
L'axolotl, un modèle pour la médecine régénérative dans le traitement des plaies chez le cheval ?

Auteur : Piron, Anaïs

Promoteur(s) : Dubois, Axel

Faculté : Faculté de Médecine Vétérinaire

Diplôme : Master en médecine vétérinaire

Année académique : 2019-2020

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/9923>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

L'axolotl, un modèle pour la médecine régénérative dans le traitement des plaies chez le cheval ?

*Axolotl, a model of regenerative medicine for wound healing in
horse ?*

Anaïs PIRON

Travail de fin d'études

Présenté en vue de l'obtention du grade

De Médecin vétérinaire

Année académique 2019-2020

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur

L'axolotl, un modèle pour la médecine régénérative dans le traitement des plaies chez le cheval ?

*Axolotl, a model of regenerative medicine for wound healing in
horse ?*

Anaïs PIRON

Tuteur : Dubois Arthur

Travail de fin d'études

Présenté en vue de l'obtention du grade

De Médecin vétérinaire

Année académique 2019-2020

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur

L'axolotl, un modèle pour la médecine régénérative dans le traitement des plaies chez le cheval ?

Objectif du travail : Ce travail a pour objectif de synthétiser les connaissances actuelles sur le processus de guérison de l'axolotl et ses applications en médecine régénérative, plus particulièrement dans le cas de plaies cutanées chez le cheval.

Résumé : L'axolotl est une salamandre qui possède des propriétés de régénération exceptionnelles. Il est étudié largement dans le monde scientifique depuis plusieurs décennies afin de comprendre les mécanismes lui permettant de guérir de ses blessures sans former de cicatrice ou encore de reformer un organe complet dont la structure et la fonction sont indifférenciables de l'organe d'origine. La fine compréhension de la cicatrisation et de la guérison sont fondamentales pour entrevoir les possibilités de traitements en médecine régénérative utilisant l'axolotl. En effet, le cheval est un animal sujet aux blessures de par son utilisation et son environnement. De plus, les complications (exemple : tissu de granulation exubérant) lors de la cicatrisation ne sont pas rares. Ce problème est plus fréquemment rencontré chez le cheval que chez le poney et plus fréquemment aux niveaux des membres qu'au niveau du corps. De nombreuses thérapies en médecine régénérative ont déjà été mises en place chez le cheval, mais jusqu'à aujourd'hui, aucune ne permet une guérison sans laisser de cicatrice. Diverses études ont été menées pour établir des traitements sur base de l'axolotl et ont montré un degré d'efficacité variable. Sur base de ces résultats, l'utilisation de l'axolotl afin d'établir une ou plusieurs thérapies en médecine régénérative équine paraît possible et prometteuse. Cependant, d'autres études doivent être menées pour élucider entièrement la guérison des urodèles. L'étude d'autres animaux aux capacités similaires (ex : le poisson zèbre, la grenouille *Xenopus Laevis*) sont aussi des pistes pour établir les chaînons manquants à cette compréhension.

Objective of the work: The aim of this work is to synthesize current knowledge in the healing process of axolotl and its applications in regenerative medicine, more particularly in the case of skin wounds in horses.

Summary: Axolotl is a salamander with exceptional regenerative properties. It has been studied in the scientific world for several decades in order to understand the origin of the mechanisms allowing it to heal from its wounds without leaving a scar or to reform a complete organ whose structure and function are indistinguishable from the old one. A fine understanding of wound healing and cicatrization is fundamental to use axolotl in possible treatments in regenerative medicine. Indeed, the horse is an animal subject to injuries from its use and its environment and complications (example: exuberant granulation tissue) during healing are not uncommon. This problem is more common in horses than in ponies and more common in limbs than in body. Many therapies in regenerative medicine have already been put in place on horses, but so far none have allowed healing without leaving a scar. Various studies have considered to establish treatments on the basis of axolotl and have shown varying degrees of effectiveness, will they be applicable to the horse? Based on these results, the use of axolotl to establish some therapies in equine regenerative medicine appears possible and promising. However, more studies are needed to fully elucidate wound healing in urodeles. The study of other animals with similar properties (eg : zebrafish, the frog *Xenopus Laevis*) are also a lead to establish the missing links to the healing mechanism.

Remerciements

Je remercie tout particulièrement mon promoteur, Dubois Xavier de m'avoir permis de choisir ce sujet qui suscitait chez moi un grand intérêt bien que complexe à comprendre.

Je remercie également le professeur Benoît Muylkens, sans ses cours d'embryologie et de biologie cellulaire, je n'aurais pas eu l'idée de ce travail de fin d'étude.

