



26 février 2003

LES HARAS NATIONAUX

Projet de thérapie cellulaire équine : mise au point d'un substrat cutané homologue

*Par : S. Froget, J-P Pujol
Laboratoire de Biochimie
du Tissu Conjonctif
Faculté de Médecine - Niveau 3
14032 CAEN CEDEX*

Résumé

L'objectif de cette étude est de développer et évaluer l'effet d'un derme équivalent (DE) homologue dans le traitement des plaies cutanées chez le cheval. Le DE a été testé sur 2 poulains et une jument atteints d'une plaie au niveau de la région distale des membres avec échec de cicatrisation depuis 8, 5 et 1 mois respectivement. Dans les 3 cas, le profil de cicatrisation est très similaire. Entre 10 et 12 poses du DE, soit 2,5 à 3 mois de traitement ont été nécessaires. Les résultats fonctionnels et esthétiques sont très satisfaisants, avec absence de cicatrice invalidante et repousse des poils de la même couleur que la robe. La réduction du temps de cicatrisation permet de diminuer les coûts que représentent l'immobilisation prolongée en box (4 à 6 mois) ainsi que les soins apportés. De plus, la qualité esthétique obtenue évite une dépréciation du cheval.

Mots-clés : équine, cicatrisation, tissu de granulation, thérapie cellulaire, derme équivalent.

Summary

The aim of the study is to investigate the effects of an allogeneic dermal equivalent (DE) as a treatment to traumatic wounds of the distal limbs of horses. Cutaneous wounds of 2 foals and 1 mare which failed to heal 8, 5 and 1 months respectively after injury were treated with DE. All wounds had a similar pattern of healing. Wound healing was achieved after 10 to 12 applications of DE, corresponding to a 2.5 to 3 months healing time. A functional and cosmetic outcome including newly formed hair and lack of scar was observed. Improving healing time as well as cosmetic appearance has a significant interest in terms of reducing costs related to immobilization in box stalls for prolonged periods (often 4 to 6 months duration) and preventing loss of commercial value of the horse.

Key-words: equine, wound healing, granulation tissue, cell therapy, dermal equivalent.

I - INTRODUCTION

Par sa double composante dermique et épidermique, la peau est à la base des fonctions de relation et de défense du corps vis-à-vis des agressions extérieures et des germes infectieux.

La réparation cutanée est un processus finement contrôlé impliquant une série d'interactions cellulaires et moléculaires complexes, qui ont pour but de restaurer l'intégrité structurale et fonctionnelle du tissu lésé.

Le cheval est particulièrement exposé aux plaies cutanées. La région distale des membres est la plus fréquemment atteinte, s'expliquant par son utilisation sportive et son mode de vie. Or, le cheval est prédisposé au bourgeonnement excessif du tissu de granulation qui inhibe l'achèvement du processus de cicatrisation.

L'objectif de cette étude est de développer et caractériser un substrat cutané composé d'une éponge de collagène cellularisée, biodégradable, capable d'orchestrer le processus de cicatrisation.

I.1. Le processus de cicatrisation

Les principaux événements dans la cicatrisation se déroulent toujours selon un ordre bien établi :

- Phase de coagulation : la nécrose, et/ou l'hémorragie initiales sont suivies par une agrégation plaquettaire et le relargage de facteurs de coagulation et facteurs de croissance nécessaires pour le déclenchement des phénomènes d'hémostase. Une matrice de fibrine se forme, permettant la migration cellulaire.
- Phase d'inflammation : dans les heures qui suivent, des cellules inflammatoires migrent des tissus sains vers les tissus altérés. Leur activation (monocytes, macrophages, polynucléaires) intervient dans la dégradation de la nécrose et la promotion des cellules de réparation.
- Phase de prolifération : durant cette phase, les fibroblastes migrent et se multiplient dans une matrice provisoire pour former un tissu conjonctif fortement vascularisé (tissu de granulation). Les fibroblastes acquièrent des propriétés de contractilité et sont alors dénommés myofibroblastes, cellules dont le réseau d'actine est très développé, responsables du rapprochement des berges de la plaie. Enfin, l'épiderme avance progressivement à la surface du tissu de granulation, les kératinocytes se multiplient puis s'organisent pour former une couche cornée fonctionnelle.
- Phase de remodelage : elle peut durer plusieurs mois voire des années ; les cellules endothéliales et les myofibroblastes disparaissent en grande partie par apoptose. L'activité biosynthétique des cellules persistantes se modifie pour former une matrice progressivement plus rigide sous l'influence de leur support et par l'échange d'informations avec les kératinocytes. L'épiderme forme lentement un système d'ancrage fonctionnel. Les annexes ne régénèrent pas mais l'innervation se rétablit.

