup>fl/fl</sup>*, et que le système d'éclisses utilisé par les auteurs permettait d'étudier la ré-épithélialisation indépendamment de

la contraction, chose qui n'avait jamais été faite et qui se rapproche du processus de guérison observé de façon prédominante chez l'humain et au niveau des membres chez le cheval (76, 77). Bref, malgré le nombre modéré d'études effectuées sur le mastocyte, d'autres études seraient nécessaires afin d'étudier les variations du nombre et de l'implication de celui-ci à travers les différentes phases de la guérison cutanée.

Afin d'être mieux outillé pour étudier la contribution du mastocyte lors à la guérison cutanée, les techniques utilisées pour l'étude de cette cellule seront discutées.

## **3.0 Étude du mastocyte via des techniques de laboratoire**

### **3.1 Modèles animaux**

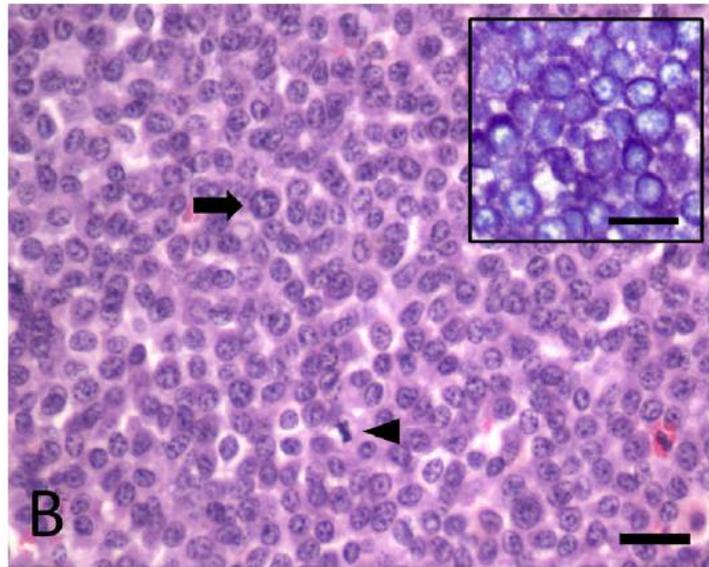
Deux modèles ayant fourni une bonne qualité et quantité d'informations sur le rôle du mastocyte lors de la guérison cutanée sont le cochon Red Duroc et le cochon Yorkshire. Le cochon Yorkshire est un modèle déjà bien établi qui présente un processus de guérison normal semblable à celui retrouvé chez l'humain (78). Pour sa part, le cochon Red Duroc présente un processus de guérison semblable à celui retrouvé chez l'humain lors du développement de cicatrices hypertrophiques et de contractures pathologiques dues à une contraction et une fibrose excessive (78). Le chien et le cheval sont d'autres modèles utilisés pour l'étude du mastocyte lors de pathologies dermiques, survenant naturellement, mais aussi pour l'étude des tumeurs mastocytaires (62, 79-83). Dans un volet plus moléculaire, les souris transgéniques permettent d'étudier les rôles du mastocyte en profondeur pendant toutes les phases de la guérison tissulaire. Un des récepteurs le plus étudié chez le mastocyte est le récepteur c-kit. En effet, le récepteur c-kit est un récepteur à tyrosine kinase présent sur la membrane cellulaire des mastocytes qui se lie au ligand kit ou SCF présent sur les fibroblastes et sur d'autres cellules mésenchymateuses (84). La liaison ligand-récepteur entraîne l'activation du facteur de transcription associé à la microphthalmie (Mitf) et d'autres protéines de signalisation qui sont nécessaires au maintien de la viabilité, du développement, de la prolifération et de la fonction des mastocytes (84). Un modèle de souris intéressant est la souris dépourvue du récepteur c-kit permettant d'étudier les effets de ce récepteur lorsqu'il est muté sur la fonction mastocytaire lors de mastocytose (82).

## **3.2 Identification et caractérisation du mastocyte**

### **3.2.1 Colorations histologiques**

Il est possible d'identifier vaguement le mastocyte par une simple coloration à l'H&E (8, 80, 81). Le mastocyte est identifiable par ses nombreux granules cytoplasmiques qui sont davantage

mis en évidence avec la coloration au bleu de toluidine (8, 62, 79-81). Ces deux colorations sont illustrées dans la figure 3.



**Figure 3. Coloration histologique des mastocytes équins à l'H&E et au bleu de toluidine (81).** La flèche montre une anisocaryose (différence de la taille du noyau chez des cellules du même type) entre les différents mastocytes colorés à l'H&E provenant d'une tumeur mastocytaire cutanée équine tandis que la tête de flèche montre une cellule en mitose. Le carré illustre des mastocytes équins ayant leurs granules colorés au bleu de toluidine. Les barres d'erreurs correspondent à 20  $\mu$ m.

Il est aussi possible de colorer les mastocytes au crésyl violet ainsi qu'au *alcian blue-safranin*, cette dernière marquant le contenu des granules des mastocytes de façon différente selon leur contenu en polysaccharides. Les granules sont colorés en bleu lorsque le phénotype du mastocyte est immature alors qu'ils deviennent rouges lorsque celui-ci est mature (70).

### 3.2.2 Immunohistochimie

En plus des diverses colorations disponibles sur le marché, des anticorps commerciaux et spécifiques sont aussi disponibles pour marquer les mastocytes équins en immunohistochimie. Les anticorps les plus fréquemment utilisés sont ceux qui visent le CD117, c'est-à-dire le proto-oncogène c-kit. De nombreuses études effectuées chez le cheval utilisent un anticorps anti-CD117 pour marquer les mastocytes soit en présence de TGE ou de tumeurs mastocytaires (4,

8, 80, 81). Un anticorps dirigé contre le récepteur aux IgEs a aussi été utilisé chez le cheval mais son utilisation est beaucoup moins commune que l'anticorps anti-CD117 (c-kit) (7). Finalement des anticorps peuvent aussi être utilisés en immunohistochimie pour marquer la chymase et la tryptase, toutes deux des protéases à sérines sécrétées par les mastocytes. Contrairement au chien qui exprime à la fois la chymase et la tryptase, le cheval exprime uniquement la tryptase donc, elle seule peut être étudiée (7-9, 85).

### **3.2.2.1 Quantification**

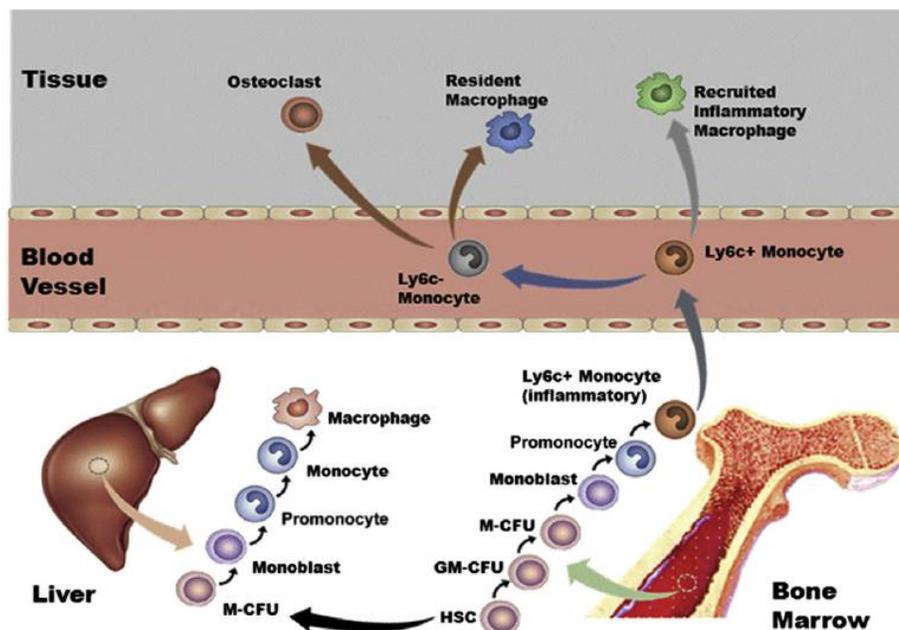
Le marquage histologique et immunohistochimique du mastocyte peut être quantifié. Certaines études effectuées chez le cheval utilisent les grades semi-quantitatifs pour estimer le nombre de mastocytes présents dans la peau (4, 81). Par contre, d'autres études ciblent certaines régions d'intérêt dans la peau et les mastocytes sont comptés soit manuellement ou à l'aide de logiciels informatiques (7, 8, 86, 87). Étant donné que les mastocytes sembleraient se trouver en plus grand nombre au niveau de la couche sous-épidermique ainsi qu'au niveau des vaisseaux sanguins situés dans le derme profond, deux études ont fait l'objet d'un protocole permettant d'analyser ces deux régions d'intérêt pour la quantification des mastocytes. Elles ont établi que la profondeur de la couche sous-épidermique correspondait à 0,296 mm à partir de la membrane basale et que celle du derme profond correspondait à un intervalle de 1,184 à 1,480 mm sous la couche sous-épidermique (7, 86). En utilisant ces valeurs, il est donc possible de quantifier les mastocytes présents dans la peau équine et ce de façon reproductible. Une fois la quantification terminée, les résultats peuvent être exprimés de deux façons, soit en exprimant un nombre de mastocytes/mm<sup>2</sup> ou en ratio (%) où le nombre de mastocytes est divisé par le nombre total de cellules présentes dans la région d'intérêt (7, 8, 87).

Une autre cellule du système immunitaire qui semble participer activement à l'instauration ainsi qu'à l'élimination de l'inflammation lors de la guérison cutanée est le macrophage. Afin de mieux comprendre sa contribution potentielle au développement du TGE, la biologie du macrophage sera discutée ci-après.

## 4.0 Biologie du macrophage

### 4.1 Provenance et précurseurs

Les macrophages résidents proviennent du sac vitellin, parfois du foie fœtal également pour les cellules de Langerhans (CL), et sont produits avant la naissance sans passer par un stade monocyttaire, alors que les macrophages dérivant des monocytes à l'âge adulte proviennent de la moelle osseuse et ne sont produits qu'après la naissance en suivant plusieurs étapes de différenciation avant d'arriver au stade de monocyte (88, 89) (Figure 4). Par contre, certaines études ont montré que les monocytes peuvent aussi renouveler la population de macrophages résidents au cours de la phase inflammatoire lors de la guérison cutanée (6, 89). Mais, cette participation minime servirait à maintenir une population de macrophages résidents afin que ceux-ci puissent initier et entretenir une réponse inflammatoire aigüe, car maintenir cette population lors de conditions stables n'est pas nécessaire, cette population étant autonome dans ces conditions (88).



**Figure 4.** Principales étapes de différenciation des précurseurs monocytaires en macrophages résidents ou dérivés de la circulation sanguine (90). HSC: *haematopoietic stem cell*, GM-CFU: *granulocyte-macrophage colony-forming unit*, M-CFU : *macrophage colony-forming unit*.

## 4.2 Caractéristiques du monocyte/macrophage

Deux groupes de monocytes ont été établis jusqu'à présent chez la souris, c'est-à-dire les monocytes Ly6C<sup>+</sup> et les Ly6C<sup>-</sup> (88, 91).

### 4.2.1 Monocytes Ly6C<sup>+</sup>

Les monocytes Ly6C<sup>+</sup> sont positifs pour les marqueurs CD11, CD115, F4/80 et CD43; et peuvent être positifs pour le CMH-II. Ces monocytes expriment aussi le *C-C chemokine receptor type 2* (CCR2), mais pas le *CX3C receptor type 1* (CX3CR1), ce qui leur procure un phénotype inflammatoire, car les monocytes inflammatoires seraient attirés au site lésionnel par un gradient de CCL2 agissant sur le récepteur CCR2 (CCR2<sup>+</sup>/CX3CR1<sup>-</sup>) (88, 91).

### 4.2.2 Monocytes Ly6C<sup>-</sup>

Les monocytes Ly6C<sup>-</sup> expriment sensiblement les mêmes marqueurs que les monocytes Ly6C<sup>+</sup>, par contre, ils n'expriment pas le CD43 mais ils expriment le CD62L. Contrairement aux monocytes Ly6C<sup>+</sup>, les monocytes Ly6C<sup>-</sup> expriment le CX3CR1 mais pas le CCR2 (CCR2<sup>-</sup>/CX3CR1<sup>+</sup>), leur procurant un phénotype de monocyte patrouilleur (88, 91).

Les monocytes CCR2<sup>+</sup>/CX3CR1<sup>-</sup> et CCR2<sup>-</sup>/CX3CR1<sup>+</sup> existent aussi chez l'humain, mais ils sont catégorisés en différents groupes (88, 91).

### 4.2.3 Monocytes classiques, intermédiaires et non classiques chez l'humain

Les CCR2<sup>+</sup>/CX3CR1<sup>-</sup> font partie des monocytes classiques CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> qui sont l'homologue des monocytes Ly6C<sup>+</sup> chez la souris, alors que les monocytes CCR2<sup>-</sup>/CX3CR1<sup>+</sup> font partie des monocytes intermédiaires (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>) ou des monocytes non classiques (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>). En présence d'inflammation, les monocytes CCR2<sup>+</sup>/CX3CR1<sup>-</sup> auraient tendance à se différencier en macrophages du phénotype M1, alors que les monocytes CCR2<sup>-</sup>/CX3CR1<sup>+</sup> se dirigeraient plutôt vers le phénotype M2 une fois activés en macrophages (88, 91). Les différents phénotypes de macrophages seront abordés plus tard.

#### 4.2.4 Macrophages

L'expression de certains récepteurs découlerait, notamment, du phénotype établi lors du stade monocyttaire. Les monocytes, étant généralement les précurseurs des macrophages, ont un rôle important dans l'activation et dans le renouvellement de ceux-ci. Le macrophage interagit avec des molécules et d'autres cellules via des récepteurs, comme les récepteurs éboueurs, les récepteurs du complément, la partie constante des anticorps (Fc) et les récepteurs TL (92, 93). Le macrophage est une cellule à excellente capacité phagocytaire et agit aussi comme chef d'orchestre lors de la réponse inflammatoire puisqu'il est une cellule présentatrice d'antigènes (92). Il sécrète une panoplie de cytokines et de facteurs de croissance dont le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-10, le TGF- $\alpha,\beta$ , le PDGF, le VEGF et le *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (92). Le macrophage peut exprimer différents récepteurs en fonction de son emplacement chez un même organisme. Par exemple, un macrophage alvéolaire n'exprime pas ou très peu le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II), alors que les CL (voir section 4.1) l'expriment, ces deux cellules étant des macrophages résidents au niveau du poumon et de la peau respectivement (89). De plus, deux populations de macrophages provenant d'un même tissu peuvent montrer des différences dans l'expression de leurs récepteurs. Les CL expriment plus particulièrement le récepteur à lectines langerine (CD207) ainsi que le CD11b, le CD11c, le F4/80 et le CMH-II, ces derniers étant des marqueurs généraux associés aux macrophages, alors que les macrophages dermiques expriment le F4/80 et le CD11b, mais n'expriment pas le CD11c ni le récepteur langerine et très peu le CMH-II (89). Certains marqueurs peuvent être exprimés généralement chez les différentes populations, comme par exemple, la calprotectine, qui est un complexe protéique liant le calcium et qui amplifie le statut inflammatoire de certaines cellules dont les macrophages (32).

#### 4.3 Rôles dans la guérison tissulaire

La majorité des macrophages se trouvant à un site lésionnel proviennent de la circulation sanguine (92). Les monocytes circulant se trouvent attirés au site de la plaie par des *damage associated molecular patterns* (DAMPs) comme l'ATP, puis des facteurs de croissance libérés suite à la dégranulation des plaquettes, par des protéines bactériennes et finalement, par des

cytokines provenant des leucocytes (93). Une fois arrivés dans les tissus, ils s'activent en macrophages (92-94). Constitutivement, les monocytes ne libèrent pas une grande quantité de cytokines et de facteurs de croissance. Leur transformation en macrophages provoque un changement du phénotype et de l'expression génique de ces cellules, ce qui leur permet de participer activement à la guérison tissulaire (92, 93, 95). Le macrophage participe au processus de guérison tissulaire en agissant sur la défense de l'hôte, la promotion et la résolution de l'inflammation, l'élimination des cellules mortes par apoptose et sur le support de la prolifération cellulaire et de la restauration tissulaire (95).

#### **4.3.1 Promotion de l'inflammation**

Le macrophage promeut l'inflammation en sécrétant des molécules pro-inflammatoires. Suite à la détection de facteurs pro-inflammatoires présents dans l'environnement tels que le lipopolysaccharide (LPS), des cytokines pro-inflammatoires, des produits microbiens et des DAMPS, les récepteurs P2Y et P2X des macrophages résidents s'activent et provoquent le recrutement de cellules inflammatoires au niveau du site lésionnel via la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12, le TNF- $\alpha$  et l'oxide nitrique synthase induite (iNOS) (89, 95). De plus, le récepteur P2Y provoquent l'élimination des cellules apoptotiques du milieu (89). Les macrophages sécrètent aussi des agents chemoattractants en parallèle afin d'accentuer le recrutement des leucocytes (95).

#### **4.3.2 Résolution de l'inflammation**

Les macrophages aident aussi à la résolution de l'inflammation grâce au processus d'*efferoctosis* qui consiste à phagocyter les cellules apoptotiques, plus particulièrement les neutrophiles (95). Ce phénomène provoquerait un changement de phénotype chez le macrophage passant d'un phénotype inflammatoire à un phénotype réparateur. Ceci occasionnerait la libération de TGF- $\beta$ , de prostaglandines E<sub>2</sub>, de VEGF, d'*hepatic growth factor* (HGF) et d'IL-10, contribuant à la réparation tissulaire ainsi qu'à la prolifération et différenciation cellulaires. De plus, ce processus provoquerait une diminution de la libération

de facteurs pro-inflammatoires tel que le TNF- $\alpha$  suite à une stimulation au LPS (89, 94). Les macrophages sont les cellules les plus efficaces en ce qui a trait à l'élimination des neutrophiles par phagocytose et ont aussi la capacité d'induire l'apoptose de ceux-ci via l'expression du TNF- $\alpha$  membranaire, des intégrines  $\beta 3$  et du CD36 (94, 95).

### **4.3.3 Prolifération cellulaire et restauration tissulaire**

Les macrophages aident aussi au support de la prolifération cellulaire et de la restauration tissulaire, car ils sécrètent une panoplie de facteurs de croissance, mentionnés précédemment, qui agissent sur la prolifération, la différenciation cellulaire et sur le dépôt MEC. Ils occasionnent aussi la formation du tissu de granulation, structure importante pour la réparation complète des plaies qui guérissent par seconde intention, comme c'est souvent le cas chez le cheval. Une étude a démontré que les macrophages sont une source majeure de VEGF et qu'ils contribuent ainsi à l'angiogenèse en début de phase de guérison tissulaire, car leur absence chez un modèle murin démuné spécifiquement en macrophages a occasionné des altérations dans la vascularisation du tissu (96). Lorsque les macrophages libèrent des facteurs de croissance, ces facteurs se retrouvent emprisonnés dans la MEC qui régule ainsi leur activité et les protège contre la dégradation. La MEC agit comme un réservoir et permet de potentialiser l'effet des facteurs de croissance sur des cellules structurales comme les cellules endothéliales, mésothéliales et les péricytes. Elle aide ces cellules à survivre, proliférer ou même à se différencier en d'autres types cellulaires nécessaires à la guérison tissulaire (89). La sécrétion de TGF- $\beta$  par les macrophages aide aussi à la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, ce qui contribue à la contraction et donc à la fermeture de la plaie.

### **4.3.4 Synthèse et remodelage du collagène**

Les macrophages aident aussi à la synthèse du collagène et à son remodelage. Ceux-ci possèdent une enzyme, l'arginase, qui convertit l'arginine en ornithine où l'ornithine sert de précurseur à la synthèse de prolines et d'hydroxyprolines qui sont les principaux composants du collagène. L'arginase agit aussi comme molécule anti-inflammatoire, car elle compétitionne avec l'iNOS pour son substrat (arginine) et elle diminue l'activité des lymphocytes qui sont eux aussi arginine-dépendants (89). De plus, le récepteur IL-4 $\alpha$  des macrophages permettrait, via sa

voie de signalisation, d'induire la synthèse de la protéine *resistin-like molecule alpha* (RELM $\alpha$ ) qui agirait sur les fibroblastes. Cette molécule provoquerait la synthèse de la lysine hydroxylase 2 (LH2) par ceux-ci. La LH2 dirige les ramifications et les liaisons des fibres de collagène qui deviennent plus stables biochimiquement et moins susceptibles à la dégradation enzymatique (89). C'est grâce à ces différentes molécules que les macrophages seraient responsables de la synthèse *de novo* ainsi que de l'organisation du collagène. Par contre, l'étude de Daley *et al.* a démontré l'absence d'IL-4 dans l'environnement des plaies ainsi que l'absence de la production d'IL-4 dans les plaies chez la souris (97). L'absence d'IL-4 ne permettrait donc pas d'activer le récepteur IL-4 $\alpha$  et ainsi occasionner la synthèse de LH2 par les fibroblastes. L'implication d'IL-4 chez le macrophage est un sujet controversé dans la littérature et d'autres études supplémentaires seraient nécessaires afin d'élucider le véritable rôle de cette molécule.