Je remercie également les membres du cabinet Pévenage, C. Sabine, S. Bruno, Laura et plus particulièrement mon maître de stage P. Floriant qui m'ont confortée dans le choix de mon futur métier.

Je remercie ma famille qui m'a toujours soutenue durant ces longues années d'étude. Que ce soit par une multitude de petites attentions au cours des périodes difficiles ou en ayant cru en mes capacités lorsque je doutais le plus de celles-ci.

Pour terminer, je remercie des personnes sans qui ces études auraient été bien mornes. C. Célestine, C. Justine et D. Anaïs, merci pour les souvenirs inoubliables ainsi que pour le soutien dans les moments de doute.

L'axolotl, un modèle pour la médecine régénérative dans le traitement des plaies chez le cheval ?

1. Introduction	1
2. Le processus de cicatrisation physiologique du cheval.....	1
2.1. Phase inflammatoire et de débridement	2
2.2. Phase de réparation	4
2.3. Phase de maturation	6
3. Complication de la cicatrisation chez le cheval : l'hypergranulation	7
4. L'axolotl, un modèle de guérison parfaite.....	9
4.1. La phase inflammatoire.....	10
4.2. La phase de réparation	11
5. Éléments et hypothèses mis en avant pour comprendre la régénération des urodèles	13
6. Comment utiliser le modèle de l'axolotl pour une perspective de thérapie régénérative chez le cheval ?.....	17
7. Conclusion.....	20
8. Bibliographie.....	22

1. Introduction

De par son utilisation et son environnement (boxe, clôture de prairie), le cheval est un animal sujet aux blessures, en particulier sur la partie distale des membres. La guérison de ces plaies par première intention est souvent rendue impossible. En effet, la tension cutanée existant dans cette région ne permet pas un rapprochement suffisant des bords de la plaie par une suture. La cicatrisation par seconde intention est donc privilégiée et nécessite un suivi minutieux de l'évolution de la blessure. En effet, l'hypergranulation est une complication fréquente dans l'espèce équine et représente un véritable challenge pour le praticien en médecine équine. Pour prévenir ce phénomène indésirable, des thérapies de médecine régénérative préventives et/ou curatives, ont été développées. En médecine régénérative, Demircan et collaborateurs (2016) ont mis au point un traitement utilisant les cellules de l'axolotl chez la souris avec des résultats encourageants. Cette salamandre néoténique a le pouvoir de régénérer plusieurs de ses organes (système nerveux central, coeur, membre) et de guérir de ces lésions sans aucune cicatrice. La compréhension des mécanismes de guérison de cet animal, mettrait en lumière les obstacles à la cicatrisation parfaite et serait une avancée considérable dans le domaine de la médecine régénérative.

L'objectif de ce travail est de discuter la possible utilisation d'une thérapie régénérative basée sur le modèle de l'axolotl chez les équidés. Les processus de cicatrisation des équidés et de l'axolotl sont développés et comparés et serviront de base à cette réflexion.

2. Le processus de cicatrisation physiologique du cheval

Dans l'espèce équine le processus de cicatrisation par seconde intention est un mécanisme hétérogène. En effet, Wilmlink et collaborateurs (1999 ; 2005) démontrent que le cheval et le poney ne possèdent pas les mêmes capacités de cicatrisation. Ce dernier présente une prévalence moindre de complications (Bertone et al. 1985) et est plus performant sur le plan de la cicatrisation grâce à ; (1) une réaction inflammatoire plus forte et moins longue, (2) une contraction plus adaptée des myofibroblastes, (3) une dégradation plus rapide de la fibrine du clou plaquettaire (Wilmlink et al. 1999). De plus, la localisation anatomique de la lésion a un impact sur l'efficacité de la cicatrisation (Wilmlink et al. 2005 ; Lepault et al. 2005). Contrairement aux blessures sur le thorax, celles présentes sur les membres mettent plus de temps à guérir et sont plus souvent compliquées par une inflammation chronique, une infection ou le développement d'un tissu de granulation exubérant (Wilmlink et al. 2005 ; Lepault et al. 2005).

Quatre phases à la cicatrisation sont communément reconnues : l'hémostase, la phase inflammatoire, la phase de réparation et la phase de maturation. La cicatrisation se fait de façon continue, par conséquent ces quatre phases sont dépendantes les unes des autres et peuvent se retrouver simultanément au sein d'une même plaie. Les différents acteurs des étapes de la cicatrisation sont illustrés en annexe Figure 1 et Figure 2.