Toute altération des mécanismes moléculaires et cellulaires mise en œuvre dans ce processus peut engendrer une cicatrisation défectueuse menant à des retards de cicatrisation, ou, au contraire, à une amplification incontrôlée des phénomènes mis en jeu, aboutissant aux cicatrices hypertrophiques ou aux chéloïdes (Costa et Desmoulière, 1998).

I.2. Les caractéristiques de la cicatrisation chez le cheval

La cicatrisation chez le cheval suit le même schéma que dans les autres espèces mais elle est caractérisée par une réponse fibroblastique beaucoup plus précoce et marquée, à l'origine d'un bourgeonnement excessif du tissu de granulation. Ceci s'oppose à l'achèvement du processus réparateur, en inhibant la contraction et l'épithélialisation de la plaie. De plus, des complications secondaires peuvent survenir, telles que des infections bactériennes (Bertone, 1989).

1. Localisation de la plaie

Une étude réalisée sur 2 489 chevaux traités pour une plaie dans 19 universités vétérinaires américaines entre 1982 et 1986 nous renseigne sur les localisations les plus fréquentes des lésions au niveau des membres : le pied est la structure la plus fréquemment atteinte, ensuite les régions de l'épaule et du métacarpe. Ainsi, la région distale des membres est la plus fréquemment atteinte (Baxter, 1998).

Les plaies situées sur les membres cicatrisent lentement, avec une forte prédisposition au bourgeonnement, un résultat esthétique et fonctionnel décevant, tandis que les plaies de la région supérieure du corps cicatrisent beaucoup plus vite, essentiellement par contraction, avec formation d'une cicatrice peu invalidante (Knottenbelt, 1997).

2. Influence de la taille et du poids de l'animal

Une étude visant à comparer la cicatrisation chez le poney (taille < 140 cm et poids < 385 kg) et chez le cheval a montré que la taille et surtout le poids ont une influence directe sur la production excessive du tissu de granulation, et donc sur le temps de cicatrisation, au niveau des régions distales. En effet, les poneys ont cicatrisé en 3 mois, sans formation de tissu de granulation, tandis que le cheval de masse la plus élevée (518 kg) a développé un tissu de granulation allongeant la durée de cicatrisation à 6 mois. De plus 1 à 3 excisions du tissu de granulation ont été nécessaires (Bertone et al., 1985).

3.. Le tissu de granulation exubérant inhibe le processus de cicatrisation

Bien que la cause initiale du déclenchement des chéloïdes reste largement inconnue, il est évident que la formation de celles-ci résulte d'une activation incontrôlée des systèmes impliqués dans la cicatrisation, en particulier des cellules du tissu conjonctif, responsables d'une production anarchique de matrice extracellulaire.

Sur le plan histologique, on note l'existence d'une matrice extracellulaire abondante avec d'épais trousseaux de fibres de collagène et la formation de nodules acellulaires dans le derme profond.

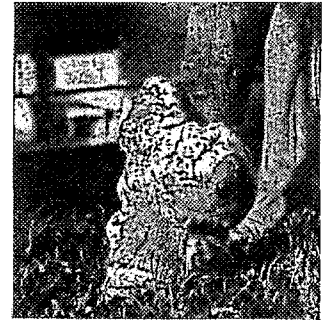


Fig. 1 : cicatrice hypertrophique, type chéloïde (Cheval Santé n°12 fév-mars 2001).