Les macrophages agissent aussi lors de la phase de maturation tissulaire, c'est-à-dire lors du remodelage cicatriciel. Ils ingèrent les débris cellulaires et dégradent l'excès de MEC déposé autour et dans les plaies (89). Pour ce faire, ils produisent des enzymes MMPs qui sont essentielles à la réorganisation du collagène puisqu'elles dégradent la MEC. Toutefois, ces enzymes peuvent aussi être produites par d'autres types cellulaires tels que les neutrophiles, les kératinocytes et les fibroblastes (89).

Ces découvertes viennent montrer l'importance du macrophage dans le processus de la guérison tissulaire et ce, dans presque toutes les phases de la guérison. De plus en plus d'évidences montrent que non seulement, la déplétion en macrophages provoque des effets qui sont différents en fonction du temps, mais que les macrophages pourraient aussi montrer des caractéristiques différentes en fonction du temps. L'expression de certaines molécules dans une population particulière de macrophages constitue un phénotype. Deux principaux phénotypes de macrophages ont, jusqu'à présent, été étudiés chez plusieurs espèces dont le cheval (35).

## 4.4 Phénotypes M1 et M2

Les principaux phénotypes de macrophages décrits à ce jour sont les macrophages classiquement activés, ou M1, et les macrophages alternatifs, ou M2.

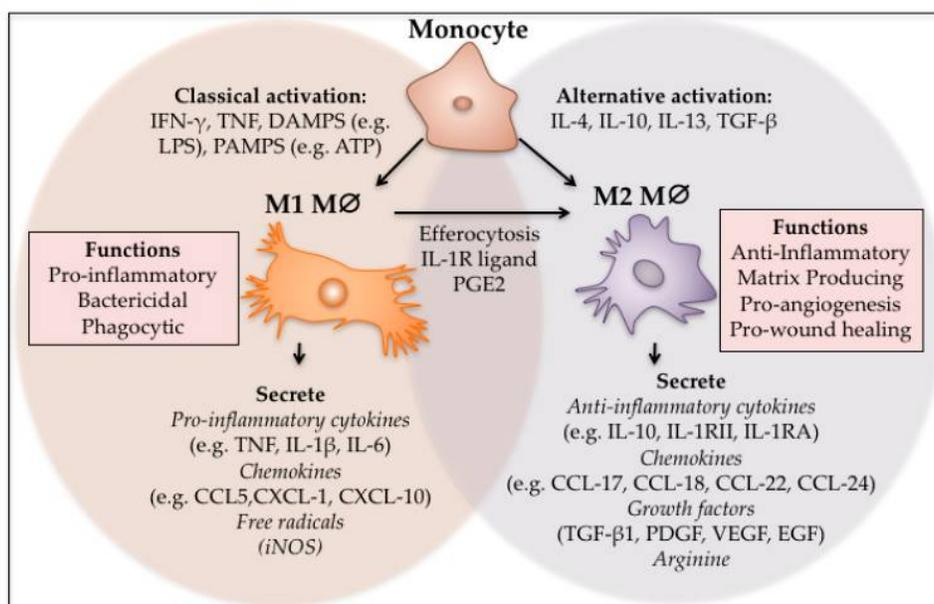
### 4.4.1 Macrophages de phénotype M1

Les macrophages M1 seraient recrutés dans les phases précoces de la guérison, donc pendant la phase inflammatoire, et auraient justement un phénotype pro-inflammatoire (95, 98). Ceux-ci seraient la résultante de la différenciation des monocytes CCR2<sup>+</sup>/CX3CR1<sup>-</sup> une fois migrés au site lésionnel (88). Les macrophages M1 sont caractérisés par leur expression en iNOS, CD14, CD16, CD32, CD64, CD80, CD86 et par leur expression des récepteurs TL 2 et 4. Ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 (6, 97-99). Les macrophages M1 auraient comme rôles d'éliminer les micro-organismes envahissant et de promouvoir la réponse immunitaire de type 1 par le biais de la phagocytose des débris tissulaires endommagés (6). En effet, des études *in vitro* et *in vivo* effectuées chez des lapins ont suggéré l'expression du CMH II par les macrophages M1 et une de ces études a montré qu'ils ont une meilleure capacité à lier et à internaliser des molécules présentes dans l'environnement que leurs confrères M2, soulignant leur rôle de cellules pro-inflammatoires (2, 100). De plus, une étude réalisée sur des cicatrices hypertrophiques humaines montre que les macrophages M1 inhiberaient aussi la fibrogenèse en induisant la production de MMP-1 par les fibroblastes, ou même en inhibant directement la prolifération de ceux-ci (3).

### 4.4.2 Macrophages de phénotype M2

À l'opposé, les macrophages M2 seraient recrutés dans les phases plus tardives de la guérison et seraient responsables de la transition entre la phase inflammatoire et la phase proliférative (95, 98, 101). Les macrophages M2 expriment le CD14 mais aussi des marqueurs de phénotype alternatif dont le récepteur au mannose (RM) communément appelé CD206, le récepteur éboueur A (CD204), le CD163 et l'arginase (35, 99). Ce phénotype serait impliqué dans le nettoyage des débris, l'angiogenèse, le remodelage tissulaire et dans la résolution de l'inflammation en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires et des facteurs de croissance

comme l'IL-10, l'antagoniste du récepteur à IL-1 (IL-1Ra), le VEGF-A et le TGF- $\beta$  (6, 94, 98, 99, 102). Ce phénotype serait aussi impliqué dans les infestations parasitaires, les réactions allergiques et provoquerait la fibrogenèse via la sécrétion de facteurs de croissance fibrogéniques comme le TGF- $\beta$  (3, 94). Des sous-classes de macrophages M2, par exemple des macrophages M2a, M2b, M2c et M2d, existeraient et seraient activés par des stimuli différents présents dans l'environnement (3, 88). Les principales caractéristiques et fonctions des macrophages M1 et M2 sont résumées dans la figure 5 et le tableau I.



**Figure 5. Caractéristiques des macrophages de phénotype M1 et M2 et leur transition lors de la guérison cutanée (98).** L'expression de molécules associées au danger telles que des *damaged associated molecular patterns* (DAMPs) et des *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs); et des molécules pro-inflammatoires (cytokines et interférons (IFNs), suite à des dommages tissulaires, activent les macrophages qui acquièrent un phénotype M1. Le phénotype M1, étant associé à l'inflammation, va induire la phagocytose des micro-organismes, l'élimination des débris cellulaires et la production de médiateurs pro-inflammatoires. Ces macrophages semblent ensuite phagocyter des neutrophiles apoptotiques (*efferocytosis*) et acquérir un phénotype réparateur appelé phénotype M2. Les macrophages de phénotype M2 sécrètent ensuite des médiateurs anti-inflammatoires et des facteurs de croissance sous l'influence de molécules telles qu'IL-4, IL-10, IL-13 et le TGF- $\beta$ , ce qui occasionnerait le passage de la phase inflammatoire à la phase proliférative de la guérison cutanée.

**Tableau I. Caractéristiques et fonctions principales du macrophage M1 et M2 et du mastocyte selon la littérature.**

Cellule	Phénotype	Principaux rôles dans la guérison	Principaux marqueurs	Principaux médiateurs relâchés	Références
Macrophage M1	Pro-inflammatoire	Élimination des micro-organismes Promotion réponse immunitaire de type 1 Inhibition de la fibrogenèse	iNOS, CMH II, CD14, CD16, CD32, CD64, CD80, CD86, TL2 et 4	TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ et IL-6	(6, 97, 99)
Macrophage M2	Réparateur	Débridement Angiogenèse Remodelage tissulaire Résolution de l'inflammation Promotion de la fibrogenèse	CD14, CD206, CD204, CD163, Arginase	IL-10, IL-1Ra, VEGF-A et TGF- $\beta$	(6, 35, 94, 95, 98, 99, 101, 102)
Mastocyte	NA	Controversés	TL 1 à 7, CD117 et Fc $\epsilon$ RI	Histamine, héparine chymase, tryptase, NGF, PDGF, VEGF et FGF2 <b>Pro-inflammatoires:</b> IL-1, IL-6, IL-8 et TNF <b>Anti-inflammatoires :</b> IL-4, IL-10 et TGF	(66-70, 74)

iNOS, oxide nitrique synthase induite; CMH II, complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2; CD, *cluster differentiation*; TL, *Toll-like receptor*; TNF, *tumor necrosis factor*; IL, interleukine; VEGF, *vascular endothelial growth factor*; IL-1Ra, *IL-1 receptor antagonist*; TGF, *transforming growth factor*; NGF, *nerve growth factor*; PDGF, *platelet-derived growth factor*; FGF, *fibroblast growth factor*; NA, non-applicable (ne sera pas à l'étude).

### 4.4.3 Transition du phénotype M1 au phénotype M2

Les résultats d'études suggèrent qu'il y aurait une transition du phénotype M1 vers le M2 et que cette transition serait responsable du passage de la phase inflammatoire à la phase proliférative lors de la guérison cutanée (Figure 5). La transition du phénotype M1 à M2 se ferait, entre autres, via le processus d'*efferoctosis* décrit précédemment (95, 98). D'autres facteurs comme les glucocorticoïdes, les prostaglandines et des métabolites pourraient aussi occasionner ce changement de phénotype (95). Il a déjà été postulé qu'une mauvaise transition du phénotype M1 à M2 pourrait être responsable du retard de guérison de plaies cutanées occasionné par certaines pathologies comme le diabète, mais ceci reste à confirmer (2, 6). De plus, la présence accrue de macrophages M2 serait aussi associée à un tissu de granulation hautement vascularisé et cellulaire, un tissu que l'on retrouve particulièrement sur des plaies appendiculaires chez le cheval (77, 102). Encore aujourd'hui, la distinction du phénotype des macrophages M1 et M2 à travers le temps n'est pas encore claire. Certains chercheurs ont émis l'hypothèse qu'une co-expression de ces deux phénotypes existerait lors des phases précoces de la guérison tissulaire vu la présence de marqueurs associés à la fois au phénotype « classiquement activé » (M1) ainsi qu'au phénotype alternatif (M2) (6, 94-97). À l'opposé, une étude ciblant les macrophages M1 et M2 chez des tendons équinus a conclu que les macrophages ne partageaient pas simultanément les marqueurs des deux phénotypes comme c'est le cas au niveau de la rate (35). D'autres études seraient nécessaires afin d'établir l'existence d'un phénotype hybride (M1/M2) et afin de caractériser les phénotypes M1 et M2, car ceci amènerait d'autres avenues pour la recherche sur le macrophage et sa contribution à la guérison tissulaire.

## 5.0 Étude du macrophage via des techniques de laboratoire

### 5.1 Modèles animaux

Le macrophage suscite de plus en plus l'intérêt de la communauté scientifique, surtout en ce qui a trait à la guérison tissulaire. Des études ont tenté de mieux caractériser ses rôles *in vivo* en créant des modèles animaux. En effet, un modèle de souris *PU.1 null*, où l'élimination des neutrophiles et des macrophages a été provoquée génétiquement, ainsi qu'un autre modèle de souris transgénique ayant le récepteur à la toxine diphtérique inséré dans le promoteur du lysozyme sécrété par les macrophages, ont été créés afin d'étudier les effets d'une absence en macrophages sur la guérison cutanée (103-105). Le modèle de souris *Mac-1<sup>-/-</sup>* est aussi un modèle utilisé pour suivre l'évolution de la guérison en l'absence de macrophages et de neutrophiles (106). Le *Zebrafish* pourrait être un modèle utile pour étudier les macrophages lors de la guérison cutanée puisqu'il est possible d'infecter ce poisson avec des pathogènes et d'observer en temps réel les interactions des macrophages avec les microbes *in vivo* (107).

### 5.2 Morphologie cellulaire

Une méthode plus descriptive de caractériser le macrophage est d'étudier sa morphologie cellulaire *in vitro*.

#### 5.2.1 Culture cellulaire

Étudier les macrophages en culture cellulaire permet de documenter les propriétés intrinsèques de ces cellules en l'absence d'influence environnementale. Très peu d'études ont été réalisées sur les caractéristiques des macrophages équins *in vitro*. Les deux seules études existantes, à ma connaissance, sont faites sur des lignées cellulaires créées pour ressembler aux macrophages équins en situation pathologique, c'est-à-dire les cellules e-CAS et les cellules EML-3C employées pour l'étude de l'anémie infectieuse équine (33, 108). En revanche, la morphologie cellulaire des macrophages humains est le sujet d'un grand nombre d'études dont une effectuée par Ploeger *et al.* qui documente les différences morphologiques entre les phénotypes M1 et M2 du macrophage

issus de monocytes de sang périphérique humain (109). Des études *in vitro* sur le macrophage équin en situation physiologique seraient nécessaires afin de documenter les caractéristiques morphologiques de ces cellules ayant un rôle important dans la guérison cutanée.

### **5.2.2 Microscopie**

Sur les deux publications traitant de la morphologie du macrophage équin, une seule décrit une analyse microscopique plus approfondie. En effet, dans l'étude de Fidalgo-Carvalho *et al.* la microscopie à contraste de phase et la microscopie fluorescente sont utilisées pour observer certaines caractéristiques du macrophage issu de monocytes prélevés du sang périphérique tels que la morphologie et la phagocytose (33).

## **5.3 Réponse aux stimulations *in vitro***

La plupart des études du macrophage *in vitro* sont faites dans le but d'observer sa réaction en réponse à des molécules incubées dans le milieu de culture. Cette méthode est un peu plus active et quantitative que de simplement observer la morphologie cellulaire, car il est possible d'établir le niveau d'expression des facteurs sécrétés en réponse à ces stimulations.

### **5.3.1 Stimulation avec des facteurs pro- et anti-inflammatoires**

Les facteurs les plus utilisés pour stimuler les macrophages sont : le TNF- $\alpha$ , l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) et le LPS pour les facteurs pro-inflammatoires ainsi que l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-10 pour les facteurs anti-inflammatoires (109-112).

### **5.3.2 Polarisation des macrophages après stimulation**

Afin d'étudier les différents phénotypes du macrophage, une polarisation peut être effectuée en incubant les macrophages non différenciés avec des facteurs pro- et anti-inflammatoires. Pour occasionner une polarisation vers le phénotype M1, il est possible d'incuber des cellules prélevées de la moelle osseuse avec du *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) afin de différencier les cellules en macrophages et par la suite, les incuber avec du LPS et/ou de l'IFN $\gamma$  (100). Les procédures sont les mêmes pour les M2, excepté que les cellules non-différenciées seront incubées avec du *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) et avec de l'IL-4, de l'IL-

13 ou de l'IL-10 par la suite (113). Il est aussi possible d'utiliser des cellules mononucléaires dérivées du sang périphérique et de diriger leur polarisation vers le phénotype M1 ou le phénotype M2. Une séparation des macrophages CD14<sup>+</sup> doit être effectuée, mais le reste de la procédure est la même que celle effectuée pour les cellules dérivées de la moelle osseuse (100, 109). Cette polarisation, qui est par le fait même une stimulation, permet l'étude des caractéristiques particulières de chaque phénotype *in vitro*. À ma connaissance, il n'existe pas d'étude où des macrophages équins ont été polarisés aux phénotypes M1 et M2. Il serait donc intéressant de caractériser ces deux phénotypes du macrophage équin *in vitro*.

## **5.4 Identification et caractérisation du macrophage et de ses phénotypes**

Bien que des modèles animaux modifiés génétiquement puissent permettre l'étude du macrophage au cours de la guérison cutanée, il est aussi possible de le faire via des échantillons tissulaires provenant de plaies. Dans ce cas, l'utilisation de marqueurs dirigés contre des récepteurs, des enzymes ou des molécules de signalisation propres aux macrophages est essentielle pour permettre l'étude de ces cellules en situation physiologique ou pathologique.

### **5.4.1 Cytométrie en flux**

Chez le cheval, plusieurs études utilisent la cytométrie en flux pour caractériser le macrophage et ses différents phénotypes. Des anticorps dirigés contre le CD14, le CMH-II, le CD86, le CD172a, le CD163 et le RM (CD206) sont souvent favorisés pour l'étude des macrophages alvéolaires (23-27). Les marqueurs utilisés constituent majoritairement des récepteurs de la membrane cellulaire.

### **5.4.2 Immunohistochimie et immunofluorescence**

Plusieurs anticorps monoclonaux montrant une réactivité croisée chez le cheval ont pu être testés et validés depuis les dernières années. C'est le cas de l'anticorps MAC387 qui a notamment été utilisé pour étudier le processus inflammatoire présent dans l'urticaire récurrente (21), dans la fourbure (32) et dans d'autres études faites sur du tissu nerveux chez le cheval (37, 38). Un autre anticorps qui était couramment utilisé pour marquer les macrophages de façon générale chez le cheval est l'anticorps CD68 clone KP1 mais malheureusement, cet anticorps n'est plus

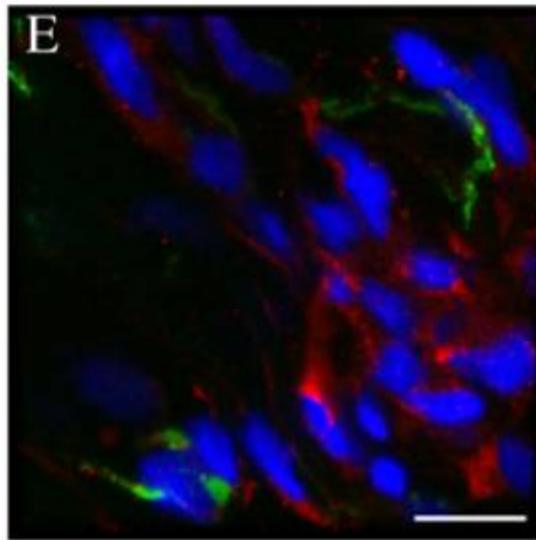
commerciallement disponible aujourd'hui (4). Des anticorps sont aussi disponibles pour le marquage des phénotypes M1 et M2 du macrophage étant considérés comme pro et anti-inflammatoires respectivement. Les principaux anticorps discutés et cités dans la littérature sont présentés dans le tableau II.

**Tableau II. Anticorps ciblant les différents phénotypes du macrophage équin applicables en immunohistochimie et disponibles commercialement**

Phénotype	Anticorps	mAb/pAb	Technique(s)	Validation		Compagnie	Étude(s)
				espèce équine	Tissu équin		
<b>Pan macrophage</b>	MAC387	Souris mAb	IHC	Oui	Peau, cerveau	Bio-Rad	(21, 32, 37, 38)
	CD14 clone 105	Souris mAb	Cytométrie en flux	Oui	Sang périphérique, poumon	Laboratoire Dre Bettina Wagner, Cornell University	(23, 26)
<b>Macrophage M1</b>	CMH-II clone CVS20	Souris mAb	IHC et IF	Oui	Peau, muqueuse nasale et poumon	Novus Biologicals	(31, 57, 114)
	CD86 2331 (FUN-1)	Souris mAb	Cytométrie en flux	Oui	Sang périphérique	BD Biosciences	(24, 25)
	CCR7	Lapin pAb	IHC et IF	Oui		Novus Biologicals	
<b>Macrophage M2</b>	AM-3K	Souris mAb	IHC	Oui	Thymus, rate, nœud lymphatique, foie, poumon, cerveau, moelle épinière, cœur, rein, pancréas, intestin, et peau	Zeng <i>et al.</i> Abnova	(115, 116)
	CD204 clone SRA-E5	Souris mAb	IHC et IF	Oui	Poumon	Cosmo Bio	(117)
	CD206 clone 15-2	Souris mAb	IF	Oui	Tendon	Abcam	(35)

mAb *monoclonal antibody*; pAb, *polyclonal antibody*; IHC, immunohistochimie; IF, immunofluorescence

Afin d'étudier et de documenter la présence de plusieurs phénotypes du macrophage dans un même tissu, il est possible d'effectuer un double marquage en utilisant simultanément un anticorps pour chacun des phénotypes. Un exemple tiré de l'étude de Dakin *et al.* est montré dans la figure 6.



**Figure 6.** Exemple de double marquage, par immunofluorescence, des phénotypes M1 et M2 du macrophage présents lors de la guérison de tendons équins (35). Le fluorochrome rouge représente le phénotype M1 (CD14) alors que le fluorochrome vert représente le phénotype M2 (CD206). La couleur bleue illustre la contre-coloration des noyaux cellulaires à la coloration Hoechst. La barre d'échelle représente 12  $\mu\text{m}$ .