2.1. Phase inflammatoire et de débridement

La lésion mécanique des endothéliums déclenche l'agglutination des plaquettes au contact des fibres de collagène de type III mises à nu, ce qui forme le clou plaquettaire. Les plaquettes libèrent de la thromboxane A2 et de la sérotonine qui vont contribuer à la vasoconstriction locale. Les granules des thrombocytes contiennent également des facteurs de croissance indispensables à l'initiation de la cicatrisation, à savoir : le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), le TGF β (Transforming Growth Factor β) et le Platelet Factor 4 (Kawasumi et al. 2012 ; Cañedo-Dorantes et Cañedo-Ayala 2019). Le TGF β est connu pour être une molécule importante dans l'initiation de la cicatrisation (Van Den Boom et al. 2002) . Cinq isoformes ont été identifiées et trois d'entre elles sont reconnues comme largement impliquées dans la guérison cutanée (-1, -2 et -3). Les TG β -1 et 2 sont les isoformes les plus présentes au début du processus de cicatrisation (Van Den Boom et al. 2002). Les endothéliums lésés vont aussi induire le système des kinines, dont la bradykinine qui augmente la perméabilité vasculaire et induit une zone oedématisée (Cañedo-Dorantes et Cañedo-Ayala 2019). Pour terminer, la lésion enclenche la cascade de la coagulation qui aboutit à l'activation de la prothrombine en thrombine qui clive le fibrinogène en fibrine. Cette fibrine va polymériser pour former un réseau qui consolidera le clou plaquettaire (Schlag et al. 1986 ; Kawasumi et al. 2012 ; Cañedo-Dorantes et Cañedo-Ayala 2019).

L'augmentation de la perméabilité vasculaire va permettre la diapédèse des leucocytes dont le but est de détruire/contrôler la cause de l'inflammation. Les premières cellules présentes sur le foyer inflammatoire sont les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) (Cañedo-Dorantes et Cañedo-Ayala 2019). Les neutrophiles sont guidés jusqu'au foyer inflammatoire par chimiotactisme rendu possible par les cytokines produites par les cellules endothéliales endommagées. Les principales cytokines sont : le TNF α , l'IL-1 et l'IL-8 (Cañedo-Dorantes et Cañedo-Ayala 2019). Les PMNs sont présents en seulement quelques minutes au niveau de la plaie et leur nombre est maximal après 24-48h (Kawasumi et al. 2012 ; Cañedo-Dorantes et Cañedo-Ayala 2019). Leur

nombre chute de façon accrue durant trois semaines et poursuit une diminution graduelle pour toujours être présents au bout de cinq semaines (Wilmink et al. 1999). Leur rôle principal est de libérer leurs granules qui vont digérer le tissu conjonctif et les potentielles bactéries ce qui occasionne une perte de substance supplémentaire. Leur second rôle est de phagocyter les pathogènes. Cependant, chez le cheval, la présence de bactéries affecte la réponse inflammatoire de façon minimale (Jørgensen et al. 2019). Jørgensen et collaborateurs (2019), mettent en évidence que les populations de neutrophiles et de macrophages augmentent de façon peu significative lors de l'infection des plaies appendiculaires par *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa*. Wilmink et collaborateurs (1999) mettent en évidence que la réaction inflammatoire du cheval est plus faible et prolongée par rapport à celle du poney et est aussi moins marquée au niveau du membre par rapport au thorax. Cette réaction inflammatoire se caractérise par un nombre moins important de PMNs et maintient la persistance d'un tissu de granulation purulent et irrégulier. La présence prolongée des neutrophiles retarde la fin de la phase inflammatoire et prolonge le processus de cicatrisation (Lepault et al. 2005). De plus, Dovi et collaborateurs 2003, mettent en évidence que la présence de PMNs lors de plaies non infectées n'est pas indispensable à la cicatrisation .

Après les neutrophiles, ce sont les monocytes, les macrophages circulants, qui sont recrutés. Ils sont aussi guidés par le gradient de chémokines libérées par les cellules endothéliales lésées (Cañedo-Dorantes et Cañedo-Ayala 2019). Les macrophages ont une place importante dans la cicatrisation. Sans leur activité, le passage à la phase de réparation ne pourra se faire. En effet, ils ont pour rôle de phagocyter les débris cellulaires et les potentiels pathogènes présents pour nettoyer le lit de la plaie et ainsi préparer le terrain au tissu de granulation. Ils produiront des cytokines pour amplifier la réaction inflammatoire ainsi que des facteurs de croissance : PDGF (Platelet Derived Growth Factor), le FGF (Fibroblast Growth Factor), le TGF β (Transforming Growth Factor β),