Sur le plan biochimique, de nombreuses anomalies ont été constatées. Un déséquilibre entre la synthèse de collagène et sa dégradation semble être impliqué. Le tissu de granulation dans un processus de cicatrisation normal contient des fibroblastes immatures produisant du collagène de type III désorganisé, progressivement remplacé par un collagène de type I orienté. Dans le cas de la production d'un tissu de granulation menant à des cicatrices hypertrophiques ou chéloïdes, le phénomène de fibroplasie est accentué, conduisant à une synthèse excessive de collagène et élevant la zone de la lésion au-dessus des marges de la plaie.

Récemment, l'équipe de Miller a montré que les fibroblastes dermiques des membres de 22 chevaux ont un pouvoir prolifératif *in vitro* moindre que ceux isolés du tronc ; il conclut que le bourgeonnement excessif du tissu de granulation pourrait être contrôlé en influençant la croissance des fibroblastes (Miller et al., 2000).

D'autre part, il a été démontré que l'expression continue du TGF- β 1, stimulant la synthèse fibroblastique, dans les plaies localisées au niveau des membres, pourrait être un facteur influençant le développement du tissu de granulation (Theoret et al., 2001). Une récente étude suggère que la production de tissu de granulation exubérant soit liée à une augmentation de l'expression du TGF- β 1 et d'une diminution de l'expression du TGF- β 3 antifibrotique (Theoret et al., 2002).

I.3. Etat des travaux entrepris sur le sujet

L'utilisation de biomatériaux pour le traitement des plaies chez les Equidés a fait l'objet de nombreuses publications.

En 1985, Bertone et ses collaborateurs ont réalisé une étude sur l'intérêt de l'application d'une membrane poreuse de collagène d'origine bovine dans le traitement des plaies situées sur les membres des chevaux. Ils n'ont pas pu mettre en évidence de différence significative entre les chevaux traités et les témoins (Bertone et al., 1985). Les mêmes observations ont été faites par l'équipe de Yvorchuk-St Jean en 1995.

Bigbie et al. ont utilisé en 1991 un extrait hydrosoluble de levure, le LYCD (Live Yeast-Cell Derivative). Son utilisation chez le cheval a provoqué un allongement de la cicatrisation en favorisant le développement exubérant du tissu de granulation (Bigbie et al., 1991).

C. Roux a étudié en 1999 l'efficacité d'un pansement biologique, la sous-muqueuse d'intestin de porc, commercialisée sous le nom de VetBioSist (laboratoire Cook). Après une étude sur 2 cas, elle a constaté une inhibition du tissu de granulation mais aucun pouvoir de régénération de l'épiderme (Roux, 1999).

Goodrich et son équipe ont étudié en 2000 l'efficacité de l'amnion équin, en comparaison à un pansement non adhérent. Ils ont constaté un raccourcissement du temps moyen de cicatrisation pour les plaies traitées avec l'amnion équin, qui contiendrait des facteurs de croissances, des substances angiogéniques et un composé bactéricide (Goodrich et al., 2000). L'amnion équin n'est pas commercialisé et doit être préparé par le praticien.

Cependant, aucun de ces produits n'est susceptible de réguler l'hyperbourgeoisement tout en stimulant l'épidermisation. Les avancées de la réparation cutanée par ingénierie cellulaire chez l'Homme offrent donc une nouvelle alternative pour le traitement des plaies difficiles chez les Equidés.