Les anticorps utilisés pour d'autres techniques chez le cheval, par exemple l'anticorps CD14 clone 105 et le CD86 clone 2331(FUN-1) employés pour la cytométrie en flux ou chez d'autres espèces, pourraient peut-être occasionner des résultats positifs en immunohistochimie ainsi qu'en immunofluorescence (23, 24, 26, 33, 118). À ma connaissance, aucune étude immunohistochimique avec ces anticorps ne semblerait avoir été faite chez le cheval, mais je pense que l'obtention de résultats positifs en immunohistochimie avec des anticorps utilisés en cytométrie en flux ou chez d'autres espèces serait possible. Une plus grande validation de la réactivité croisée envers les tissus équins d'anticorps dirigés contre la séquence humaine ou murine serait nécessaire, car la pénurie d'anticorps disponibles commercialement et réagissant sur les

tissus équins constitue un obstacle quotidien empêchant l'approfondissement des connaissances sur l'inflammation et la guérison cutanée chez le cheval.

#### 5.4.2.1 Quantification

La quantification des macrophages marqués par immunohistochimie ou par immunofluorescence est nécessaire pour la réalisation subséquente d'analyses statistiques et ainsi comparer les différences entre plusieurs individus, groupes ou sites anatomiques. Deux types de quantification peuvent être choisis pour la quantification des macrophages à proprement dit ou des molécules produites/libérées par ceux-ci dans la MEC, soit l'estimation par grades semi-quantitatifs ou la quantification à l'aide de logiciels. L'estimation par grades semi-quantitatifs reste la méthode la plus simple à utiliser et est choisie par beaucoup d'auteurs. Dans la plupart des cas, les grades sont établis en fonction du nombre de cellules marquées exprimé en nombre ou en pourcentage et/ou en fonction de l'intensité du marquage (ex : 0 = faible, 1 = forte) (119, 120). Par contre, cette méthode peut être subjective d'un évaluateur à un autre. Lorsque plusieurs phénotypes du macrophage sont présents, certains choisissent d'établir un score pour chaque phénotype, c'est-à-dire un score pour le phénotype M1 et un autre pour le phénotype M2, et d'établir un score qui regroupe les deux phénotypes (121). Des corrélations intra et inter-évaluateurs sont souvent effectuées, à l'aide d'un test de kappa, pour confirmer ou infirmer leur fiabilité (119, 120).

Pour ce qui est de la quantification des macrophages à l'aide de logiciels, plusieurs protocoles existent et peuvent être utilisés en fonction de la présentation des résultats désirée. Certaines études comptent les macrophages pour une aire de tissu définie et présentent les résultats sous forme de nombre de cellules par cm<sup>2</sup> de tissu (57), alors que d'autres utilisent des ratios lors d'un double marquage afin d'éliminer l'aire du tissu comme variable (35). Un nombre grandissant d'études quantifiant les images obtenues en immunohistochimie et en immunofluorescence témoignent de l'importance de bien choisir la méthode de quantification, car la subjectivité lors de l'application de seuils de détection (*threshold*) dans les logiciels et lors de l'établissement des grades semi-quantitatifs peut avoir un impact important sur l'analyse des résultats (122, 123).

## **5.5 Détection des facteurs de croissance, cytokines pro- et anti-inflammatoires, enzymes protéolytiques et des ROS sécrétés dans l'environnement**

La détection de molécules sécrétées dans l'environnement par les macrophages est une bonne méthode aidant à la détermination des rôles du macrophage lors de la guérison cutanée.

### **5.5.1 RT-qPCR**

Les études d'expression génique des molécules sécrétées par les macrophages équins en RT-qPCR ne sont pas nombreuses (111, 112, 124, 125). Les molécules quantifiées sont souvent des transcrits pour des cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IFN $\gamma$  et des cytokines anti-inflammatoires tels que l'IL-10 et l'arginase (111-113, 124).

### **5.5.2 Immunobuvardage de type Western**

L'immunobuvardage de type Western est moins utilisé que la RT-qPCR pour étudier l'expression génique des molécules synthétisées précisément par les macrophages équins. Une des rares études utilisant l'immunobuvardage a mesuré l'expression du TLR5 par les macrophages équins isolés du sang périphérique (125). Il va sans dire que d'autres études utilisant l'immunobuvardage de type Western pour mesurer l'expression de facteurs libérés par les macrophages équins lors de la guérison cutanée seraient nécessaires afin d'approfondir les connaissances sur l'influence de ces médiateurs.

La principale limite concernant l'utilisation de la RT-qPCR et de l'immunobuvardage de type Western pour la quantification des facteurs sécrétés uniquement par les macrophages équins est que ces méthodes s'appliquent uniquement à des études réalisées *in vitro* si une corrélation directe entre les molécules sécrétées et le type cellulaire présent est souhaitée.

## **5.6 Séquençage génomique du macrophage**

Les études ayant comme objet le séquençage génomique du macrophage équin isolé sont aussi une denrée rare. À ma connaissance, deux études ont analysé le protéome et le transcriptome du

macrophage équin (126, 127). La première a étudié le protéome où les macrophages étaient infectés à l'anémie infectieuse équine. Cette étude a permis de découvrir que le niveau d'expression de 210 protéines cellulaires est altéré chez les macrophages équins (127). L'autre étude comparait l'analyse transcriptomique par *microarray assay* des macrophages alvéolaires à celle des macrophages péritonéaux. L'étude a pu conclure qu'une expression basale différente de 451 gènes existe entre les macrophages alvéolaires et péritonéaux équins (126). Une étude analysant le génome et/ou le transcriptome et/ou le protéome des macrophages dermiques équins et la comparaison de celle(s)-ci avec les deux études précédentes serait une avenue intéressante à explorer.

## Résumé

Plusieurs techniques macroscopiques existent pour évaluer l'inflammation, mais une évaluation plus complète nécessite l'inclusion d'une analyse histologique. La fiabilité, la répétabilité et la reproductibilité sont des paramètres critiques au développement de nouvelles méthodes de quantification. Il existe très peu d'anticorps dirigés ou montrant une réaction croisée envers l'espèce équine qui sont disponibles commercialement pour l'immunohistochimie et l'immunofluorescence. Une caractéristique particulière du mastocyte équin est qu'il n'exprime que la tryptase et son rôle dans le processus de la guérison cutanée est controversé. Quelques régions sont à surveiller lors d'un marquage des mastocytes dans la peau, c'est-à-dire la couche sous-épidermique et le derme profond, car ce sont deux régions considérées riches en mastocytes.

Les macrophages résidents et les macrophages dérivés des monocytes ne proviennent pas des mêmes tissus hématopoïétiques et, ainsi, n'expriment pas les mêmes récepteurs. Le macrophage présente 2 principaux phénotypes : le phénotype M1 étant pro-inflammatoire et exprimé en début de la guérison cutanée et le phénotype M2 étant pro-réparateur et exprimé dans la phase tardive de la guérison cutanée. Une mauvaise transition du phénotype M1 au M2 pourrait possiblement occasionner un retard de la guérison cutanée.

## Hypothèses et objectifs

Selon ce qui est connu à ce jour, du développement de méthodes pour quantifier le marquage tissulaire par immunohistochimie et de la contribution du mastocyte et du macrophage à la guérison cutanée chez le cheval, les hypothèses et les objectifs de mon étude sont les suivants :

### Hypothèses

- 1- La méthode de quantification cellulaire développée pour des tissus marqués par immunohistochimie est utilisable à la fois pour un simple et un double marquage.
- 2- Vu l'inflammation chronique présente au niveau des plaies cutanées appendiculaires chez le cheval, un nombre supérieur de mastocytes est attendu tout au long de la guérison et dans toutes les régions de la plaie comparativement à ce qui est observé dans les plaies thoraciques.
- 3- Vu l'inflammation chronique présente au niveau des plaies cutanées appendiculaires chez le cheval :
  - a) Un ratio supérieur en macrophages M1/M2 est attendu à n'importe quelle phase de la guérison et n'importe quelle région de la plaie comparativement à ce qui est observé au niveau des plaies cutanées thoraciques.
  - b) Le ratio macrophages M1/M2 diminue avec la progression de la guérison cutanée pour les plaies thoraciques et appendiculaires, puisqu'il y aurait une transition du phénotype M1 vers le phénotype M2.

### Objectifs

- 1- Développer une méthode de quantification informatique qui serait efficace, reproductible, sans coût et accessible à la communauté scientifique pour l'étude de tissus marqués par immunohistochimie.
- 2- Appliquer la méthode de quantification nouvellement développée pour caractériser le patron temporel et anatomique du mastocyte et des différents phénotypes du macrophage au cours de la guérison cutanée chez le cheval.

## **Résultats : Articles scientifiques**

Soumis comme « Technical note » à Equine Vet J (22 août 2018)

# **Article #1: Development of a computer-based quantification method for immunohistochemically-stained tissues and its application to study mast cells in equine wound healing (proof of concept)**

V. Dubuc\*, S. Laverty<sup>†</sup>, H. Richard<sup>†</sup>, M. Doré, C<sup>¶</sup>. Theoret\*

Affiliations: \*Department of veterinary biomedicine, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

<sup>†</sup>Department of clinical sciences, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

<sup>¶</sup>Department of pathology and microbiology, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

Corresponding author's email address: [christine.theoret@umontreal.ca](mailto:christine.theoret@umontreal.ca)

Key words: horse, immunohistochemistry, mast cell quantification, wound

Word count: 2 499

## **Authors' declaration of interests**

No competing interests have been declared.

## **Ethical animal research**

The protocol follows the guidelines for the care and use of laboratory animals as established by the Canadian Council on Animal Care and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Université de Montréal (# 15-Rech-1811).

## **Source of funding**

The study was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC 250231).

## **Acknowledgements**

The authors want to thank Dr. Emma Marchionatti for help with mast cell quantification (proof of concept) and Dr. Guy Beauchamp for help with statistical analyses.

## **Authorship**

V. Dubuc developed the quantification method, did the manipulations related to the project, analysed the data, wrote the manuscript and participated in its revision. S. Lavery participated in data analysis and revision of the manuscript. H. Richard provided technical support and helped to write the manuscript. M. Doré helped for the validation of the quantification method. C. Theoret developed the study design, participated in data analysis and helped to revise the manuscript. All the authors have accepted the final version of the manuscript.

## Summary

**Background:** The development of a computer-based method should be useful to quantify mast cell numbers in equine exuberant granulation tissue (EGT), which an increase is incriminated in the pathophysiology of the keloid.

**Objectives:** The primary objective was to develop a reliable, reproducible and accessible method for the quantitative study of immunohistochemically-stained tissues. The second objective was to conduct a proof of concept using this method to quantify mast cells during wound healing in horses.

**Study Design:** *In vivo* randomized and controlled study done with archival samples.

**Methods:** Two, full-thickness, excisional skin wounds were created on the forelimb and the thoracic wall of four mixed breed mares (n = 4). Wound margins were sampled on days 2, 7, 14 and 21. Immunohistochemistry (CD117) was performed to study mast cell distribution and number. An ImageJ quantification method was developed from 6 specimens using colour deconvolution and subtraction of unspecific stained areas; and was validated by comparison with traditional manual counting. Mast cells were quantified in the subepidermal, deep dermal layer; and in granulation tissue in 28 specimens, using the newly-developed method.

**Results:** Using our newly-developed ImageJ quantification method, an intra- and interoperator Intraclass correlation coefficient (ICC) of 0.90 ( $p < 0.01$ ) and 0.69 ( $p < 0.01$ ) were found, respectively. An ICC value of 0.67 ( $p < 0.05$ ) was found between the ImageJ method and manual counting. Mast cells were localized below the epidermis, around cutaneous appendages and blood vessels. No significant difference of mast cell numbers was observed in relation to anatomical location or time of healing for healthy wounds.

**Main Limitations:** The small number of horses included in the study.

**Conclusions:** The quantification method developed is reliable, reproducible, available and free. This new tool should facilitate future studies aiming to investigate the cellular contribution to the development of cutaneous fibroproliferative disorders.

## **Introduction**

There is a growing interest in the development of computer-based quantification methods for immunohistochemically-stained tissues. Major problems with new computer-based methods are the complexity of use, expense of software and overly-simplified description of protocol limiting its reproducibility (122). Another challenge is to ensure objectivity by validating the method with appropriate parameters like reliability, repeatability and reproducibility (123). Reliability measures precision or the extent to which test results can be replicated and indicates the magnitude of measurement errors related to the inherent variability of the error-free measurements between subjects (39, 128). A good indicator of reliability is the ICC, which corresponds to the correlation between two measurements made on the same subject (39). Repeatability is the variation of repeated measures made on the same subject in identical conditions, while reproducibility is the same definition but in different conditions (39). The development of new computer-based methods should be useful to quantify cellular populations in equine tissues.

Skin wounds are an important concern in equine practice as they are the most common injury reported by horse owners over a 12 month period in the UK (129). One major complication of wound healing in horses is the development of EGT in limb wounds. EGT is a fibroproliferative pathology consisting of a tumour-like mass characterized by its vascular appearance and the presence of chronic inflammation which prolongs healing (129). EGT exhibits features comparable to human keloid, in which an increase in mast cell numbers has been incriminated in the pathophysiology (5).

Mast cells are immune cells expressing c-kit (CD117) receptor enabling cell communication with fibroblasts and their own chemotaxis, migration and proliferation (66). These cells leave the bone marrow in an immature form and reside in tissue barriers between the host and external environment where they differentiate into mature mast cells (66). Mast cells are known for their involvement in establishing anaphylactic shock during allergic reactions and in helminth infestations. They also secrete histamine and tryptase that increase vascular permeability, as

well as numerous pro- and anti-inflammatory cytokines during wound healing, but their precise role during equine cutaneous wound healing is still unknown (66).

The primary objective of this study was to develop a reliable and reproducible quantification method using a computer software that is widely available, at no cost, to the scientific community for immunostained tissues. The second objective was to test the newly-established method for the quantification of mast cells during healing of skin wounds on the thorax and on the limb of horses. It was hypothesized that mast cell numbers would be greater and would persist in limb wounds throughout healing, since this cell is known to contribute to chronic inflammation in human keloids.

## **Materials and methods**

### *Horses*

Four, mixed breed mares, between 5 and 15 years of age (median of 9 years old), exempt of dermatological disease, skin wounds or scarring, were included. Mares were dewormed and vaccinated and had a two-week acclimation period before the start of the study.

### *Surgical procedure*

This was a controlled and randomized study. In each mare, two, 6 cm<sup>2</sup> and 15 cm<sup>2</sup> full-thickness excisional skin wound were created on one distal forelimb and one thoracic wall, respectively, as described elsewhere (130)[in preparation](Supplementary figure, Fig. 9); intact skin removed during wound creation served as day 0 samples. No anti-inflammatory nor antibiotic drugs were used and wounds were left unbandaged to heal by second intention. Under sedation and local anesthesia, full-thickness samples were harvested with an 8 mm diameter biopsy punch from the edge of the 2 wounds on the limb and on the thoracic wall (alternatively) at days 2, 7, 14 and 21 for a total of 28 specimens. Specimens that did not received any form of treatment, were not bandaged more than 7 days post wounding and did not show clinical signs of EGT were considered healthy whereas, specimens having a granulation elevation score  $\geq 2$

from Bigbie *et al.* scale, inflammation and/or swelling were considered EGT-affected (Supplementary figure, Fig. 9, Tab. V). The specimens used in this study were harvested and archived previously (130)[in preparation](Supplementary figure, Tab. IV, Tab. V).

### ***Fixation technique***

Tissue samples were halved at right angle to the junction between the wound and the intact skin border. One half of each sample was positioned with its flat (cut) surface pressed against the bottom of a histology cassette, then fixed in 10% formalin for a 24 hour period, dehydrated and paraffin-embedded. Four  $\mu\text{m}$  serial sections were taken from the fixed blocks approximately 50  $\mu\text{m}$  apart, orthogonally to the epidermal surface, and mounted on histological slides; and also stained with hematoxylin phloxine saffron (HPS) for manual counting.

### ***Immunohistochemistry for mast cell staining***

A rabbit polyclonal anti-CD117/c-kit (1/87, #RB-9038)<sup>a</sup> was incubated on the sections for 1 hour at room temperature (4, 8, 80, 81). Rabbit serum replaced the primary antibody for the negative control and tissue from an equine mast cell tumour was used as a positive control. A detailed protocol is presented in Supplementary Information 1.

### ***Image analysis and quantification***

Immunostained cells were observed under light microscopy at 200x and scanned with the Panoptiq software program (Panoptiq<sup>TM</sup> v.1.4.3)<sup>b</sup>. Mast cell characterization and quantification was performed by 2 blinded observers and restricted to the subepidermal layer (0-296  $\mu\text{m}$  under basal membrane) and the deep dermal layer (296-1 184  $\mu\text{m}$ ) because these regions are known to be mast cell-rich (9); and the wound granulation tissue. From each region, 5 high power fields (HPFs) were selected randomly and quantified using the ImageJ software program<sup>c</sup>. First, a chosen HPF was opened in the software with its scale bar (Fig. 7a). After scaling, colour deconvolution was applied and the image corresponding to the antibody staining was selected (Fig 7b). Then, the image was transformed into binary, and skin structures unspecifically stained (epidermis, hair follicles, sweat and sebaceous glands, blood vessels) were manually subtracted (Fig 7c and d). Finally, immunostained cells with an area between 8-300  $\mu\text{m}^2$  were

counted by the software and expressed as number of cells/mm<sup>2</sup> (Fig 7e). This range was determined by measuring the area of 3 mast cells (smallest, average and biggest size) present in each of the 6 HPFs taken from the subepidermal layer (2), the deeper dermal layer (2) and the granulation tissue (2) of different horses. Refer to Supplementary Information 2 and 3 for more details. For traditional counting, an ACVP-certified pathologist manually counted mast cells based on nuclear morphology and nucleus/cytoplasm ratio in HPS stained site-matched specimens.

### ***Statistical analysis***

Statistical analysis was done with SPSS software program (SPSS Statistics, v.25)<sup>d</sup> to validate the quantification method by calculating ICCs. The ICC calculated between the ImageJ method and the pathologist-based manual counting method used the mean of the 2 counts done by each method. Statistical analysis of the mast cell quantification was done with SAS software program (SAS, v.9.3)<sup>e</sup>. A linear model for repeated measures was used to detect potential differences relating to time and to anatomical location of the wound (limb vs thorax). A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

## **Results**

Even without bandage, one mare developed EGT on its limb wounds from 11 days post wounding until the end of the study (Supplementary figures, Fig. 9, Tab. IV and V).

An ICC value of 0.67 (p < 0.05) was found between the Image J method and the manual counting as illustrated in Table III. A slight overestimation of mast cell counts was observed with the ImageJ quantification method compared with the pathologist-based manual counting method. An intraoperator ICC of 0.90 (p < 0.01) and an interoperator ICC of 0.69 (p < 0.01) were also found for the computer-based method (Tab. III).

The newly-developed ImageJ counting method was used to quantify mast cells during healing of skin wounds on the thoracic wall and the limb of horses. Observations and quantifications were done on 26 healthy specimens; qualitative results are shown in Fig. 8a. Mast cells localized to the subepidermal and deeper dermal layer were mostly found around hair follicles, sweat and sebaceous glands, and blood vessels. Mast cells were well distributed throughout the

granulation tissue but a high concentration around blood vessels was also observed in this tissue (Fig. 8a).

In the subepidermal and deep dermal layer, mast cell numbers were greater in thoracic wounds and more variations were seen in limb wounds, but these changes were not statistically-significant (Fig. 8b and c). In the granulation tissue, mast cell kinetics between thoracic and limb wounds were similar, except that the magnitude of the reaction seemed inferior in limb wounds (not statistically-significant) (Fig. 8d). The granulation tissue of the EGT-affected mare showed greater mast cell numbers after 7 days and a greater temporal increase in its limb wound, although no statistical analysis was done (Supplementary figure, Fig. 10).

## **Discussion**

The primary objective of this study was to develop a reliable and reproducible quantification method based on a computer software that is widely available, at no cost, to the scientific community, for the quantification of immunohistochemically-stained cells. Overestimation by the ImageJ quantification method compared to the manual counting method may relate to the exclusion of cells, by the pathologist, based on observable morphological parameters that are more selective than the mathematic parameters used by the software program. The intraoperator ICC value confirmed excellent repeatability of the ImageJ method while interoperator ICC value showed good reproducibility (131), suggesting that reliability is improved if the method is used by a single operator. This is likely due to the subjective nature of the manual subtraction step required to delete structures considered to be stained unspecifically (Fig. 7d).