II - MATERIELS ET METHODES

II.1. Elaboration d'une banque de fibroblastes dermiques

Trois souches de fibroblastes dermiques provenant de prélèvements sains effectués après euthanasie de jeunes poulains (âgés de 1 à 6 mois) ont été isolés par technique enzymatique et par explants. Après amplification, les cellules sont dispersées dans du milieu de congélation et la suspension est répartie en cryotubes placés immédiatement à -80°C , à l'intérieur d'une boîte assurant une décroissance progressive de la température (1°C par minute). Les cryotubes sont transférés 24h plus tard dans l'azote liquide (-170°C). Les fibroblastes sont ensuite utilisés entre le second et le sixième passage.

II.2. Caractérisation du derme équivalent (DE) in vitro

Le substrat dermique a étéensemencé à diverses densités et étudié à différents temps de culture afin de déterminer la méthode de culture permettant une colonisation du substrat et une synthèse de facteurs optimaux.

- *Test MTT*

Le test au MTT est un test colorimétrique introduit par Mossman (1983) permettant d'évaluer la viabilité cellulaire. Seules les cellules vivantes possèdent des succinate-déshydrogénases, enzymes mitochondriales capables d'effectuer la transformation du sel de tétrazolium MTT jaune clair en cristaux bleus de formazan. L'évaluation au spectrophotomètre (570 nm) de la quantité de formazan générée par les cellules donne l'indication du nombre et/ou de l'activité métabolique des cellules vivantes. La solution de MTT est réalisée extemporanément par dissolution de ce sel dans du PBS à une concentration de 1 mg/ml.

- *Etude histologique*

Le substrat est fixé dans une solution de Bouin. Après déshydratation, il est transféré dans de la paraffine liquide à 60°C durcissant à température ambiante et formant des blocs qui seront découpés avec un microtome. Les coupes de $5\ \mu\text{m}$ d'épaisseur sont ensuite déposées sur des lames et colorées au Trichrome de Masson. Selon cette technique, l'hémalum colore les noyaux en bleu-noir, la Fuscine-Ponceau colore le cytoplasme en rose et le Vert-Lumière colore le collagène en vert.

- *Cinétique d'expression des facteurs de croissance*

A différents points de la cinétique de culture du DE, une extraction d'ARN est effectuée et l'expression de certains gènes des principaux facteurs intervenant dans la cicatrisation (TGF- β , VEGF, FGF et KGF) est étudiée par RT-PCR semi-quantitative.

II.3. Essais cliniques

Les plaies traumatiques de la région distale des membres sont celles présentant le plus de difficulté à cicatriser. Elles sont donc choisies comme sujet d'étude pour évaluer l'intérêt du substrat cutané homologue dans la cicatrisation chez le cheval.

Le substrat cutané a été testé sur deux poulains et une jument âgés respectivement de 9 mois, 6 mois et 3 ans et atteints d'une plaie au membre inférieur depuis 8, 5 et 1 mois respectivement. Les poulains sont gardés en box pendant toute la durée de l'étude.

Le jour de la pose (J_0), un nettoyage complet de la plaie est effectué : dans un premier temps à l'aide de compresses imbibées de Vétédine solution à 1% dans du sérum physiologique, puis de compresses imbibées de sérum physiologique uniquement. Ni eau, ni alcool ne doivent être mis en contact avec la plaie.

Le DE est maintenu en place par un bandage protecteur non compressif composé :

- D'un pansement primaire fait d'un tulle stérile maintenu à l'aide d'un adhésif, qui restera en place pendant 7 jours.
- D'un pansement secondaire composé d'un coton américain, d'une bande cohésive (Flexus[®]) puis d'une bande adhésive (Elastoplaste[®]). Ce pansement secondaire sera renouvelé tous les 3 jours (en fonction de l'évolution de la plaie) pour contrôler les exsudats.

La plaie est ainsi traitée jusqu'à complète épidermisation, à raison d'une pose du derme équivalent par semaine. Avant chaque nouvelle pose, la plaie est examinée (présence d'exsudats, tissu de granulation, degré d'épidermisation), et photographiée. Une règle sert de référence afin de corriger l'aire de la plaie. Les photos sont ensuite scannées et analysées par un logiciel permettant de calculer l'aire de la plaie (ImageQuant).

Le pourcentage de cicatrisation, prenant en compte la contraction de la plaie et l'épithélialisation, est exprimé en pourcentage de l'aire initiale (J_0) de la plaie. La formule suivante est utilisée :

$$\% \text{ cicatrisation} = (\text{aire}J_0 - \text{aire}DE_x) / \text{aire}J_0$$

aire J_0 = aire de la plaie au début du traitement

aire DE_x = aire de la plaie avant la dernière pose du DE.

III - RESULTATS

III.1. Caractérisation du derme équivalent (DE) in vitro

Les résultats des tests au MTT à différents temps de culture (t_1 à t_5) et pour différentes densités cellulaires d'ensemencement (d_1 , d_2 , d_3), pour les 3 souches de fibroblastes et réalisés en triplicat, permettent de mettre en évidence une activité métabolique maximale au sein du substrat pour t_3 avec la densité d'ensemencement d_3 (Fig.2).

Les coupes histologiques montrent une colonisation du substrat par les fibroblastes en surface mais également à l'intérieur des pores, proportionnelle à la densité d'ensemencement (Fig.3).

Concernant l'expression des gènes des facteurs de croissance, les résultats préliminaires par RT-PCR sur une souche de fibroblastes montrent une synthèse continue tout au long de la cinétique de culture au sein de la structure tridimensionnelle et supérieure aux mêmes cellules cultivées en monocouche (résultats non montrés).

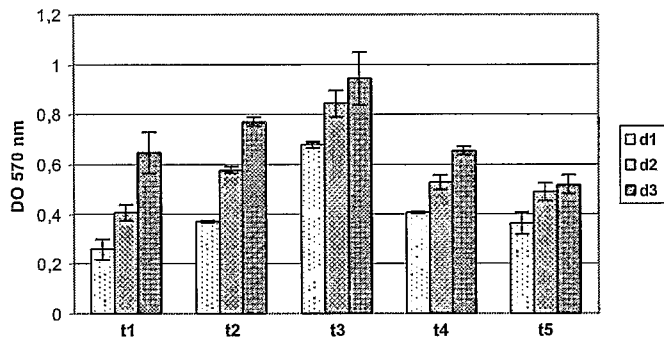


Fig. 2 : activité métabolique des fibroblastes cultivés au sein du substrat à 3 densités d'ensemencement et 5 temps de culture

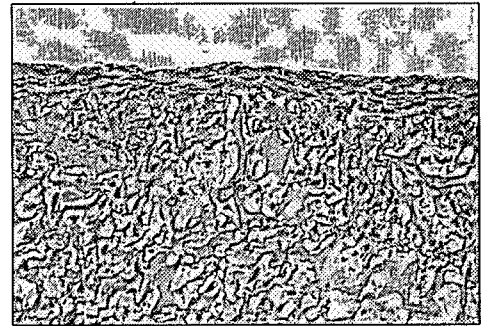


Fig 3 : coupe histologique du derme équivalent (x 200). Coloration au Trichrome de Masson

III.2. Étude de cas : Résultats

Les deux premiers cas traités ont nécessité 10 poses de derme équivalent pour aboutir à la fin de la cicatrisation. Il s'agissait de plaies chroniques, n'ayant pas cicatrisé depuis 8 et 5 mois respectivement. Pour le troisième cas, la plaie était apparue un mois avant le début de l'étude et le tissu de granulation exubérant empêchait la pose du derme équivalent. Un tulle imprégné de corticostéroïdes (Corticotulle®) a été appliqué afin d'inhiber le bourgeonnement excessif et aplanir la plaie avant de commencer l'étude. 12 DE ont été nécessaires. Dans les 3 cas, le profil de cicatrisation est très similaire : peu d'évolution la première semaine, suivie d'une diminution rapide de l'aire de la plaie entre la 2^{ème} et la 4^{ème} semaine de traitement (fig.6). L'épiderme tend ensuite à recouvrir progressivement le tissu de granulation. La cicatrisation semble contrôlée, même si la propension du tissu de granulation à bourgeonner reste observée, et l'aspect esthétique final est très satisfaisant, avec absence de cicatrice invalidante. Il est à noter également que les poils repoussent de la même couleur que la robe.