As a proof of concept, the newly-developed ImageJ method was used to quantitate mast cells in the skin wounds of horses. Tissue localization of mast cells in the subepidermal and deep dermal layers agrees with other studies conducted on equine skin (Fig. 8a) (9, 132). However, the scattered distribution with a high concentration around blood vessels within the granulation tissue of equine wounds, as observed here, has, to our knowledge, never been reported (Fig. 8a). The cause of mast cell number variations observed in healthy limb wounds within the subepidermal and deep dermal layer (Fig. 8b and c) is unknown, but the smaller numbers compared to thoracic wounds may explain the weak inflammatory response seen in limb

wounds of horses, refuting our hypothesis (133). The sluggish and weak increase of mast cells in the granulation tissue of healthy limb wounds (Fig. 8d) could be explained by microvascular occlusion caused by endothelial cell hypertrophy seen in equine limb wounds, preventing mast cell migration. It is interesting to note that the increase of mast cells observed in the granulation tissue of the EGT-affected mare's limb wound took twice the time to reach a peak (14 days) compared to the granulation tissue of healthy limb wounds (Fig. 8d, 10), perhaps indicating mast cell migration issues.

The principal limitation of this study is the small number of horses, which may explain why no significant differences were found between limb and thoracic healthy wounds, since mast cell numbers are known to show great variations between horses (132). It could be interesting to have a larger number of healthy and EGT-affected horses so comparisons of mast cell numbers between healthy and EGT-affected limb wounds could be done.

In conclusion, a reliable, reproducible, available and free computer-based method has been developed to quantify immunostained mast cells. This new tool should facilitate future studies aiming to investigate the cellular contribution to the development of cutaneous fibroproliferative disorders, thereby encouraging the development of preventive and therapeutic strategies to control proud flesh in horses.

## **Manufacturer's details**

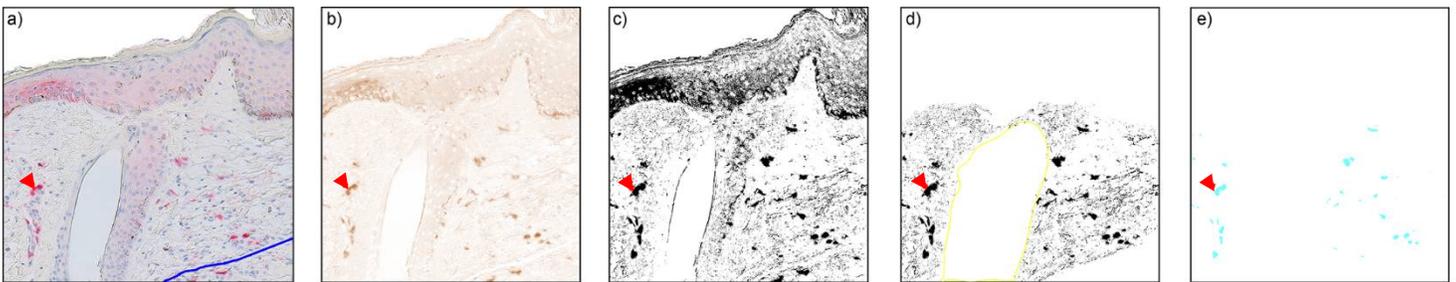
<sup>a</sup> Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

<sup>b</sup> ViewsIQ, Richmond, CAN

<sup>c</sup> U. S. National Institutes of Health, Bethesda, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>

<sup>d</sup> IBM, Armonk, USA

<sup>e</sup> SAS Institute Inc, Cary, USA

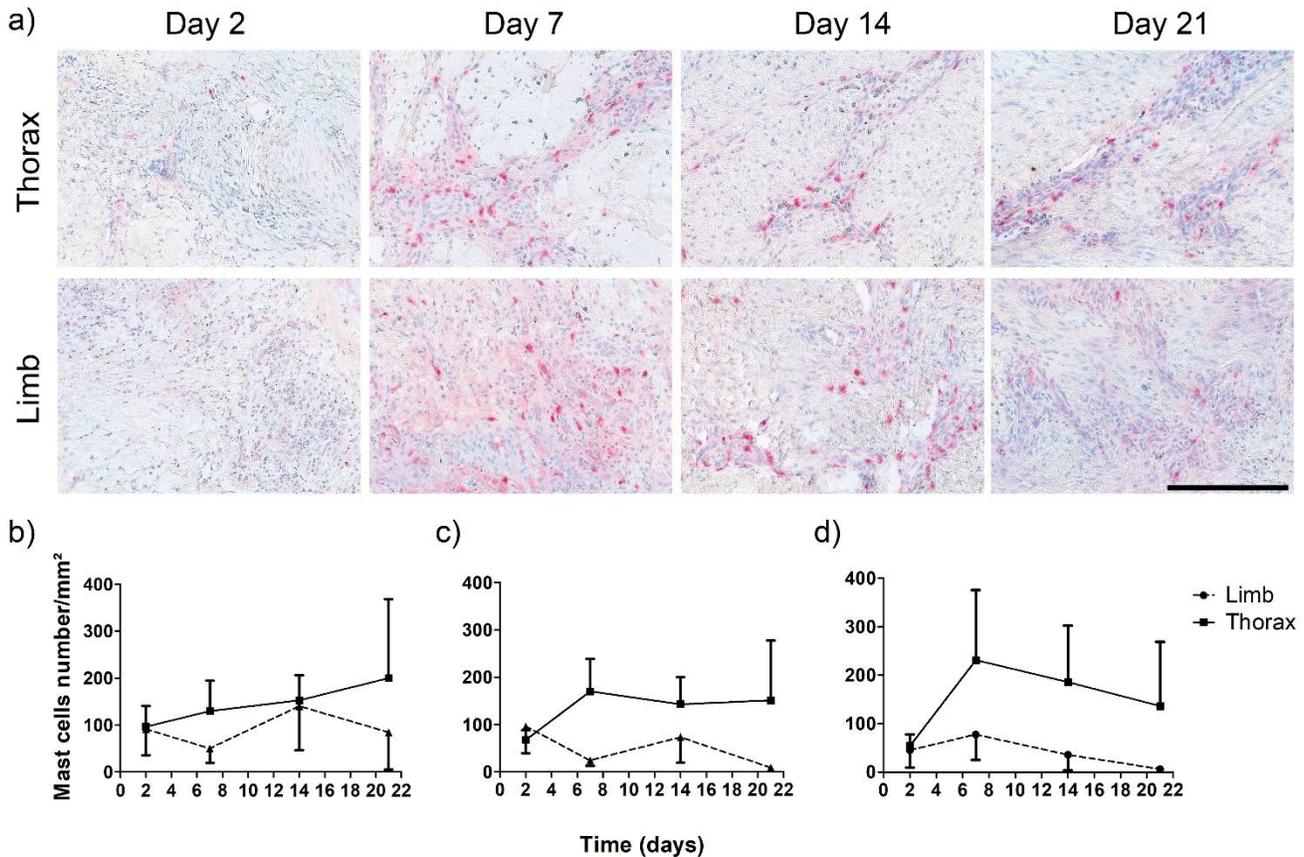


**Figure 7. Principal steps of mast cell quantification protocol using ImageJ software program.** a) Original photo illustrating the subepidermal layer of a one-day old skin wound on the limb. The blue line represents the border between the subepidermal and the deeper dermal layer. b) Staining of CD117+ mast cells after colour deconvolution and c) its binary transformation. d) Manual subtraction of stained skin structures (epidermis, hair follicles, sebaceous and sweat glands, blood vessels); the deeper dermal region below the blue line was also deleted. e) Remaining cells stained by the antibody; blue cells are those included in the count by the software (cell area between 8-300  $\mu\text{m}^2$ ). The original photo was taken at a 200X magnification.  $\blacktriangle$  :example of a stained mast cell.

**Tableau III. Validation of the quantification method using statistical analysis (n =6).**

Comparisons	ICC	p
Same operator	0.902	0.003
Two different operators	0.686	0.006
Mean of ImageJ vs pathologist	0.671	0.042

Pathologist: manual counting; ICC, Intraclass correlation coefficient;  $p < 0.05$  was considered statistically significant



**Figure 8. Photographs and quantification of CD117 positive mast cells stained by immunohistochemistry in equine healthy cutaneous wounds.** a) Photographs showing distribution of CD117+ mast cells in the granulation tissue of a thoracic wound and a limb wound created on the same horse. Scale bar represent 200  $\mu$ m. Graphs showing evolution of mast cells numbers (/mm<sup>2</sup>) over time and anatomical location in the b) subepidermal layer, c) deep dermal layer, and d) granulation tissue. Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 4 for day 2, n = 3 for day 7, 14 and n = 2 for day 21 for limb group; n = 4 for thorax group in subepidermal et deep dermal layer). In the granulation tissue, n = 3 for day 2, n = 2 for day 7, n = 2 for day 14 and n = 1 for day 21 for limb group; and n = 3 for thorax group. No significant difference was observed either for time or for anatomical location according to the linear model used for repeated measures.

## **Supplementary information 1 (for online publication only)**

### **Detailed mast cell immunohistochemistry protocol**

Specimens were dewaxed in xylene (4 x 5 minutes) and rehydrated in alcohol grades from 100% to 70% (2 minutes each). After a 5 minute wash in distilled water, sections were heated in a 1 mM sodium citrate buffer solution at pH = 6.0 (#S464)<sup>b</sup> at 95°C for 30 minutes for antigen unmasking. This step was followed by a cooling period of 15 minutes at room temperature, 3 rinses in distilled water and 3 washes in PBS (3 x 2,5 minutes). Sections were then incubated with 10% goat serum (#053110)<sup>c</sup> prepared in PBS containing 1% w/v BSA for 30 minutes at room temperature to avoid unspecific binding of the secondary antibody. After a brief wash in PBS, an endogenous biotin blocking solution (#X0590)<sup>d</sup> was incubated on the sections as per manufacturer's instructions. A brief wash in PBS was done and a rabbit polyclonal anti-CD117/c-kit (#RB-9038)<sup>a</sup> prepared 1/87 in PBS and 1% w/v BSA was incubated on the sections for 1 hour at room temperature. Rabbit serum replaced the primary antibody for the negative control. After 3 washes in PBS, an IgG goat anti-rabbit secondary antibody conjugated with biotin (#31822)<sup>e</sup> prepared in PBS and 1% w/v BSA was incubated 1/300 on the sections for 45 minutes at room temperature. This was followed by 3 washes in PBS and a 45 minute incubation at room temperature of an alkaline phosphatase solution from a Vectastain® ABC-AP staining kit (AK-5000)<sup>e</sup> prepared according to the manufacturer's instructions. After 3 washes in PBS, sections were incubated with Vector Red (SK-5100)<sup>e</sup> for a period of 20 minutes in the dark and prepared according to the manufacturer instructions. The nuclei were stained with Harris hematoxylin and, finally, slides were mounted with Micromount<sup>f</sup>. An equine mast cell tumour was used as a positive control.

### **Manufacturer's details**

<sup>a</sup> Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA

<sup>b</sup> Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA

<sup>c</sup> Multicell Wisent, St-Bruno, QC, CAN

<sup>d</sup> Dako, Mississauga, ON, USA

<sup>e</sup> Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

<sup>f</sup> Leica Biosystems, Richmond, IL, USA

## Supplementary information 2 (for online publication only)

### Mast cells ImageJ quantification protocol

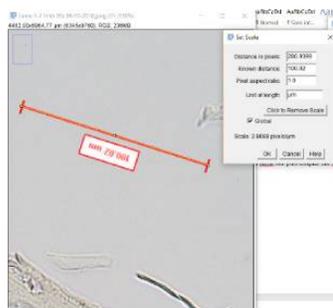
#### 1.0 Mast cell counting

1.1 Open an HPF

1.2 Open the corresponding scale bar, then select the tool

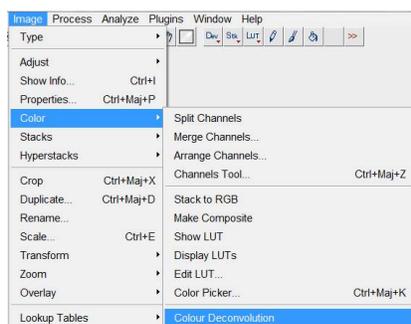


1.3 Trace a line over the scale bar, then click on **Analyze** → **Set a scale**, enter the corresponding length in  $\mu\text{m}$ , check **Global**, then click on **OK**

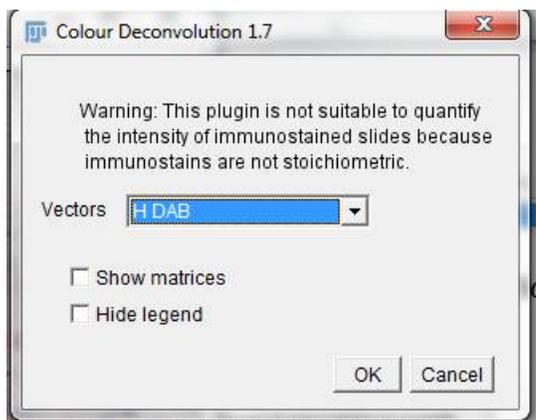


1.4 Dissociate the HPF in 3 colours by clicking on **Image** → **Color** → **Colour**

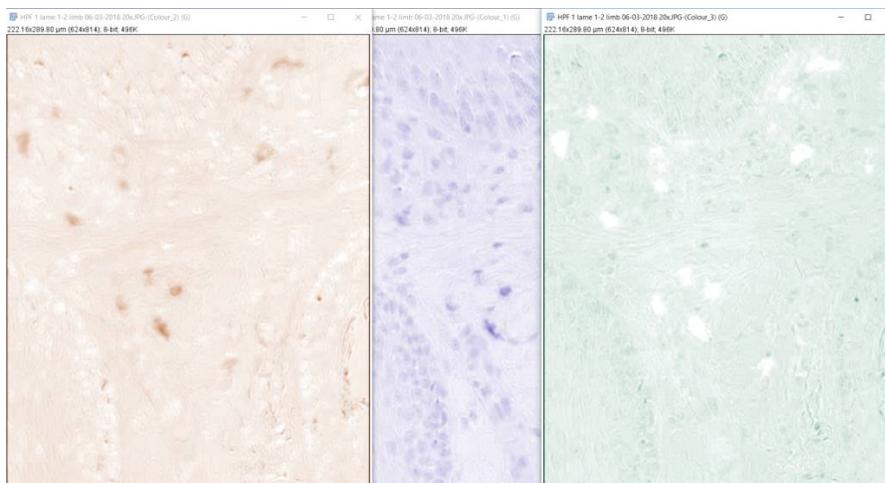
#### Deconvolution



1.5 Select **H DAB** → **OK**



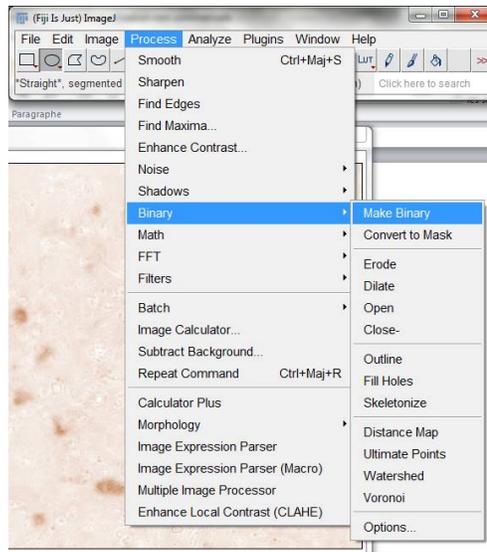
Obtaining 3 images: Color 1 = H&E, Color 2 = DAB



1.6 Choose the DAB image →



1.7 Go in **Process** → **Binary** then click on **Make binary**



Result →

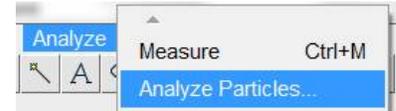


1.8 If epidermis, blood vessels, sweat/sebaceous glands and/or hair follicles are present,

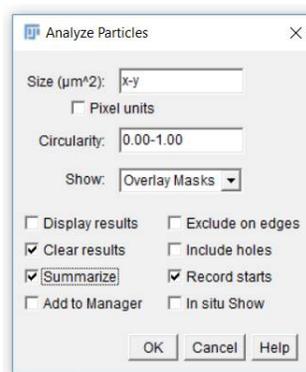
select  and draw around undesirable zones to delete, then click on **Erode** until zones are completely disappeared

1.9 Remove selection and click on **Erode** until background has completely disappeared (only stained cells are remaining)

1.10 Go to **Analyze** and click on **Analyze particles**



1.11 Write the minimal and maximal cell area to consider (**Between 8 et 300  $\mu\text{m}^2$** ), go to **Show**, select **Overlay Masks** and check **Display results**, **Summarize** and **Record stats**  
 → click on *OK*



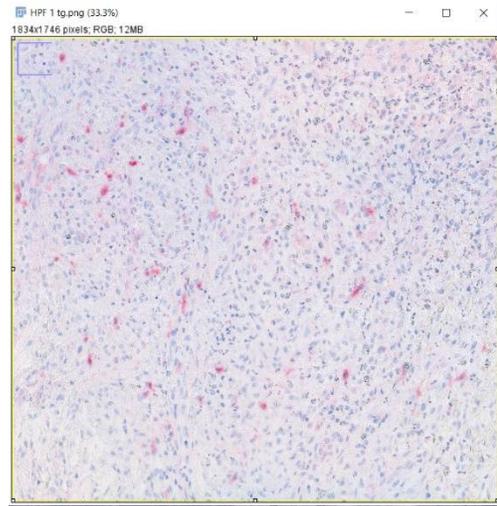
1.12 Result → number of counted cells, % stained surface and others



Slice	Count	Total Area	Average Size	%Area	Me
HPF 1 lame 1-2 limb 06-03-2018 20x.JPG-(Colour_2)	34	225.614	6.636	0.350	25

## 2.0 Mast cell expression in number of mast cells/mm<sup>2</sup>:

- 2.1 Select  or  then draw around HPF borders that just has been quantified, then press **Ctrl + m** to measure the HPF area



	Area	Mean	Min	Max
1	63732.276	0.890	0	255

- 2.2 Transform the area measured in mm<sup>2</sup> (divide the area by 1 000<sup>2</sup> = 1 000 000)

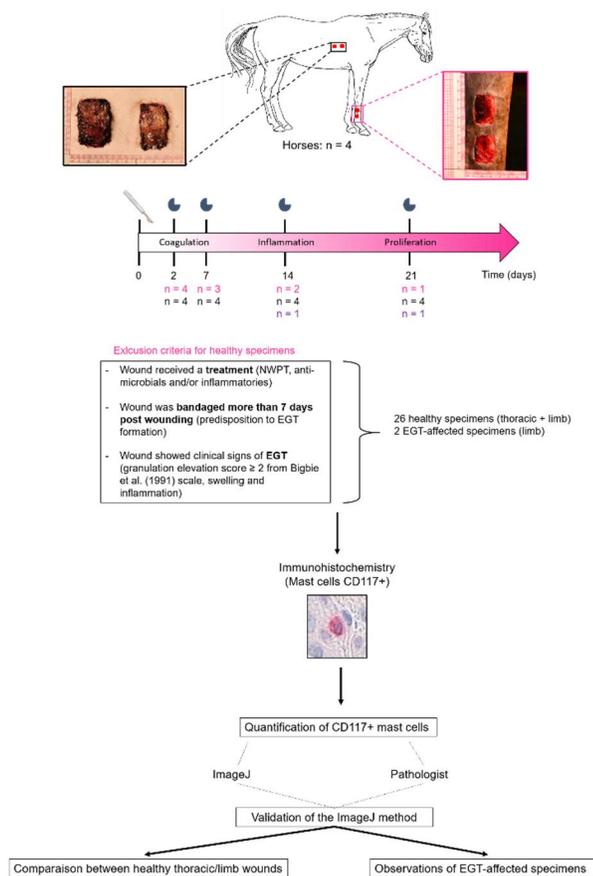
- 2.3 Divide the mast cell number by the area calculated in mm<sup>2</sup>

## Supplementary information 3 (for online publication only)

### Establishment protocol of mast cell area interval

1. Select 6 HPFs taken from different horses and skin layers (2 subepidermal layer, 2 deep dermal layer et 2 from granulation tissue)
2. Open Fiji and click on **File** → **Open** and open an HPF with its scale bar
3. Select the scale bar image and zoom as much as possible
4. Click on  and trace a line over the scale bar
5. Then, click on **Analyze** → **Set a scale** and check on **Global** to make sure the measurement will be applied on the next images
6. Choose the biggest mast cell on the image, then select the tool 
7. Trace mast cell circumference and press **Ctrl + m** to measure its area
8. Repeat steps 6 and 7 for the smallest mast cell on the image, then for an average mast cell
9. Write data in an Excel document
10. Repeat steps 2 to 9 for the other 5 HPFs
11. Test the method on few images that have not been used to establish mast cell areas
12. Establish the range of area to consider

## Supplementary figures (for online publication only)



**Figure 9. Study design.** Two full thickness wounds including epidermis, dermis, hypodermis up to the fascia for thoracic wounds (15 cm<sup>2</sup>) and up to the periosteum for limb wounds (6 cm<sup>2</sup>) were created per anatomical site on 4 mixed breed mares. Wounds healed by second intention and samples were taken alternatively between the two wounds on days 2, 7, 14 and 21. Based on exclusion criteria, a total of 26 healthy (10 from limb wounds (pink) and 16 from thoracic wounds (black)) and 2 exuberant granulation tissue (EGT)-affected specimens (purple), harvested from limb wounds, were included in the study. More detail on the sample collection and macroscopic evaluation is presented in table IV and V. Samples were fixed and paraffin-embedded. Immunohistochemistry was performed to stain mast cells with an CD117/c-kit antibody. Quantification of mast cells was performed with a newly-developed computer-based quantification method using ImageJ software program and with a manual counting done by a pathologist. The ImageJ method was validated after a statistical analysis compared the method with the manual counting. Mast cell number comparisons between healthy wounds on the limb and thorax and observations of the EGT-affected specimens were made. NPWT: negative pressure wound therapy, EGT: exuberant granulation tissue.