Cas n°1 :

- Poulain âgé de 9 mois
- Plaie apparue à l'âge de 3 semaines au niveau de la face interne du genou antérieur gauche ; présence de 2 plans tissulaires se chevauchant autour de l'articulation
- Traitée depuis 8 mois sans succès (Dermagel)
- Après un traitement de 2 mois et demi-consistant en 10 poses de derme équivalent, à raison d'une pose par semaine, la plaie a complètement disparu.



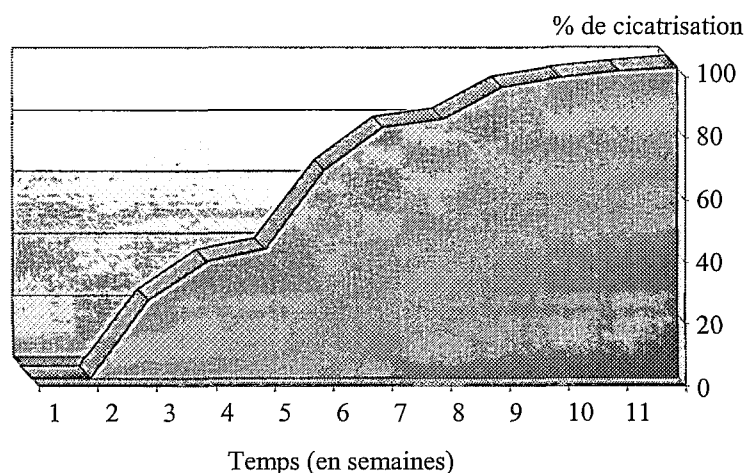
Fig. 4 : Avant le début du traitement

10 poses
1 pose / semaine
soit 2 mois 1/2



Fig. 5 : Après 10 poses, la plaie a disparu et le poil a déjà commencé à repousser

Fig. 6 : Représentation graphique du pourcentage de cicatrisation en fonction du nombre de semaines de traitement



Cas n°2 :

- Pouliche âgée de 6 mois
- Plaie apparue à l'âge de 1 mois au niveau du canon postérieur droit
- Traitée depuis 5 mois sans succès (Dermagel)
- Après un traitement de 2 mois et demi-consistant en 10 poses de derme équivalent, à raison d'une pose par semaine, la plaie est en fin de cicatrisation.

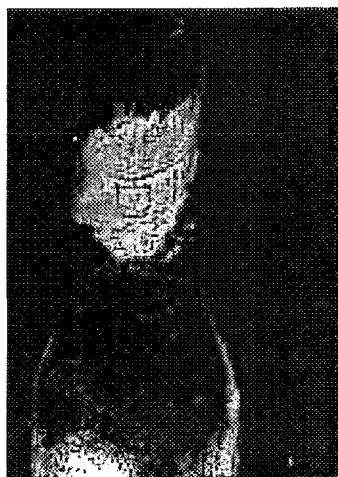


Fig. 7 : Plaie au début du traitement

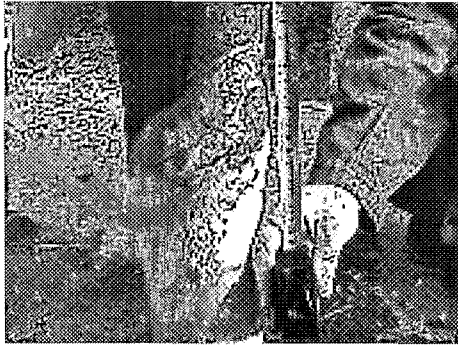
10 poses
1 pose / semaine
soit 2 mois 1/2



Fig.8 : La plaie a cicatrisé et l'épiderme tend à recouvrir la dernière zone. Le poil a repoussé de la même couleur qu'à l'origine

Cas n°3 :

- Jument âgée de 3 ans
- Plaie apparue 1 mois avant le début de l'étude au niveau du canon du postérieur gauche
- Pansée depuis 1 mois avec Bétadine tulle
- Après 12 poses, soit 3 mois de traitement, la cicatrisation est terminée. L'aspect esthétique est très satisfaisant.



12 poses
1 pose / semaine
soit 3 mois



Fig.9 : Avant le traitement, la plaie est très bourgeonnante. Nécessité de préparer la plaie avec du corticotulle® afin d'aplanir la plaie

Fig. 10 : Après 12 poses, la plaie est cicatrisée

Les résultats ont montré l'efficacité du substrat cutané homologue dans le traitement de plaies difficiles avec des résultats fonctionnels et esthétiques très satisfaisants.

Suite à ces essais préliminaires, des études complémentaires sur un plus grand nombre de chevaux présentant des plaies similaires sont en cours pour évaluer l'effet du substrat sur la cicatrisation par seconde intention, notamment :

- sa capacité à écourter la cicatrisation
 - sa capacité à prévenir le bourgeonnement excessif du tissu de granulation
 - son influence sur la contraction de la plaie
 - sa capacité à accélérer l'épithélialisation et à favoriser la régénération des annexes cutanées.
- Il sera également intéressant d'explorer d'autres applications du substrat :
 - son utilisation comme pansement biologique en première intention, appliqué dès les premiers soins sur la plaie saine, afin de favoriser le développement du tissu de granulation tout en prévenant son bourgeonnement excessif et accélérer l'épithélialisation.
 - son utilisation après excision chirurgicale de chéloïde ou de cicatrice invalidante pour contrôler le bourgeonnement excessif du tissu de granulation.
 - son utilisation pour favoriser le développement précoce du tissu de granulation au sein d'une plaie s'y prêtant peu (os ou tendons mis à nus). Le cheval est prédisposé aux plaies profondes avec mise à nu de l'os métacarpien III ou métatarsien III et des tendons de la région. Ces structures faiblement vascularisées, propices à l'infection, ne constituent pas un site favorable pour le développement du tissu de granulation.

REFERENCES

Baxter GM. Wound management. In: Current Techniques in Equine Surgery and Lameness (2nd ed). White NA, Moore JN, Eds. Philadelphia : Saunders Company, 1998, pp. 72-80.

Bertone AL, Sullins KE, Stashak TS, Norrdin RW. Effect of wound location and the use of topical collagen gel on exuberant granulation tissue formation and wound healing in the horse and pony. Am J Vet Res 1985;46:1438-44.

Bertone AL. Principles of wound healing. Vet Clin North Am Equine Pract 1989;5:449-63.

Bigbie RB, Schumacher J, Swaim SF, Purohit RC, Wright JC. Effects of amnion and live yeast cell derivative on second-intention healing in horses. Am J Vet Res 1991;52:1376-1382.

Chuit P. Greffes cutanées pour qui, pourquoi? Cheval Santé 2001;12:60-3.

Costa AMA, Desmoulière A. Mechanisms and factors involved in development of hypertrophic scars. Eur J Plast Surg 1998;21:19-23.

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. Am J Vet Res 2000;61:326-329.

Knottenbelt DC. Equine wound management : are there significant differences in healing at different sites on the body ? Vet Dermatol 1997;8:273-90.

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

Roux C. Thèse de doctorat vétérinaire 1999, Université Claude Bernard, Lyon, 121pp.

Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, Gordon JR. Expression of transforming growth factor beta(1), beta(3), and basic fibroblast growth factor in full-thickness skin wounds of equine limbs and thorax. Vet Surg 2001;30:269-77.

Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, Gordon JR. Preliminary observations on expression of transforming growth factors beta1 and beta3 in equine full-thickness skin wounds healing normally or with exuberant granulation tissue. Vet Surg 2002;31:266-73.

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