**Tableau IV. Numbers and characteristics of the healthy and EGT-affected samples included in the study**

Horse ID	Day of sampling post wounding	Number of specimens included	
		Thoracic wounds	Limb wounds
Horse 1	2	1	1
	7	1	1
	14	1	*
	21	1	*
Horse 2	2	1	1
	7	1	NT
	14	1	NT
	21	1	NT
Horse 3	2	1	1
	7	1	1
	14	1	1
	21	1	N/A
Horse 4	2	1	1
	7	1	1
	14	1	1
	21	1	1
Horse 1	14	N/A	1*
	21	N/A	1*

\*, specimen harvested but EGT-affected; T, specimen excluded because it received a negative wound pressure therapy treatment, N/A, non-applicable, below the red line: EGT-affected specimens.

**Tableau V. Macroscopic evaluation for EGT in limb wounds, using Bigbie *et al.* grading scale**

Horse ID	Day	EGT (presence or absence)	Granulation elevation grade (Bigbie <i>et al.</i> )
Horse 1	2	Absence	N/A
	7	Absence	N/A
	<b>14</b>	<b>Presence</b>	<b>3</b>
	<b>21</b>	<b>Presence</b>	<b>3</b>
Horse 2	2	Absence	N/A
Horse 3	2	Absence	N/A
	7	Absence	N/A
	14	Absence	N/A
	21	Absence	N/A
Horse 4	2	Absence	N/A
	7	Absence	N/A
	14	Possibility	1
	21	Absence	N/A

EGT, exuberant granulation tissue; N/A, non-applicable; Granulation elevation grade : grade 1 = Granulation tissue depressed below the skin edge, grade 2 = Granulation tissue proliferated to the level of skin edge, grade 3 = Granulation tissue elevated above skin edges and grade 4 = Granulation tissue elevated above skin edges, projecting over the border of epithelium (11, 134).

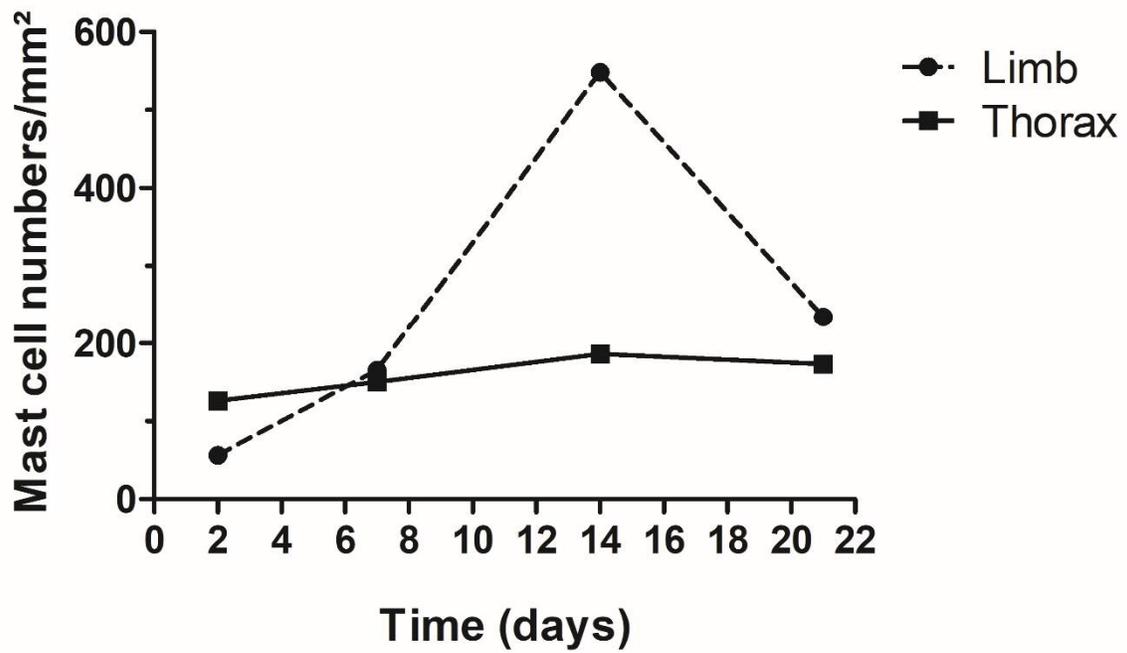


Figure 10. Mast cell numbers in the granulation tissue of the EGT-affected mare.

# **Article #2: Immunohistochemical characterization and quantification of M1 and M2 macrophage phenotypes during equine cutaneous wound healing**

V. Dubuc\*, S. Laverty<sup>†</sup>, H. Richard<sup>†</sup>, M. Doré, C<sup>¶</sup>. Theoret\*

Affiliations: \*Department of veterinary biomedicine, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

<sup>†</sup>Department of clinical sciences, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

<sup>¶</sup>Department of pathology and microbiology, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

Corresponding author's email address: [christine.theoret@umontreal.ca](mailto:christine.theoret@umontreal.ca)

Key words: equine, immunohistochemistry, M1 M2 macrophages, wound

Word count: 2016

## **Authors' declaration of interests**

No competing interests have been declared.

## **Source of funding**

The study was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC 250231).

## **Acknowledgements**

The authors wish to thank Dr. Bettina Wagner's laboratory for providing the CD14 clone 105 antibody as a gift.

## Summary

**Background:** Aberrant transition from M1 to M2 macrophage phenotypes is thought to contribute to the chronic inflammation observed in various inflammatory pathologies and is suspected to contribute to the development of exuberant granulation tissue (EGT) in chronically-inflamed limb wounds of horses.

**Objective:** To characterize and quantify the temporal and anatomical pattern of the M1 and M2 macrophages during equine wound healing in two anatomic locations.

**Study design:** Randomized and controlled study using archival samples.

**Methods:** Two 6 cm<sup>2</sup> and two 15 cm<sup>2</sup> full-thickness skin wounds were created on each distal forelimb and hemithorax, respectively, of four mixed breed mares (n = 4). Samples were harvested alternatively between the two wounds at days 2, 7, 14 and 21 post wounding for a total of 28 specimens. Double immunohistochemistry was performed with M1 (CD86), M2 (CD204) and pan macrophage (CD14) markers to reveal both macrophage phenotypes. Positive staining was quantified by one blinded observer with a previously-developed ImageJ computer-based method.

**Results:** M2 macrophages showed a spindle or rounded shape while general macrophages showed a round, fried-egg or dendritic morphology. Double stain quantification with the ImageJ method did not allow to differentiate CD204 staining from the hematoxylin counterstain. No staining was obtained for the M1 marker.

**Conclusion:** Presence of numerous M1 macrophages is suspected in equine cutaneous wounds because fried-egg and dendritic shapes are known to be associated with an M1 morphology. Future studies should aim to identify antibodies specific to equine tissues to enable further characterization and quantification of macrophage contribution to chronic inflammation and EGT development in the limb wounds of horses.

## Introduction

Equine veterinarians dedicate an important proportion of their practice to wound management. Indeed, wounds are the first cause of death in foals aged less than 6 months in the USA and they are the third cause of consultation and the second cause of euthanasia in Australia (1). Second intention wound healing has 4 major phases: the coagulation, inflammation, proliferation and remodeling phase. The coagulation phase is where a blood clot forms and PDGF and TGF- $\beta$ ; and chemoattractant agents like DAMPs recruit leucocytes (92, 93). The inflammation phase begins with neutrophil's arrival that cleans the wound of pathogens and debris. Macrophages then phagocytose dead neutrophils and secrete pro-inflammatory cytokines like IL-1 and growth factors like VEGF (92, 93). The proliferation phase then starts when a granulation tissue composed of macrophages, endothelial cells and fibroblasts is well established. Proliferation, collagen production by fibroblasts and contraction by myofibroblasts occurs; and keratinocytes proliferates and migrates to close the wound. Finally, the digestion of extra collagen molecules by the MMPs and the generation of an undifferentiated scarring tissue occurs in the remodeling phase (92, 93). It is known that limb wounds do not heal as well as thoracic wounds where rapid inflammatory response and strong contraction occur (133). Limb wounds are more prone to bacterial infections because of their location close the ground. Microvascular occlusion also arises at this site, due to endothelial cell hypertrophy, that may create an hypoxic environment (119). Furthermore, wound contraction is weaker because of the tightness of the skin, which favors epithelization in this anatomic location (13, 77, 129). One major complication of unhealed limb wounds is the chronicity of the inflammatory response and the development of EGT also named "Proud flesh" (133). This fibroproliferative pathology can have important consequences on a horse's quality of life and athletic career since it can cause lameness when synovial structures are damaged; and takes a long time to heal (129). Consequently, clinicians and researchers are interested in understanding the mechanism of chronic inflammation and in investigating ways ensure the inflammatory response is robust and short-lived.

One cell type that may contribute to chronic inflammation is the macrophage. Macrophages are phagocytic cells that clean wounds of debris and dead neutrophils; and participate in antigen presentation via MHC-II and CD86 expression (95). They arrive in the wound 24 to 48h hour

after a trauma and secrete a variety of pro-inflammatory cytokines including IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$ ; and also anti-inflammatory cytokines like IL-10 (95, 98). General macrophages also named as pan macrophages coming from blood circulation express CD14 (CD14<sup>+</sup>CD86 or CD204<sup>-</sup>) while resident dermal macrophages express CD204 (CD14<sup>-</sup>CD204<sup>+</sup>). Macrophages are thought to exhibit two phenotypes depending of the phase of wound healing: M1 macrophages, commonly referred to as “pro-inflammatory”, appear during the early phase of wound healing, secrete pro-inflammatory cytokines and express CD86 (CD14<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>). Subsequently, M2 macrophages, commonly referred to as “pro-healing”, appear during the proliferation phase, secrete anti-inflammatory cytokines and express CD204 (CD14<sup>+</sup>CD204<sup>+</sup>) (98). A disturbed transition of the M1 to the M2 phenotype occurs in pathologies such as diabetes and is thought to contribute to the chronic inflammation identified in the nonhealing wounds of diabetic patients (98, 135). Although, a study has documented macrophage populations in the upper and lower dermis of urticaria-affected equine skin, to the author’s knowledge, no study has documented M1 and M2 kinetics during wound healing in horses (21). As chronic inflammation is often present in cutaneous limb wounds of horses, a superior M1/M2 macrophage ratio is suspected throughout healing in this anatomic location compared to skin on the thorax where healing occurs normally. A decrease of the M1/M2 macrophage ratio is also expected as healing processes since the transition of the inflammatory to the proliferative phase should mirror the transition of the M1 to the M2 phenotype. The objective of this study is to characterize the temporal and anatomic patterns of M1 and M2 macrophages during wound healing in horses, using double immunohistochemistry with an CD86 (M1) and CD204 (M2) antibodies; and a recently developed-ImageJ computer-based quantification method (24, 25, 99, 121, 136).

## **Materials et methods**

### ***Horses***

Four mixed breed mares aged between 5 and 15 years old (median age: 9 years old) exempt of dermatological diseases, wounds or scarring and used in a previous study (130)[in preparation]) were included. Mares were dewormed and vaccinated (tetanus, encephalitis, influenza, rabies)

and had a two-week acclimation period before manipulations began. The protocol followed the guidelines for the care and use of laboratory animals as established by the Canadian Council on Animal Care and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Université de Montréal (# 15-Rech-1811).

### ***Surgical procedure***

This study was controlled and randomized. Skin over the third metacarpal bone and hemithorax was clipped, scrubbed with 2% chlorhexidine gluconate soap and depilated with hair removal cream (Veet, Reckitt Benckiser). Horses were sedated with detomidine hydrochloride (0.01 mg/Kg, intravenously [IV]) and butorphanol tartrate (0.04 mg/Kg, IV); and local anesthesia was done with 2% lidocaine hydrochloride. An inverted L-block was used just below the carpus to desensitize the dorsolateral surface of the cannon while an inverted L-block performed distant from the wounding area desensitized the hemithorax. Two 6 cm<sup>2</sup> and two 15 cm<sup>2</sup> full-thickness skin wounds were created on each distal forelimb and hemithorax of each mare, respectively, as described previously (20). Wounds on the hemithorax were left unbandaged as seen in clinical practice, while wounds on the forelimbs were bandaged for 7 days with a low adherent gauze-like dressing (MELOLITE, Smith & Nephew) covered by cotton wool roll held in place with an adhesive tertiary layer; and then left to heal by second intention without bandage to prevent EGT formation. No anti-inflammatory nor antibiotic drugs were used in the study. Under sedation and local anesthesia, full-thickness tissue samples were alternatively taken from the two wounds at each anatomic location with an 8 mm biopsy punch and included the healing/healed part and the margins of the wounds. Samples were taken at days 2, 7, 14 and 21 post wounding for a total of 28 specimens (Fig. 9). Specimens that did not received any form of treatment, were not bandaged more than 7 days post wounding and did not show clinical signs of EGT were considered healthy whereas, specimens having a granulation elevation score  $\geq 2$  from Bigbie *et al.* scale, inflammation and/or swelling were considered EGT-affected (Fig. 9, Tab. IV and V) (137).

### ***Fixation technique***

Tissue samples were halved at right angle to the junction between the wound and the intact skin border. The resulting flat surface of the samples was placed against the bottom of a histology

cassette and samples were fixed in 10% formalin for a 24-hour period. Samples were then dehydrated overnight in alcohol dips and then paraffin-embedded. Four  $\mu\text{m}$  sections were cut and mounted on histological slides.

### ***Immunohistochemistry for macrophage staining***

Specimens were dewaxed in xylene and rehydrated in alcohol 100% to 70%. Sections were then heated in a 1 mM citrate buffer solution pH = 6.0 (#S4641, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) for 30 minutes to ensure antigen unmasking. This was followed by a cooling down period of 15 minutes at room temperature and 3 rinses in distilled water. Sections were then incubated with 10% goat serum (#053110, Multicell Wisent, St-Bruno, QC) prepared in phosphate buffer saline (PBS) containing 1% w/v bovine serum albumin (BSA) for 30 minutes at room temperature to prevent non-specific binding of the secondary antibody. An endogenous avidin/biotin blocking kit (Dako X0590) was used to prevent non-specific binding of the complex avidin/biotin-alkaline phosphatase-substrate to the sweat and sebaceous glands, hair follicles and wound granulation tissue. To show the presence of the two different phenotypes of macrophages (M1 and M2) in equine wounds, double staining was done with three different primary antibodies. Antibody data and conditions are presented in Table VI. An IgG1 isotype was used as a negative control and incubated in the same conditions as the primary antibodies. After incubation of the primary antibody, an IgG goat anti-mouse secondary antibody conjugated with biotin (BA-9200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) prepared in PBS with 1% BSA w/v (and 5% goat serum for the CD14 antibody) was incubated for 45 minutes at room temperature. Sections were then incubated for 45 minutes at room temperature with an alkaline phosphatase solution from a Vectastain® ABC-AP staining kit (AK-5000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) prepared according to manufacturer's instructions. The first revelation was done with a BCIP/NBT substrate solution (SK-5400, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) incubated on the sections for 20 minutes at room temperature in the dark. After, steps from the goat serum blocking were repeated for the second antibody. The second revelation was done with a Vector Red substrate solution (SK-5100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) prepared according to the manufacturer's instructions and incubated 20 minutes on the sections at room temperature in the dark. Finally, sections were counterstained with Harris hematoxylin and mounted with Micromount (Leica

Biosystems, Richmond, IL, USA). Combinations of the M1/pan, M2/pan and M1/2 markers were done to obtain a double staining. Three different positive controls were used and are shown in Table VI.

### ***Image analysis and quantification***

Immunostained macrophages were observed under light microscopy and scanned at 200x with the Panoptic software program (Panoptiq™ v.1.4.3, ViewsIQ, Richmond, CAN). Descriptive evaluation and quantification were done in 4 regions within the specimens: the subepidermal layer (0- 296 µm under basal membrane), deep dermal layer (296- 1 184 µm), end of the dermal layer (1 184- subcutaneous tissue fatty tissue) and the granulation tissue (21). Quantification of double stained cells was done by a blinded observer with an ImageJ computer-based method developed previously (137) [in preparation].

### ***Statistical analysis***

Statistical analysis was carried out with SAS software program (SAS, v.9.3, SAS Institute Inc, Cary, US). A linear model for repeated measures was used to detect potential differences according to time and anatomical location of the wound (limb vs thorax). A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

## **Results**

Despite several attempts, no positive staining was observed in equine skin with the CD86 antibody used as the M1 marker (CD14<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>); positive staining was seen only in the positive control (Tab. VII). Dilutions from 1/75 to 1/1 000 were tried one hour at RT, one hour at 37°C and ov at 37°C, while dilutions from 1/4 to 1/100 were tried ov at 4°C. Equine spleen and lymph node were tested as potential positive controls, but no staining was observed in lymph node and no to non-specific staining was observed in the spleen (Tab. VII). Triton X-100 was then add to the antibody's preparation solution (PBS with 1% BSA) to help binding of the primary antibody by permeabilizing cell membranes, but no staining was observed in tissue samples from equine wounds. Antibody's solution was also mixed with 5% goat serum to block additional unspecific binding of the secondary antibody, but no improvement was observed.

Different antigen retrieval solutions were then tested to see if the antigen retrieval's choice could improve or worsen the results. Proteinase K, citrate and citrate + proteinase K were used, resulting in a non-specific staining on the positive control. EDTA 1 mM pH = 8.0 and Tris 10 mM EDTA 1 mM pH = 9.0 solutions were also tested for the antigen retrieval step, very pale unspecific staining was obtained with the EDTA 1 mM pH = 8.0 solution while pale staining was obtained with the Tris 10 mM EDTA 1 mM pH = 9.0 solution (Tab. VII). Different times and temperatures of the citrate buffer solution pH = 6.0 were tested (95°C for 30 minutes, 95 °C for 45 minutes and 80°C for 40 minutes) to see if better results could be obtained, but no change was observed. Authors tried to incubate the secondary antibody for 2h at RT instead of 45 minutes, but unspecific staining was obtained. A protocol done without an antigen retrieval and a blocking of endogenous peroxidase step was done, better staining was obtained but was not sufficient for use of this antibody in equine wound tissues (Tab. VII).

Therefore, only data from the double staining with the M2/pan (CD14<sup>+</sup>CD204<sup>+</sup>) markers were studied. M2 macrophages were predominant around blood vessels in all skin regions (Fig. 11). The cellular morphology of M2 macrophages varied between a spindle and rounded shape most of the time while pan macrophages showed a round, “fried-egg” or dendritic morphology (Fig. 12). Resident macrophages showed a spindle or rounded shape (Fig. 12d). The quantification of M2 macrophage (CD14<sup>+</sup>CD204<sup>+</sup>) numbers with a newly developed ImageJ computer-based method failed as the software could not distinguish the CD204 blue staining from the Harris hematoxylin counterstain.

## **Discussion**

Antibodies validated for use in immunohistochemistry of equine tissues are scarce. Authors chose CD86 as an M1 marker because this costimulatory molecule actively contributes to the establishment of an inflammatory response by its binding with CD28 during antigen presentation. CD86 has been studied in human atopic dermatitis, psoriasis and systemic lupus erythematosus in immunohistochemistry (138-142). In equine tissues, CD86 has also been studied to investigate macrophages in *Rhodococcus equi* infected adult horses and foals (24,

25, 143, 144) and lung tissues (117) in flow cytometry and *in vitro* culture of dendritic cells and macrophages (27). In spite of several attempts, no positive staining was obtained with the CD86 antibody used as an M1 marker in this study. The CD86 antibody used in this study has been validated in equine cells by flow cytometry (118), but not in immunohistochemistry to the authors' knowledge. It is now clear that this antibody, basically used in flow cytometry, cannot be used in equine skin for immunohistochemical studies under the conditions tested in this study. However, a Western blot with equine wound tissues should be undertaken to definitively confirm if this antibody can be used in immunohistochemistry for these tissues. More testing of mouse antibodies against human epitopes should be performed and validated in equine tissues to have a better access and use of these antibodies in veterinary medicine.

The perivascular M2 macrophage (CD14<sup>+</sup>CD204<sup>+</sup>) we observed is in agreement with what has been published in the literature concerning macrophages in general (132). The spindle-shaped morphology we observed for M2 macrophages (CD14<sup>+</sup>CD204<sup>+</sup>) is also reported in other species (109, 145-147) and may be associated with collagen-producing cells.

The fried-egg or dendritic morphology observed in many CD14<sup>+</sup>CD204<sup>-</sup> macrophages suggests that numerous M1 macrophages may be present in these wounds. Other immunohistochemical studies using other markers for M1 macrophages should be performed to verify this hypothesis.

Possible alternatives are available to quantify M2 macrophages in the face of the failure of the newly-developed ImageJ computer-based method to distinguish the double staining. First, the reaction could be revealed with a substrate of a different color than blue. One choice could be the Vector Black substrate (148), because the distinction between black, magenta and violet is easier for the software than between blue, magenta and violet. Second, M2 macrophages could be counted manually by a board-certified pathologist on the BCIP/NBT (blue substrate) stained M2 macrophages. The first option could be an interesting alternative since it could expand the applications of the ImageJ quantification method.

In conclusion, the CD86 antibody used in this immunohistochemical study failed to stain M1 macrophages possibly present during equine wound healing. A spindle and round shape were found for equine cutaneous M2 macrophages and numerous M1 macrophages are suspected to be present in these wounds. Future studies should aim to pursue the development and the

validation of mouse monoclonal antibodies in equine tissues, as this could help veterinarians and researchers to further characterize and quantify M1 and M2 macrophage implication in chronically-inflamed tissues, such as skin wounds that are predisposed to the development of EGT.

**Tableau VI. Antibody origin and details for the double immunohistochemistry**

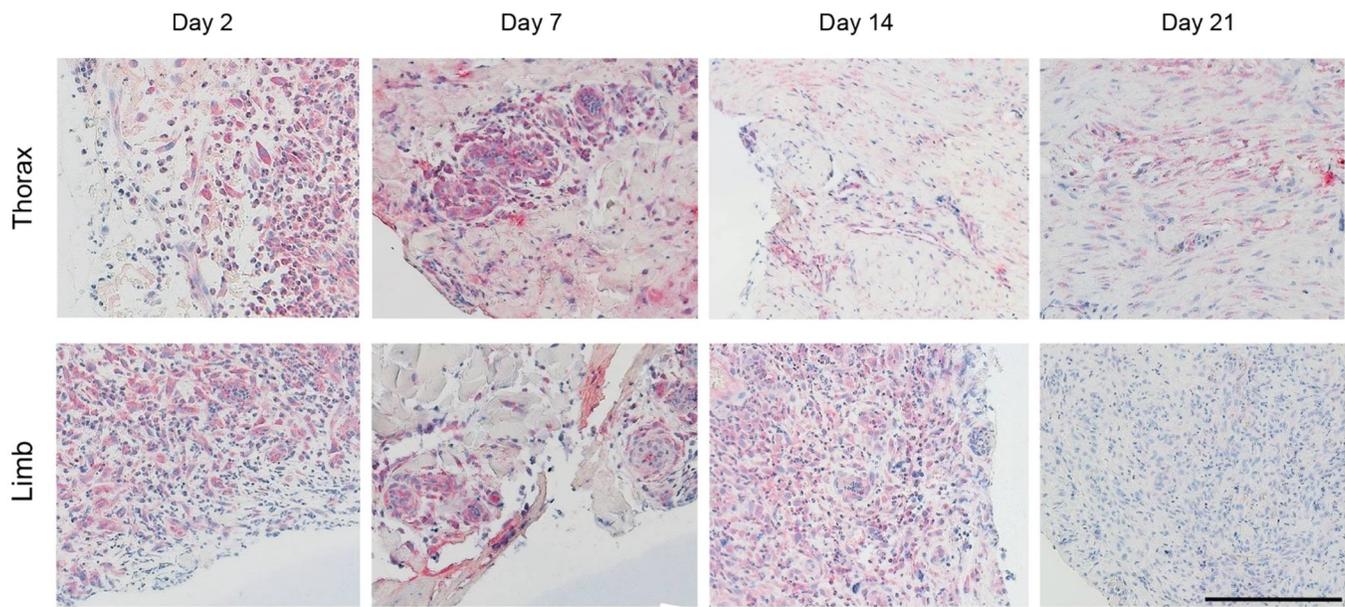
Marker	Antibody	Dilution/incubation	Company	Positive control
Pan macrophages	Mouse monoclonal CD14 clone 105	1/200 ov at 4°C	Dr. Bettina Wagner laboratory, Cornell University	Equine spleen
M1 macrophages	Mouse monoclonal CD86 clone 2331 (FUN-1)	1/500 ov at 37°C	555655 BD Biosciences	Equine bone marrow
M2 macrophages	Mouse monoclonal CD204 clone SRA-E5	1/100 2h at RT	#KT022, Cosmo Bio	Equine mesenteric lymph node
Negative control	Mouse IgG1 isotype	Same as primary antibodies	557273 BD Biosciences	N/A

Ov, overnight; RT, room temperature; N/A, non-applicable

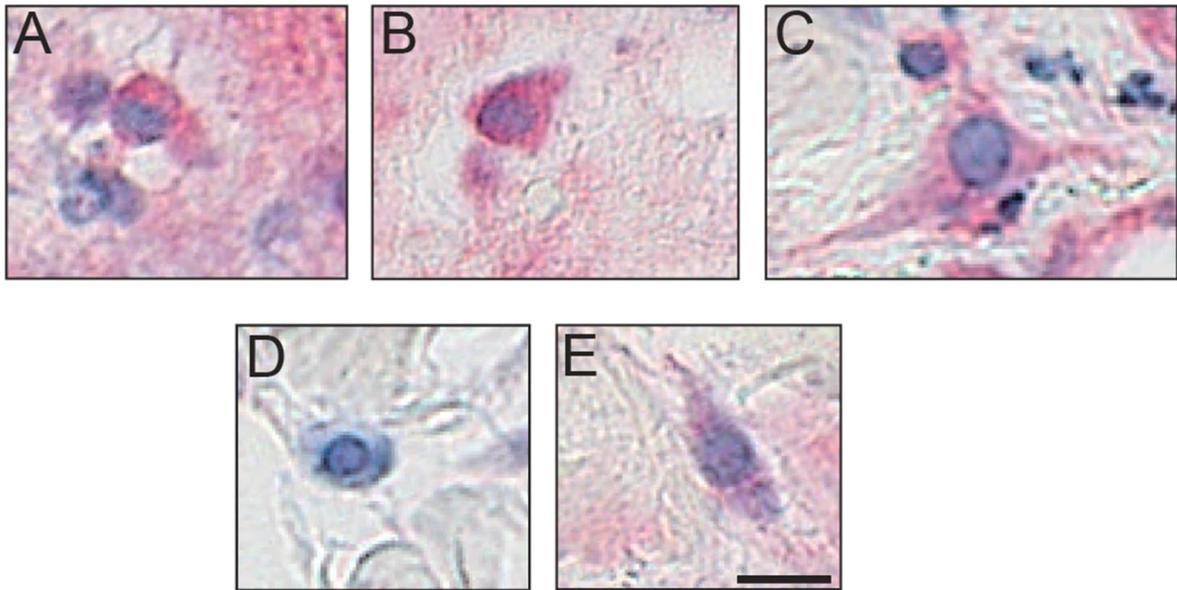
**Tableau VII. Summary of the various tests carried out for the CD86 antibody used as an M1 marker**

Tested condition	Dilution or concentration	Positive control (equine)	Equine wound
<b>Primary antibody 1h at RT</b>	1/75, 1/100, 1/200, 1/400, 1/500, 1/1 000	Spleen: no staining Bone marrow: no staining	No staining
<b>Primary antibody 1h at 37°C</b>	1/75, 1/200, 1/500, 1/1 000	Bone marrow : no staining	No staining
<b>Primary antibody ov at 4°C</b>	1/4, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400	Spleen: Specific and non-specific staining Bone marrow: specific staining	No staining or non-specific staining
<b>Primary antibody ov at 37°C</b>	1/75, 1/200, 1/500, 1/1 000	Bone marrow : specific staining	Strong and non-specific staining
<b>Triton X-100</b>	0,3%	Spleen : no staining	No staining
<b>Goat serum</b>	5%	Bone marrow : no improvement	No improvement
<b>Proteinase K, citrate, citrate + proteinase K</b>	200 µg/mL, 1 mM, 1 M + 200 µg/mL	Spleen: non-specific staining	N/A
<b>EDTA and Tris EDTA</b>	1 mM pH = 8.0, 10 mM and 1 mM pH = 9.0	Bonne marrow: specific staining for both	Non-specific staining and pale staining
<b>Citrate 45 and 30 min at 50°C, 40 min at 80°C</b>	1 mM pH = 6.0	Spleen: no staining	N/A
<b>Secondary antibody 2h at RT</b>	1/100	Spleen: Non-specific staining	N/A
<b>No antigen retrieval or endogenous peroxidase blocking step</b>	N/A	Bone marrow: specific staining	Staining was improved

RT, room temperature; N/A, non-applicable; Ov, overnight.



**Figure 11. Photomicrographs of M2 and pan macrophages double immunohistochemistry in healthy granulation tissue from a cutaneous wound on the limb/thorax of a horse. Scale bar represent 200  $\mu$ m.**



**Figure 12. M2 and pan macrophages cellular morphology.** Pan macrophages ( $CD14^+CD204^-$ ) with a a) round, b) fried-egg or c) dendritic morphology. D)  $CD14^-CD204^+$  had a round shape and were suspected to be resident dermal macrophages. Numerous M2 macrophages ( $CD14^+CD204^+$ ) showed a e) spindle shape morphology. Scale bar represents 10  $\mu m$ .

## Discussion générale

### Développement et validation de la méthode de quantification

La quantification de tissus marqués par immunohistochimie à l'aide de logiciels informatiques est en émergence et est une avenue intéressante pour les chercheurs qui désirent analyser le marquage de façon quantitative (149). La méthode de quantification idéale serait applicable à tous les types de tissus, opérable par du personnel varié et aurait le moins de subjectivité possible. Afin de répondre à cet objectif, la première partie de cette étude consistait à utiliser un logiciel informatique pour développer une méthode de quantification cellulaire efficace, reproductible, sans coût et accessible à la communauté scientifique. Des ICCs ont été calculés afin d'évaluer statistiquement la puissance de la méthode développée (Tableau III). L'ICC comparant les comptages faits par la méthode nouvellement développée et ceux faits par la pathologiste montre une bonne corrélation, évoquant une bonne fiabilité de la méthode ImageJ (39, 131). L'utilisation de la morphologie cellulaire (forme du noyau, ratio noyau/cytoplasme) comme paramètre d'exclusion des cellules du comptage réalisé manuellement par la pathologiste pourrait expliquer la surestimation du nombre de mastocytes comptés par le logiciel. En effet, le logiciel utilise un paramètre mathématique, c'est-à-dire l'aire des cellules marquées, précédemment établie, se situant entre 8 et 300  $\mu\text{m}^2$  (voir *Supplementary information 3* de l'article #1), moins sélectif. Ensuite, l'ICC obtenu par le même opérateur avait une valeur considérée comme excellente dans la littérature (Tableau III) (131). Ce résultat démontre qu'un accord est observé lorsque le même opérateur utilise la méthode plusieurs fois dans les mêmes conditions évoquant ainsi une excellente répétabilité (39). Ensuite, l'ICC obtenu entre deux opérateurs évoque une bonne corrélation (Tableau III), illustrant que lorsque deux opérateurs différents utilisent la méthode, environ le même résultat devrait être trouvé, confirmant une bonne reproductibilité (39). La corrélation plus faible observée entre deux opérateurs par rapport à un seul est sans doute expliquée par la présence de subjectivité lors de l'élimination manuelle de zones considérées indésirables et marquées de façon non-spécifique (Figure 7). L'utilisation de la méthode développée avec ImageJ est efficace et constitue une bonne alternative comme outil de quantification de tissus marqués par immunohistochimie en recherche. Contrairement à d'autres études publiées dans la littérature médicale, le protocole

détaillé de la méthode de quantification est présenté (*Supplementary Information 2*, article #1), le logiciel utilisé est gratuit et peut être utilisé par une variété de personnel. Des ressources en ligne sont disponibles pour soutenir son utilisation (<https://imagej.nih.gov/ij/>); le tout démontrant l'accessibilité de la méthode pour la communauté scientifique. En résumé, le premier objectif a été atteint puisque la méthode de quantification développée dans la présente étude est efficace et accessible, mais semble donner des résultats plus exacts si la méthode est utilisée par un seul opérateur.

## **Caractérisation et quantification des mastocytes au cours de la guérison cutanée chez le cheval**

En guise d'application de la méthode de quantification développée pour des tissus marqués par immunohistochimie, la méthode a été utilisée pour répondre au deuxième objectif de l'étude, c'est-à-dire de caractériser et de quantifier la population de mastocytes présents dans les plaies thoraciques et appendiculaires au cours de la guérison cutanée chez le cheval. En fonction des critères d'exclusion établis pour les spécimens sains présentés dans la figure 9 : présence d'une forme quelconque de traitement, de bandage plus de 7 jours après la création des plaies et de signes cliniques du TGE (score d'élévation du tissu de granulation  $\geq 2$  sur l'échelle de Bigbie *et al.*, inflammation et/ou gonflement); 26 spécimens sains et 2 ayant développé un TGE ont été inclus dans l'étude (Figure 9, Tableau IV et V). Au total, 28 spécimens ont été inclus plutôt que 31, car une des juments a reçu un traitement de pression négative sur ses plaies appendiculaires à partir de 7 jours suivant la création des plaies jusqu'à la fin de l'étude et a dû être exclue (Tableau IV, V). Une autre jument a développé un tissu de granulation exubérant (2 spécimens) et a dû être étudiée à part (Tableau IV, V).

La localisation des mastocytes autour des annexes cutanés et des vaisseaux sanguins est en accord avec ce qui est rapporté dans la littérature pour la région sous-épidermique et le derme profond de peau équine saine (9, 132). Or, l'arrangement dispersé des mastocytes avec une forte concentration périvasculaire au niveau du tissu de granulation n'a jamais été rapporté (Figure

8). Cet arrangement reflète sans doute les différents rôles du mastocyte lors des phases inflammatoire, proliférative, de maturation et de remodelage.

### **Comparaison plaies saines (appendiculaires vs thoraciques)**

La cinétique de la présence des mastocytes de la couche sous-épidermique, du derme profond et du tissu de granulation dans des plaies appendiculaires et thoraciques saines est illustrée dans la Figure 8b, c et d du manuscrit traitant les mastocytes. La réponse inflammatoire plus faible et prolongée que l'on retrouve dans les plaies appendiculaires pourrait être expliquée par le nombre inférieur en mastocytes observé dans ces plaies (Figure 8b, c et d) comme c'est le cas pour les cellules polymorphonucléaires (133). Un facteur pouvant expliquer à la fois la réponse inflammatoire faible et prolongée et le faible nombre de mastocytes observés dans les plaies appendiculaires, est leur localisation près du sol qui les prédispose aux infections, qui elles, contribuent à leur destruction (129). En effet, les leucocytes sécrètent une panoplie de ROS afin de contrer les attaques de nombreux pathogènes et les ROS pourraient contribuer, entre autres, à la destruction des mastocytes ainsi qu'à la destruction de la tryptase sécrétée qui aide à l'instauration de la phase proliférative en dégradant la MEC (84).

De plus, il a été démontré que les cellules endothéliales tapissant les microvaisseaux sont hypertrophiées dans le tissu de granulation des plaies appendiculaires et que cette hypertrophie occasionnerait une microclulsion vasculaire qui elle, serait responsable de l'état hypoxique observé dans ces plaies (119). L'hypertrophie des cellules endothéliales pourrait être un obstacle au processus d'extravasation et ainsi ralentir ou freiner la migration des mastocytes provenant de la moelle osseuse ou d'autres tissus conjonctifs, le tout diminuant et prolongeant davantage la réponse inflammatoire. De plus, il se pourrait que les propriétés vasodilatatrices habituelles de la tryptase et de l'histamine sécrétées par les mastocytes soient inefficaces en présence de cette microclulsion. Même si les mastocytes se trouvent naturellement dans la peau en situation physiologique et qu'ils sont un des premiers leucocytes à arriver à la suite d'un trauma cutané (66), l'inefficacité suspectée de leurs molécules vasodilatatrices en présence de cette microclulsion pourrait avoir des conséquences sur non seulement leur propre recrutement, mais aussi sur le recrutement de cellules inflammatoires qui arrivent plus tardivement, comme les macrophages par exemple. Depuis qu'une étude a démontré que le diamètre des vaisseaux

sanguins des plaies appendiculaires du cheval augmentait après un traitement à un IL-10 viral, il serait intéressant de vérifier si le nombre de mastocytes présents dans les plaies appendiculaires augmente suite à ce traitement et si cela a un effet sur le recrutement des autres leucocytes (150).

Contrairement au nombre de mastocytes situés dans le derme profond et dans le tissu de granulation de plaies thoraciques provenant de chevaux sains, le nombre de mastocytes situés dans la couche sous-épidermique des plaies thoraciques montre une augmentation pendant l'entièreté du processus de guérison (Figure 8b). Les raisons expliquant cette augmentation sont encore inconnues, mais cette observation mène à l'hypothèse que la couche sous-épidermique pourrait agir en tant que « zone de surveillance ». En effet, cette couche pourrait être le premier endroit où les mastocytes s'activent et établissent une réponse inflammatoire en provoquant une vasodilatation et en recrutant d'autres cellules inflammatoires suite à un trauma, car c'est dans cette zone que le nombre le plus élevé en mastocytes se trouve, même en situation physiologique (9).

À ma connaissance, la quantification des mastocytes dans le tissu de granulation lors de guérison cutanée chez le cheval est une première. Les plaies appendiculaires et les plaies thoraciques semblent suivre une cinétique semblable, c'est-à-dire une augmentation du nombre de mastocytes jusqu'à l'atteinte d'une valeur maximale à 7 jours, pour ensuite laisser place à une diminution graduelle jusqu'à la fin de l'étude (Figure 8d). Toutefois, même si aucune différence significative n'a été trouvée, le nombre de mastocytes semble inférieur dans les plaies appendiculaires, pouvant expliquer l'inefficacité de la réponse inflammatoire observée dans les plaies appendiculaires puisque l'augmentation du nombre de mastocytes semble se faire de façon moins importante et abrupte (Figure 8d)(133).

## **Observations plaies atteintes de TGE**

Vu le développement de TGE chez une jument de l'étude, sa cinétique mastocytaire dans le tissu de granulation a été étudiée à part (Figure 10). Il est intéressant de constater que le nombre de mastocytes dans la plaie appendiculaire ayant développé un TGE a non seulement pris 14

jours avant d'atteindre sa valeur maximale (plutôt que 7 dans les plaies appendiculaires n'ayant pas développé de TGE) mais aussi que le nombre de mastocytes semble supérieur par rapport à ce qui est observé dans la plaie thoracique (contrairement à ce qui est observé dans les plaies saines) (Figure 8d). Il serait alors intéressant de comparer la cinétique mastocytaire de plaies appendiculaires saines à celle de plaies appendiculaires où le TGE a été induit, en utilisant un nombre plus élevé de chevaux afin de constater si statistiquement, l'augmentation du nombre de mastocytes se fait de façon plus lente et persiste dans les plaies souffrant de TGE. De plus, il serait intéressant de corréler l'augmentation du nombre de mastocytes avec l'apparition macroscopique de TGE puisque dans la présente étude, l'augmentation du nombre de mastocytes a semblé précéder l'apparition macroscopique du TGE chez la jument atteinte. En faisant cette corrélation, il serait peut-être possible d'établir un moment où un comptage mastocytaire pourrait être fait à partir d'un échantillon tissulaire provenant d'une plaie traumatique et comparé aux valeurs basales de la peau saine du même cheval, à titre prédictif afin de contrer l'apparition du TGE.

## **Perspectives**

L'hypothèse qu'un nombre plus élevé de mastocytes aurait été observé dans les plaies appendiculaires pendant tout le processus de guérison et ce, dans toutes les régions de la plaie, n'a pu être confirmée ou rejetée. Même si, visuellement, un nombre plus élevé en mastocytes semble présent dans les plaies thoraciques saines, aucune différence significative n'a été trouvée. Un nombre plus élevé de mastocytes dans le tissu de granulation de la plaie appendiculaire de la jument atteinte de TGE est apparent, toutefois uniquement à partir de 7 jours et sans analyse statistique à l'appui. Aux vues des observations de cette étude préliminaire de type « preuve de concept », il serait intéressant de répéter avec un nombre plus élevé de plaies saines et de plaies atteintes de TGE afin d'avoir une meilleure représentation statistique de l'importance du mastocyte dans la guérison cutanée et lors du développement de TGE.

Il serait aussi intéressant d'étudier, en culture cellulaire, le mastocyte équin provenant de plaies appendiculaires et thoraciques, pour voir si ses propriétés intrinsèques diffèrent en fonction de l'origine anatomique. La mesure de l'expression génique de l'histamine et de la tryptase

sécrotées dans l'environnement des plaies appendiculaires pourrait être une avenue intéressante afin de constater si l'inefficacité possible de ces molécules sur la dilatation des vaisseaux occlus était due à une diminution de leur sécrétion comparativement aux plaies thoraciques. Pour vérifier cette hypothèse, la première partie d'une étude pourrait mesurer par RT-qPCR et immunobuvardage de type Western la quantité de tryptase et d'histamine produite par des mastocytes appendiculaires et thoraciques stimulés en culture cellulaire. Dans un deuxième temps, une coculture de mastocytes séparés par une membrane d'un réseau de capillaires formé de cellules endothéliales hypertrophiées pourrait être faite (16). Pour induire une hypertrophie des cellules endothéliales en culture cellulaire, un gène de résistance à l'apoptose, soupçonné de permettre la croissance continue des cellules (119), pourrait être inséré dans les cellules. La libération d'histamine et de tryptase sécrétées par les mastocytes appendiculaires stimulés serait mesurée et les changements de l'aire des cellules et du diamètre des vaisseaux en pré- et post-stimulation pourraient être observés, le tout comparé au même système mastocyte-vaisseaux sanguins provenant de plaies thoraciques. Finalement, la quantification du nombre de mastocytes présents dans des plaies appendiculaires saines et atteintes de TGE en présence d'IL-10 viral serait intéressante afin de constater si la migration mastocytaire est améliorée en réponse à une augmentation de la lumière des vaisseaux sanguins (150).

## **Caractérisation et quantification des macrophages de phénotype M1 et M2 au cours de la guérison cutanée chez le cheval**

L'autre partie de cette étude consistait à caractériser et à quantifier le phénotype M1 et M2 du macrophage au cours de la guérison cutanée chez le cheval. Pour se faire, un double marquage M2 (CD204) et pan macrophage (CD14) a été réalisé sur les 28 spécimens (26 sains et 2 ayant développé un TGE) et les cellules marquées ont été quantifiées via la méthode ImageJ développée dans la première partie de l'étude.

## **Anticorps CD86 marquant les macrophages de type M1**

Des tentatives ont été réalisées pour un marquage des macrophages M1 avec l'anticorps CD86, mais aucun résultat n'a été obtenu dans les plaies équines (tableau VII). Le fait que l'anticorps CD86 (M1) n'ait pas montré de marquage positif dans la peau pourrait s'expliquer par le fait que cet anticorps est, à la base, utilisé pour la cytométrie en flux (24, 25) et que la réaction semble être tissu-dépendant puisqu'un marquage positif a été constaté dans un échantillon de moelle osseuse équine utilisée comme contrôle positif. De plus, il se pourrait que les cellules marquées dans la moelle osseuse soient des cellules dendritiques ou des précurseurs communs entre les cellules dendritiques et les macrophages, car ces cellules sont aussi positives pour le CD86 (24, 25). L'anticorps semble reconnaître la séquence équine, mais vu la présence des précurseurs des cellules du système immunitaire dans la moelle osseuse (Figure 4), il semblerait que celui-ci ne requière des conditions aussi précises que dans des tissus où le macrophage se trouve à un stade plus mature, comme la peau (voir tableau VII). Ainsi, un immunobuvardage de Western devrait être effectué afin de confirmer la reconnaissance de la séquence équine par l'anticorps. Bref, l'utilisation de cet anticorps en immunohistochimie sur des tissus cutanés équins pour les conditions testées dans cette étude n'est donc pas recommandée.

## **Disposition et morphologie des pan macrophages et macrophages M2**

La disposition périvasculaire des macrophages généraux ( $CD14^+CD204^-$ ) et des macrophages de phénotype M2 ( $CD14^+CD204^+$ ) est en accord avec ce qui est rapporté en dermatologie équine (Figure 11 et 12) (132). Les macrophages dérivés des monocytes  $CD14^+CD204^{+ou-}$  proviennent de la circulation sanguine puisqu'ils sont produits dans la moelle osseuse et sont recrutés à la suite d'un trauma (Figure 4). Il est donc logique de les retrouver près des vaisseaux sanguins qui sont leur point d'entrée dans les tissus. Concernant la morphologie des différents phénotypes, les résultats sont en accord avec ce qui a été observé chez différentes espèces animales (Figure 12). En effet, les macrophages de phénotype M2 semblent montrer une morphologie fusiforme ou ronde alors que les macrophages de type M1 ont plutôt une forme de type « fried-egg » ou dendritique (109, 145-147). Des études ont démontré que la morphologie des cellules est liée à la polarisation ainsi qu'à la sécrétion de cytokines par les

macrophages et que la morphologie peut varier en fonction des cytokines présentes dans l'environnement et affectant les macrophages. Les raisons expliquant la morphologie fusiforme associée au phénotype M2 sont encore inconnues, mais la similitude observée avec la morphologie des fibroblastes qui sembleraient justement être influencée par la polarisation des macrophages (109) porte à croire que cette morphologie pourrait être associée à des cellules productrices de collagène. Les cellules CD14<sup>-</sup>CD204<sup>+</sup> ayant une morphologie ronde (Figure 12d) semblent correspondre à des macrophages dermiques résidant dans la peau, car l'absence du marquage CD14<sup>+</sup> illustre que ces cellules ne proviennent pas de la circulation sanguine. Par contre, la morphologie cellulaire de type « fried-egg » ou dendritique des potentiels macrophages de phénotype M1 (Figure 12b) pourrait expliquer une de leur fonction pro-inflammatoire en début de guérison cutanée, c'est-à-dire la phagocytose (92). Vu le nombre important de macrophages généraux ayant une forme de type « fried-egg » ou dendritique dans la présente étude, la présence d'un nombre important de macrophages de type M1 (CD14<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>) dans les plaies cutanées du cheval est suspectée.

## Perspectives

Il serait intéressant de répondre à cette hypothèse en faisant un double marquage à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre un marqueur du phénotype M1 validé pour la peau équine en immunohistochimie. De plus, il serait aussi intéressant d'étudier les propriétés intrinsèques des phénotypes M1 et M2 du macrophage équin provenant de la peau (ou de plaies) thoracique et appendiculaire, en culture cellulaire. Cette étude permettrait de voir si les macrophages provenant de plaies appendiculaires réagissent différemment à des facteurs pro- et anti-inflammatoires en l'absence d'influence de facteurs ou cellules autres dans l'environnement. Afin de vérifier cette hypothèse, des macrophages pourraient être prélevés de plaies situées sur chacun des deux sites anatomiques (membre vs thorax) et cultivés *in vitro*. Du GM-CSF ainsi que du LPS et IFN $\gamma$  seraient ajoutés au milieu de culture des macrophages pour l'obtention d'une polarisation vers le phénotype M1 alors que du M-CSF ainsi que de l'IL-4 et IL-13 seraient ajoutés dans le milieu de culture des macrophages où une polarisation vers le phénotype M2 est souhaitée (100, 113). De la microscopie pourrait être utilisée afin d'observer de potentielles différences morphologiques des phénotypes M1 et M2 entre les deux sites

anatomiques. La stimulation des macrophages avec des facteurs pro- et anti-inflammatoires pourraient ensuite être effectuée afin de constater si les macrophages M1 des plaies appendiculaires vs ceux des plaies thoraciques et les macrophages M2 des deux localisations montrent une réponse pro- ou anti-inflammatoire de même amplitude. Des macrophages provenant de plaies souffrant de TGE pourraient aussi être étudiés et comparés avec ceux provenant de plaies appendiculaires saines. Tout comme le mastocyte, le macrophage dermique équin doit faire l'objet d'études permettant l'acquisition de nouvelles connaissances sur ses propriétés intrinsèques afin de mieux prédire son comportement *in vivo* en fonction de sa localisation mais aussi de son phénotype.

La quantification des macrophages à l'aide de la méthode ImageJ n'a pas permis de dresser un portrait temporel et anatomique de ces cellules lors de la guérison cutanée. En effet, l'utilisation d'un substrat de révélation de couleur bleue (BCIP/NBT) et d'un contre-colorant de couleur bleu-violet empêchait la distinction du marquage de l'anticorps CD204 de celui de l'hématoxyline de Harris par le logiciel. Le logiciel faisait alors une surestimation du nombre de macrophages CD14<sup>+</sup>CD204<sup>+</sup>. Dans le cadre d'une future étude, il faudrait refaire les manipulations en changeant le substrat de révélation de couleur bleue par un substrat d'une autre couleur, comme par exemple du *Vector Black* (148). Cette alternative permettrait au logiciel de différencier plus aisément le marquage des cellules CD14<sup>+</sup>CD204<sup>+</sup> et de transmettre des résultats représentatifs de la réalité. Ceci permettrait aussi de valider la méthode de quantification précédemment développée pour un double marquage et ainsi élargir ses applications. Une autre avenue possible pourrait être d'effectuer un comptage manuel par un pathologiste sur les spécimens déjà colorés au BCIP/NBT et au *Vector Red*. L'hypothèse émise proposant que la méthode de quantification serait utilisable pour un simple et double marquage immunohistochimique est partiellement confirmée, dans la présente étude, puisque la méthode a uniquement produit des résultats en simple marquage des mastocytes. Par contre, les hypothèses proposant qu'un ratio en macrophages M1/M2 serait supérieur à n'importe quel temps et localisation anatomique et que ce même ratio diminuerait avec la progression de la guérison dû à la transition de la phase inflammatoire vers la phase proliférative n'ont pu être confirmées ni infirmées.

Des liens entre la cinétique du mastocyte avec celle des différents phénotypes du macrophage en guérison cutanée équine pourront éventuellement être faits lorsque des anticorps spécifiques et des méthodes de quantification à point seront développés et validés.

## Conclusion

La guérison cutanée est un processus complexe impliquant de nombreux types cellulaires et de nombreux facteurs sécrétés dans l'environnement occasionnant des avenues de recherche presque illimitées. La recherche dans le domaine de la guérison cutanée équine vise à trouver des molécules thérapeutiques permettant d'aider les vétérinaires à prévenir et à traiter les pathologies cutanées retrouvées chez le cheval. De plus, les connaissances dans le domaine équin peuvent éventuellement servir en médecine humaine puisque le cheval est un bon modèle de guérison cutanée partageant de nombreuses similitudes avec l'Homme, notamment quant au développement spontané de lésions de nature fibroproliférative. Les trouvailles en recherche permettent aussi d'améliorer le bien-être animal, le but ultime de tout chercheur ou clinicien dans le domaine de la médecine vétérinaire.

La présente étude a permis de développer une méthode de quantification des mastocytes à l'aide du logiciel ImageJ qui est efficace, répétable, reproductible, sans coût et accessible à la communauté scientifique. Un meilleur résultat semble observé lorsque la méthode est utilisée par un seul opérateur. La quantification des mastocytes situés dans les plaies cutanées a pu être réalisée en guise d'application de la méthode. D'autres études comportant un nombre plus élevé de chevaux devraient être faites afin d'avoir une meilleure puissance statistique et ainsi être en mesure de confirmer ou d'infirmer la seconde hypothèse de l'étude.

Les macrophages dermiques équins de phénotype M2 possèdent une morphologie fusiforme ou ronde et la présence de nombreux macrophages de phénotype M1 est suspectée dans les plaies équines vu la morphologie dendritique ou en forme de « fried-egg » observée chez un nombre élevé de cellules CD14<sup>+</sup>. D'autres études seraient nécessaires afin de préciser les caractéristiques intrinsèques du macrophage de phénotype M1 et M2 et afin de quantifier ces différents phénotypes pour établir un patron temporel et anatomique lors de guérison cutanée. Ceci permettrait ainsi de constater si un déséquilibre dans la transition du phénotype M1 vers le phénotype M2 contribue à l'inflammation chronique observée dans des plaies appendiculaires et lors du développement de TGE.

## Bibliographie

1. Agriculture USDo. National Animal Health Monitoring System Part I: Baseline reference of equine health and management 2005 [cited 2017 April 14th]. Available from: [www.aphis.usda.gov/animalhealth/nahms/equine/downloads/equine05/Equine05\\_dr\\_PartI.pdf](http://www.aphis.usda.gov/animalhealth/nahms/equine/downloads/equine05/Equine05_dr_PartI.pdf)
2. Pradhan Nabzdyk L, Kuchibhotla S, Guthrie P, Chun M, Auster ME, Nabzdyk C, et al. Expression of neuropeptides and cytokines in a rabbit model of diabetic neuroischemic wound healing. *Journal of vascular surgery*. 2013;58(3):766-75.e12.
3. Zhu Z, Ding J, Ma Z, Iwashina T, Tredget EE. Systemic depletion of macrophages in the subacute phase of wound healing reduces hypertrophic scar formation. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2016;24(4):644-56.
4. Theoret CL, Olutoye OO, Parnell LK, Hicks J. Equine exuberant granulation tissue and human keloids: a comparative histopathologic study. *Veterinary surgery : VS*. 2013;42(7):783-9.
5. Shaker SA, Ayuob NN, Hajrah NH. Cell talk: a phenomenon observed in the keloid scar by immunohistochemical study. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. 2011;19(2):153-9.
6. Willenborg S, Eming SA. Macrophages - sensors and effectors coordinating skin damage and repair. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*. 2014;12(3):214-21, -23.
7. Rufenacht S, Marti E, von Tschanner C, Doherr MG, Forster U, Welle M, et al. Immunoglobulin E-bearing cells and mast cells in skin biopsies of horses with urticaria. *Veterinary dermatology*. 2005;16(2):94-101.
8. Junginger J, Geburek F, Khan MA, Muller G, Gruber AD, Hewicker-Trautwein M. Cutaneous form of maculopapular mastocytosis in a foal. *Veterinary dermatology*. 2016;27(3):202-e51.
9. Jorgensen E, Lazzarini G, Pirone A, Jacobsen S, Miragliotta V. Normal microscopic anatomy of equine body and limb skin: A morphological and immunohistochemical study. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*. 2018;218:205-12.
10. Academic. Inflammation [updated 2017; cited 2018 July 24th ]. Available from: <https://medicine.academic.ru/4297>
11. Bigbie RB, Schumacher J, Swaim SF, Purohit RC, Wright JC. Effects of amnion and live yeast cell derivative on second-intention healing in horses. *American journal of veterinary research*. 1991;52(8):1376-82.
12. Tsang AS, Dart AJ, Sole-Guitart A, Dart CM, Perkins NR, Jeffcott LB. Comparison of the effects of topical application of UMF20 and UMF5 manuka honey with a generic multifloral honey on wound healing variables in an uncontaminated surgical equine distal limb wound model. *Australian veterinary journal*. 2017;95(9):333-7.
13. Wilmink JM, Nederbragt H, van Weeren PR, Stolk PW, Barneveld A. Differences in wound contraction between horses and ponies: the in vitro contraction capacity of fibroblasts. *Equine veterinary journal*. 2001;33(5):499-505.

14. Watts EJ, Rose MT. Platelet-derived growth factor acts via both the Rho-kinase and p38 signaling enzymes to stimulate contraction in an in vitro model of equine wound healing. *Domestic animal endocrinology*. 2010;38(4):253-9.
15. Deschene K, Celeste C, Boerboom D, Theoret CL. Hypoxia regulates the expression of extracellular matrix associated proteins in equine dermal fibroblasts via HIF1. *Journal of dermatological science*. 2012;65(1):12-8.
16. Dietze K, Slosarek I, Fuhrmann-Selter T, Hopperdietzel C, Plendl J, Kaessmeyer S. Isolation of equine endothelial cells and life cell angiogenesis assay. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2014;58(1):127-46.
17. Aguiar C, Therrien J, Lemire P, Segura M, Smith LC, Theoret CL. Differentiation of equine induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage. *Equine veterinary journal*. 2016;48(3):338-45.
18. Wise LM, Bodaan CJ, Mercer AA, Riley CB, Theoret CL. Orf virus interleukin-10 and vascular endothelial growth factor-E modulate gene expression in cultured equine dermal fibroblasts. *Veterinary dermatology*. 2016;27(5):434-e114.
19. Bussche L, Harman RM, Syracuse BA, Plante EL, Lu YC, Curtis TM, et al. Microencapsulated equine mesenchymal stromal cells promote cutaneous wound healing in vitro. *Stem cell research & therapy*. 2015;6:66.
20. 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. *Veterinary surgery : VS*. 2001;30(3):269-77.
21. Hinden S, Klukowska-Rotzler J, Janda J, Marti EI, Gerber V, Roosje PJ. Characterization of the inflammatory infiltrate and cytokine expression in the skin of horses with recurrent urticaria. *Veterinary dermatology*. 2012;23(6):503-e99.
22. Martano M, Corteggio A, Restucci B, De Biase ME, Borzacchiello G, Maiolino P. Extracellular matrix remodeling in equine sarcoid: an immunohistochemical and molecular study. *BMC veterinary research*. 2016;12:24.
23. Kabithe E, Hillegas J, Stokol T, Moore J, Wagner B. Monoclonal antibodies to equine CD14. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2010;138(1-2):149-53.
24. Flaminio MJ, Borges AS, Nydam DV, Horohov DW, Hecker R, Matychak MB. The effect of CpG-ODN on antigen presenting cells of the foal. *Journal of immune based therapies and vaccines*. 2007;5:1.
25. Flaminio MJ, Nydam DV, Marquis H, Matychak MB, Giguere S. Foal monocyte-derived dendritic cells become activated upon *Rhodococcus equi* infection. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2009;16(2):176-83.
26. Karagianni AE, Kapetanovic R, McGorum BC, Hume DA, Pirie SR. The equine alveolar macrophage: functional and phenotypic comparisons with peritoneal macrophages. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2013;155(4):219-28.
27. Mael S, Steinbach F, Ludwig H. Monocyte-derived dendritic cells from horses differ from dendritic cells of humans and mice. *Immunology*. 2006;117(4):463-73.
28. Cytometry ISfAo. What is cytometry? 2018 [cited 2018 August 30th]. Available from: <http://isac-net.org/About/What-is-Cytometry.aspx>.
29. Oliver C, Jamur MC. *Immunocytochemical Methods and Protocols*: Humana Press; 2012.
30. Singh Suri S, Janardhan KS, Parbhakar O, Caldwell S, Appleyard G, Singh B. Expression of toll-like receptor 4 and 2 in horse lungs. *Veterinary research*. 2006;37(4):541-51.

31. Baghi HB, Laval K, Favoreel H, Nauwynck HJ. Isolation and characterization of equine nasal mucosal CD172a + cells. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2014;157(3-4):155-63.
32. Faleiros RR, Nuovo GJ, Belknap JK. Calprotectin in myeloid and epithelial cells of laminae from horses with black walnut extract-induced laminitis. *Journal of veterinary internal medicine*. 2009;23(1):174-81.
33. Fidalgo-Carvalho I, Craigo JK, Barnes S, Costa-Ramos C, Montelaro RC. Characterization of an equine macrophage cell line: application to studies of EIAV infection. *Veterinary microbiology*. 2009;136(1-2):8-19.
34. Brandt S, Tober R, Corteggio A, Burger S, Sabitzer S, Walter I, et al. BPV-1 infection is not confined to the dermis but also involves the epidermis of equine sarcoids. *Veterinary microbiology*. 2011;150(1-2):35-40.
35. Dakin SG, Werling D, Hibbert A, Abayasekara DR, Young NJ, Smith RK, et al. Macrophage sub-populations and the lipoxin A4 receptor implicate active inflammation during equine tendon repair. *PloS one*. 2012;7(2):e32333.
36. Sano Y, Matsuda K, Okamoto M, Takehana K, Hirayama K, Taniyama H. Distribution of CD163-positive cell and MHC class II-positive cell in the normal equine uveal tract. *The Journal of veterinary medical science*. 2016;78(2):287-91.
37. Delcambre GH, Liu J, Herrington JM, Vallario K, Long MT. Immunohistochemistry for the detection of neural and inflammatory cells in equine brain tissue. *PeerJ*. 2016;4:e1601.
38. Delcambre GH, Liu J, Streit WJ, Shaw GPJ, Vallario K, Herrington J, et al. Phenotypic characterisation of cell populations in the brains of horses experimentally infected with West Nile virus. 2017;49(6):815-20.
39. Bartlett JW, Frost C. Reliability, repeatability and reproducibility: analysis of measurement errors in continuous variables. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2008;31(4):466-75.
40. Sorensen MA, Petersen LJ, Bundgaard L, Toft N, Jacobsen S. Regional disturbances in blood flow and metabolism in equine limb wound healing with formation of exuberant granulation tissue. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2014;22(5):647-53.
41. Bundgaard L, Bendixen E, Sorensen MA, Harman VM, Beynon RJ, Petersen LJ, et al. A selected reaction monitoring-based analysis of acute phase proteins in interstitial fluids from experimental equine wounds healing by secondary intention. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2016;24(3):525-32.
42. Zava S, Barello C, Pessione A, Garoffo LP, Fattori P, Montorfano G, et al. Mare's colostrum globules stimulate fibroblast growth in vitro: a biochemical study. *Journal of medicinal food*. 2009;12(4):836-45.
43. Galera PD, Ribeiro CR, Sapp HL, Coleman J, Fontes W, Brooks DE. Proteomic analysis of equine amniotic membrane: characterization of proteins. *Veterinary ophthalmology*. 2015;18(3):198-209.
44. Goodrich LR, Moll HD, Crisman MV, Lessard P, Bigbie RB. Comparison of equine amnion and a nonadherent wound dressing material for bandaging pinch-grafted wounds in ponies. *American journal of veterinary research*. 2000;61(3):326-9.

45. De Keyser K, Berth M, Christensen N, Willaert S, Janssens S, Ducatelle R, et al. Assessment of plasma anti-elastin antibodies for use as a diagnostic aid for chronic progressive lymphoedema in Belgian Draught Horses. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2015;163(1-2):16-22.
46. Morgan EE, Miller WH, Jr., Wagner B. A comparison of intradermal testing and detection of allergen-specific immunoglobulin E in serum by enzyme-linked immunosorbent assay in horses affected with skin hypersensitivity. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2007;120(3-4):160-7.
47. Singh BK, Ahuja S, Gulati BR. Development of a neutralizing monoclonal antibody-based blocking ELISA for detection of equine herpesvirus 1 antibodies. *Veterinary research communications*. 2004;28(5):437-46.
48. Wagner B, Childs BA, Erb HN. A histamine release assay to identify sensitization to *Culicoides* allergens in horses with skin hypersensitivity. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2008;126(3-4):302-8.
49. Schurink A, van der Meide NM, Savelkoul HF, Ducro BJ, Tijhaar E. Factors associated with *Culicoides Obsoletus* complex spp.-specific IgE reactivity in Icelandic horses and Shetland ponies. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 2014;201(3):395-400.
50. Carter CA, Jolly DG, Worden CE, Sr., Hendren DG, Kane CJ. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Experimental and molecular pathology*. 2003;74(3):244-55.
51. de la Rebiere de Pouyade G, Riggs LM, Moore JN, Franck T, Deby-Dupont G, Hurley DJ, et al. Equine neutrophil elastase in plasma, lamellar tissue, and skin of horses administered black walnut heartwood extract. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2010;135(3-4):181-7.
52. Janda J, Plattet P, Torsteinsdottir S, Jonsdottir S, Zurbriggen A, Marti E. Generation of equine TSLP-specific antibodies and their use for detection of TSLP produced by equine keratinocytes and leukocytes. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2012;147(3-4):180-6.
53. Jonsdottir S, Hamza E, Janda J, Rhyner C, Meinke A, Marti E, et al. Developing a preventive immunization approach against insect bite hypersensitivity using recombinant allergens: A pilot study. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2015;166(1-2):8-21.
54. Riggs LM, Franck T, Moore JN, Krunkosky TM, Hurley DJ, Peroni JF, et al. Neutrophil myeloperoxidase measurements in plasma, lamellar tissue, and skin of horses given black walnut extract. *American journal of veterinary research*. 2007;68(1):81-6.
55. Mattil-Fritz S, Scharner D, Piuko K, Thones N, Gissmann L, Muller H, et al. Immunotherapy of equine sarcoid: dose-escalation trial for the use of chimeric papillomavirus-like particles. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 1):138-47.
56. Monteiro SO, Lepage OM, Theoret CL. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. *American journal of veterinary research*. 2009;70(2):277-82.
57. Bodaan CJ, Wise LM, Wakelin KA, Stuart GS, Real NC, Mercer AA, et al. Short-term treatment of equine wounds with orf virus IL-10 and VEGF-E dampens inflammation and promotes repair processes without accelerating closure. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2016;24(6):966-80.

58. Textor JA, Clark KC. Allogeneic Stem Cells Alter Gene Expression and Improve Healing of Distal Limb Wounds in Horses. 2017.
59. Turabelidze A, Guo S, DiPietro LA. Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society.* 2010;18(5):460-6.
60. de Jonge HJ, Fehrmann RS, de Bont ES, Hofstra RM, Gerbens F, Kamps WA, et al. Evidence based selection of housekeeping genes. *PloS one.* 2007;2(9):e898.
61. Ruedrich ED, Henzel MK, Hausman BS, Bogie KM. Reference gene identification for reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction analysis in an ischemic wound-healing model. *Journal of biomolecular techniques : JBT.* 2013;24(4):181-6.
62. Pemberton AD, McEuen AR, Scudamore CL. Characterisation of tryptase and a granzyme H-like chymase isolated from equine mastocytoma tissue. *Veterinary immunology and immunopathology.* 2001;83(3-4):253-67.
63. Vecchione A, Catchpole B, D'Mello F, Kanellos T, Hamblin A. Modulating immune responses with dendritic cells: an attainable goal in veterinary medicine? *Veterinary immunology and immunopathology.* 2002;87(3-4):215-21.
64. Schnabel CL, Wagner S, Wagner B, Duran MC, Babasyan S, Nolte I, et al. Evaluation of the reactivity of commercially available monoclonal antibodies with equine cytokines. *Veterinary immunology and immunopathology.* 2013;156(1-2):1-19.
65. Harman RM, Yang S, He MK, Van de Walle GR. Antimicrobial peptides secreted by equine mesenchymal stromal cells inhibit the growth of bacteria commonly found in skin wounds. *Stem cell research & therapy.* 2017;8(1):157.
66. Ng MF. The role of mast cells in wound healing. *International wound journal.* 2010;7(1):55-61.
67. Weller CL, Collington SJ, Williams T, Lamb JR. Mast cells in health and disease. *Clinical science (London, England : 1979).* 2011;120(11):473-84.
68. Collington SJ, Williams TJ, Weller CL. Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissues. *Trends in immunology.* 2011;32(10):478-85.
69. Tsurusaki S, Tahara-Hanaoka S, Shibagaki S, Miyake S, Imai M, Shibayama S, et al. Allergen-1 inhibits TLR2-mediated mast cell activation and suppresses dermatitis. *International immunology.* 2016;28(12):605-9.
70. Wulff BC, Parent AE, Meleski MA, DiPietro LA, Schrementi ME, Wilgus TA. Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing. *The Journal of investigative dermatology.* 2012;132(2):458-65.
71. Kawarai S, Masuda K, Ohmori K, Matsuura S, Yasuda N, Nagata M, et al. Cultivation and characterization of canine skin-derived mast cells. *The Journal of veterinary medical science.* 2010;72(2):131-40.
72. Chen L, Schrementi ME, Ranzer MJ, Wilgus TA, DiPietro LA. Blockade of mast cell activation reduces cutaneous scar formation. *PloS one.* 2014;9(1):e85226.
73. Younan GJ, Heit YI, Dastouri P, Kekhia H, Xing W, Gurish MF, et al. Mast cells are required in the proliferation and remodeling phases of microdeformational wound therapy. *Plastic and reconstructive surgery.* 2011;128(6):649e-58e.
74. Egozi EI, Ferreira AM, Burns AL, Gamelli RL, Dipietro LA. Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. *Wound repair and*

regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2003;11(1):46-54.

75. Iba Y, Shibata A, Kato M, Masukawa T. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. *International immunopharmacology*. 2004;4(14):1873-80.

76. Nauta AC, Grova M, Montoro DT, Zimmermann A, Tsai M, Gurtner GC, et al. Evidence that mast cells are not required for healing of splinted cutaneous excisional wounds in mice. *PloS one*. 2013;8(3):e59167.

77. Theoret CL, Wilmlink JM. Aberrant wound healing in the horse: naturally occurring conditions reminiscent of those observed in man. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2013;21(3):365-71.

78. Gallant-Behm CL, Hildebrand KA, Hart DA. The mast cell stabilizer ketotifen prevents development of excessive skin wound contraction and fibrosis in red Duroc pigs. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2008;16(2):226-33.

79. Auxilia ST, Hill PB. Mast cell distribution, epidermal thickness and hair follicle density in normal canine skin: possible explanations for the predilection sites of atopic dermatitis? *Veterinary dermatology*. 2000;11:247-54.

80. Seeliger F, Hess O, Propsting MJ, Naim HY, Kleinschmidt S, Woehrmann T, et al. Confocal laser scanning analysis of an equine oral mast cell tumor with atypical expression of tyrosine kinase receptor C-KIT. *Veterinary pathology*. 2007;44(2):225-8.

81. Ressel L, Ward S, Kipar A. Equine Cutaneous Mast Cell Tumours Exhibit Variable Differentiation, Proliferation Activity and KIT Expression. *Journal of comparative pathology*. 2015;153(4):236-43.

82. Ranieri G, Marech I, Pantaleo M, Piccinno M, Roncetti M, Mutinati M, et al. In vivo model for mastocytosis: A comparative review. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2015;93(3):159-69.

83. Bauer K, Hadzijasufovic E, Cerny-Reiterer S, Hoermann G, Reifinger M, Pirker A, et al. IL-4 downregulates expression of the target receptor CD30 in neoplastic canine mast cells. 2017;15(4):1240-56.

84. Douaiher J, Succar J, Lancerotto L, Gurish MF, Orgill DP, Hamilton MJ, et al. Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing. *Advances in immunology*. 2014;122:211-52.

85. Kube P, Audige L, Kuther K, Welle M. Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques. *Histochemistry and cell biology*. 1998;110(2):129-35.

86. van der Haegen A, Griot-Wenk M, Welle M, Busato A, von Tschanner C, Zurbriggen A, et al. Immunoglobulin-E-bearing cells in skin biopsies of horses with insect bite hypersensitivity. *Equine veterinary journal*. 2001;33(7):699-706.

87. Clarke L, Simon A, Ehrhart EJ, Mulick J, Charles B, Powers B, et al. Histologic characteristics and KIT staining patterns of equine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary pathology*. 2014;51(3):560-2.

88. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in immunology*. 2014;5:514.

89. Minutti CM, Knipper JA, Allen JE, Zaiss DM. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Seminars in cell & developmental biology*. 2017;61:3-11.
90. Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK, et al. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *The American journal of pathology*. 2015;185(10):2596-606.
91. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker research*. 2014;2(1):1.
92. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *The Journal of investigative dermatology*. 2007;127(3):514-25.
93. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in cell biology*. 2005;15(11):599-607.
94. Brancato SK, Albina JE. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *The American journal of pathology*. 2011;178(1):19-25.
95. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*. 2011;13:e23.
96. Willenborg S, Lucas T, van Loo G, Knipper JA, Krieg T, Haase I, et al. CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood*. 2012;120(3):613-25.
97. Daley JM, Brancato SK, Thomay AA, Reichner JS, Albina JE. The phenotype of murine wound macrophages. *Journal of leukocyte biology*. 2010;87(1):59-67.
98. Hesketh M, Sahin KB, West ZE, Murray RZ. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(7).
99. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 2002;23(11):549-55.
100. Yamane K, Leung KP. Rabbit M1 and M2 macrophages can be induced by human recombinant GM-CSF and M-CSF. *FEBS open bio*. 2016;6(9):945-53.
101. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(12):958-69.
102. Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Muller W, et al. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;184(7):3964-77.
103. Anderson KL, Smith KA, Connors K, McKercher SR, Maki RA, Torbett BE. Myeloid development is selectively disrupted in PU.1 null mice. *Blood*. 1998;91(10):3702-10.
104. Goren I, Allmann N, Yogev N, Schurmann C, Linke A, Holdener M, et al. 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. *The American journal of pathology*. 2009;175(1):132-47.
105. Martin P, D'Souza D, Martin J, Grose R, Cooper L, Maki R, et al. Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Current biology : CB*. 2003;13(13):1122-8.
106. Chen L, Nagaraja S, Zhou J, Zhao Y, Fine D, Mitrophanov AY, et al. Wound healing in Mac-1 deficient mice. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2017;25(3):366-76.

107. Yoshida N, Frickel EM, Mostowy S. Macrophage-Microbe Interactions: Lessons from the Zebrafish Model. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1703.
108. Werners AH, Bull S, Fink-Gremmels J, Bryant CE. Generation and characterisation of an equine macrophage cell line (e-CAS cells) derived from equine bone marrow cells. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2004;97(1-2):65-76.
109. Ploeger DT, Hosper NA, Schipper M, Koerts JA, de Rond S, Bank RA. Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. *Cell communication and signaling : CCS*. 2013;11(1):29.
110. Wijnker JJ, Bull S, Van Dijk P, Veenman JN, Rutten VP, Klein WR, et al. Modulation of the cytokine responses in equine macrophages following TACE-inhibition. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2004;99(3-4):237-43.
111. Cavatorta DJ, Erb HN, Flaminio MJ. Ex vivo generation of mature equine monocyte-derived dendritic cells. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2009;131(3-4):259-67.
112. Waldschmidt I, Pirottin D, Art T, Audigie F, Bureau F, Tosi I, et al. Experimental model of equine alveolar macrophage stimulation with TLR ligands. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2013;155(1-2):30-7.
113. Jetten N, Roumans N, Gijbels MJ, Romano A, Post MJ, de Winther MP, et al. Wound administration of M2-polarized macrophages does not improve murine cutaneous healing responses. *PloS one*. 2014;9(7):e102994.
114. Odemuyiwa S. Immunophenotypic Characteristics of Equine Monocytes and Alveolar Macrophages: University of Guelph; 2012.
115. Zeng L, Takeya M, Takahashi K. AM-3K, a novel monoclonal antibody specific for tissue macrophages and its application to pathological investigation. *The Journal of pathology*. 1996;178(2):207-14.
116. Yamate J, Yoshida H, Tsukamoto Y, Ide M, Kuwamura M, Ohashi F, et al. Distribution of cells immunopositive for AM-3K, a novel monoclonal antibody recognizing human macrophages, in normal and diseased tissues of dogs, cats, horses, cattle, pigs, and rabbits. *Veterinary pathology*. 2000;37(2):168-76.
117. Lee Y, Kiupel M, Soboll Hussey G. Characterization of respiratory dendritic cells from equine lung tissues. *BMC veterinary research*. 2017;13(1):313.
118. Hammond SA, Horohov D, Montelaro RC. Functional characterization of equine dendritic cells propagated ex vivo using recombinant human GM-CSF and recombinant equine IL-4. *Veterinary immunology and immunopathology*. 1999;71(3-4):197-214.
119. 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 and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2005;13(5):520-9.
120. Caston SS, Cooper EE, Chandramani-Shivalingappa P, Sponseller BA, Hostetter JM, Sun Y. CD47 expression in cryopreserved equine cutaneous masses and normal skin. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*. 2016;28(4):408-13.
121. Falleni M, Savi F, Tosi D, Agape E, Cerri A, Moneghini L, et al. M1 and M2 macrophages' clinicopathological significance in cutaneous melanoma. *Melanoma research*. 2017.

122. Choudhury KR, Yagle KJ, Swanson PE, Krohn KA, Rajendran JG. A robust automated measure of average antibody staining in immunohistochemistry images. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society.* 2010;58(2):95-107.
123. Jensen EC. Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using ImageJ. *Anatomical record (Hoboken, NJ : 2007).* 2013;296(3):378-81.
124. Allen CA, Payne SL, Harville M, Cohen N, Russell KE. Validation of quantitative polymerase chain reaction assays for measuring cytokine expression in equine macrophages. *Journal of immunological methods.* 2007;328(1-2):59-69.
125. Kwon S, Gewirtz AT, Hurley DJ, Robertson TP, Moore JN, Vandenplas ML. Disparities in TLR5 expression and responsiveness to flagellin in equine neutrophils and mononuclear phagocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2011;186(11):6263-70.
126. Karagianni AE, Kapetanovic R, Summers KM, McGorum BC, Hume DA, Pirie RS. Comparative transcriptome analysis of equine alveolar macrophages. *Equine veterinary journal.* 2017;49(3):375-82.
127. Du C, Liu HF, Lin YZ, Wang XF, Ma J, Li YJ, et al. Proteomic alteration of equine monocyte-derived macrophages infected with equine infectious anemia virus. *Proteomics.* 2015;15(11):1843-58.
128. Zaki R, Bulgiba A, Nordin N, Azina Ismail N. A systematic review of statistical methods used to test for reliability of medical instruments measuring continuous variables. *Iranian journal of basic medical sciences.* 2013;16(6):803-7.
129. Theoret CL, Schumacher J, Stashak TS. *Equine wound management.* Third edition.. ed. Theoret C, Schumacher J, Stashak TS, editors: Ames, Iowa : Wiley Blackwell; 2017.
130. Kamus L, Rameau M, Theoret C. Experimental study on the feasibility of using a disposable canister-free negative-pressure wound therapy (NPWT) device on open wounds in horses. 2018.
131. Cicchetti DV, Sparrow SA. Developing criteria for establishing interrater reliability of specific items: applications to assessment of adaptive behavior. *American journal of mental deficiency.* 1981;86(2):127-37.
132. Scott DW. *Equine dermatology.* 2nd ed.. ed. Miller WH, editor. St. Louis, Mo. : St. Louis, Mo. : Saunders; 2011.
133. Wilmlink JM, Veenman JN, van den Boom R, Rutten VP, Niewold TA, Broekhuisen-Davies JM, et al. Differences in polymorphonucleocyte function and local inflammatory response between horses and ponies. *Equine veterinary journal.* 2003;35(6):561-9.
134. Sandeep K, Kumar Maiti S, Naveen K, Sams-Zu MM, Ravindran NA, Ashok KB, et al. Effect of medical grade chitosan powder in full thickness skin wound healing in rat model. *Advances in Animal and Veterinary Sciences.* 2014;2(5):270-6.
135. Krzyszczuk P, Schloss R, Palmer A, Berthiaume F. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Frontiers in physiology.* 2018;9:419.
136. Mauro A, Russo V, Di Marcantonio L, Berardinelli P, Martelli A, Muttini A, et al. M1 and M2 macrophage recruitment during tendon regeneration induced by amniotic epithelial cell allotransplantation in ovine. *Research in veterinary science.* 2016;105:92-102.
137. Dubuc V, Laverty S, Richard H, Dore M, Theoret C. Development of a computer-based quantification method for immunohistochemically-stained tissues and its application to study mast cells in equine wound healing (proof of concept). 2018.

138. Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinas M, Zaba LC, Nograles KE, Pierson KC, Mitsui H, et al. A subpopulation of CD163-positive macrophages is classically activated in psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*. 2010;130(10):2412-22.
139. Ohki O, Yokozeki H, Katayama I, Umeda T, Azuma M, Okumura K, et al. Functional CD86 (B7-2/B70) is predominantly expressed on Langerhans cells in atopic dermatitis. *The British journal of dermatology*. 1997;136(6):838-45.
140. Komine M, Karakawa M, Takekoshi T, Sakurai N, Minatani Y, Mitsui H, et al. Early inflammatory changes in the "perilesional skin" of psoriatic plaques: is there interaction between dendritic cells and keratinocytes? *The Journal of investigative dermatology*. 2007;127(8):1915-22.
141. Erkin G, Ugur Y, Gurer CK, Asan E, Korkusuz P, Sahin S, et al. Effect of PUVA, narrow-band UVB and cyclosporin on inflammatory cells of the psoriatic plaque. *Journal of cutaneous pathology*. 2007;34(3):213-9.
142. Liu MF, Li JS, Weng TH, Lei HY. Differential expression and modulation of costimulatory molecules CD80 and CD86 on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Scandinavian journal of immunology*. 1999;49(1):82-7.
143. Merant C, Breathnach CC, Kohler K, Rashid C, Van Meter P, Horohov DW. Young foal and adult horse monocyte-derived dendritic cells differ by their degree of phenotypic maturity. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2009;131(1-2):1-8.
144. Sun L. *Rhodococcus Equi* infection and interferon-gamma regulation in foals: University of Kentucky; 2012.
145. McWhorter FY, Wang T, Nguyen P, Chung T, Liu WF. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(43):17253-8.
146. Heinrich F, Lehmbecker A, Raddatz BB, Kegler K, Tipold A, Stein VM, et al. Morphologic, phenotypic, and transcriptomic characterization of classically and alternatively activated canine blood-derived macrophages in vitro. *PloS one*. 2017;12(8):e0183572.
147. Gao J, Scheenstra MR, van Dijk A, Veldhuizen EJA, Haagsman HP. A new and efficient culture method for porcine bone marrow-derived M1- and M2-polarized macrophages. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2018;200:7-15.
148. Laboratories V. VECTOR Black Alkaline Phosphatase (AP) Substrate Kit 2018 [cited 2018 August 30th]. Available from: <https://vectorlabs.com/vector-black-alkaline-phosphatase-ap-substrate-kit.html>.
149. Di Cataldo S, Ficarra E, Macii E. Computer-aided techniques for chromogenic immunohistochemistry: status and directions. *Computers in biology and medicine*. 2012;42(10):1012-25.
150. Wise LM, Bodaan CJ, Stuart GS, Real NC, Lateef Z, Mercer AA, et al. Treatment of limb wounds of horses with orf virus IL-10 and VEGF-E accelerates resolution of exuberant granulation tissue, but does not prevent its development. *PloS one*. 2018;13(5):e0197223.