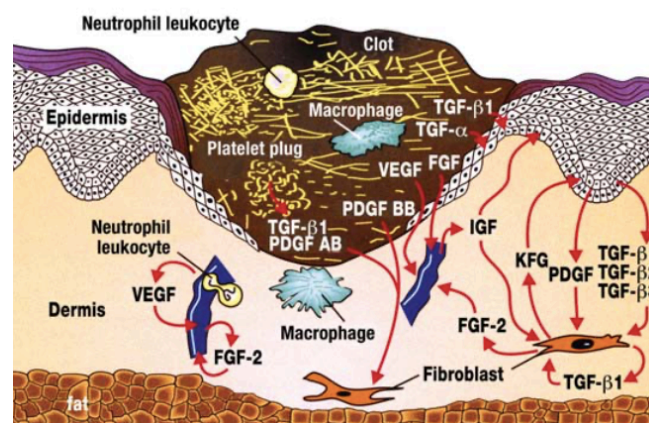


Figure 1 : acteurs cellulaires et moléculaires des premières étapes de la cicatrisation - Tiré de Kujath et Michelsen 2008

l'IL-1, l'IL-6 (Cañedo-Dorantes et Cañedo-Ayala 2019). Ceux-ci permettront d'induire la prolifération des fibroblastes, la néoangiogénèse et la synthèse de collagène.

2.2. Phase de réparation

C'est durant cette phase que le tissu de granulation est formé par la prolifération des fibroblastes, la production d'un nouveau tissu conjonctif ainsi que la néoangiogénèse (Cañedo-Dorantes et Cañedo-Ayala 2019). Wilmink et collaborateurs (1999) observent que l'activité mitotique est élevée dans le tissu de granulation du cheval et celle-ci est doublée à partir de la deuxième semaine post lésion. Il semblerait que l'inhibition de la mitose est insuffisante lorsque la formation de nouveau tissu de granulation est nécessaire, ce qui mène à un tissu de granulation exubérant (Wilmink et al. 1999)

Les fibroblastes sont issus des cellules non différenciées du tissu conjonctif dont la mitose est induite par le TGF β (surtout le -1) (Lepault et al. 2005) et apparaissent rapidement aux bords de la plaie. Comme pour les cellules inflammatoires, ils sont recrutés par chimiotactisme induit par les facteurs de croissance libérés par les plaquettes et les macrophages (Cañedo-Dorantes et Cañedo-Ayala 2019). Le réseau de fibrine créé durant l'hémostase, va servir de guide aux fibroblastes. Ceux-ci vont produire, en plus des macrophages et cellules endothéliales, des fibronectines qui leur permettent d'adhérer entre eux et à la matrice du tissu conjonctif. La fibrine doit ensuite être lysée pour être remplacée par du collagène (Cañedo-Dorantes et Cañedo-Ayala 2019). Cette fibrinolyse est assurée par les cellules endothéliales qui proviennent de la néoangiogénèse. Celle-ci est indispensable à la formation du tissu de granulation car elle permet d'apporter les nutriments et l'oxygène nécessaires et est activée par l'IL-1 et le TNF- α . La microvascularisation de la plaie est moins développée au niveau des membres chez le cheval, elle est 2,22x moins importante par rapport à une blessure au niveau du thorax (Lepault et al. 2005). Durant la prolifération des fibroblastes, la production de TGF β permet la stabilisation topographique des cellules et assure leur ancrage en activant la production des molécules d'adhésion cellulaire. Un changement dans le ratio des isoformes de TGF β en serait la cause. Les TGF β -1 et -2 diminuent alors que le TGF β -3 augmente en quantité (Yang et al. 1999 ; Theoret et al. 2001). Chez le cheval, le pic de TGF β -1 est moins intense, mais est prolongé, ce qui entretient la stimulation des cellules mésenchymateuses. Cette sollicitation continue est un des facteurs amenant à la production d'un tissu de granulation exubérant et est observée plus particulièrement dans la région distale des membres (Van Den boom et al. 2002 ; Wilmink et al. 2005 ; Lepault et al. 2005).

Ensuite vient le processus de fibrogénèse durant lequel les fibroblastes produisent des fibres de collagène de type I, III (derme) et IV (Lame Basale) en grande quantité. Cette synthèse de collagène est activée par les médiateurs (FGF, TGF β , EGF et PDGF) produits par les macrophages et les cellules endothéliales (Cañedo-Dorantes et Cañedo-Ayala 2019). Wilmink et collaborateurs (1999) mettent en évidence que les fibres de collagènes produites par les fibroblastes sont déposées en de très larges bandes.

Grâce à la prolifération et à la migration des fibroblastes, au remplacement de la fibrine par une matrice extra-cellulaire (MEC) composée de collagène et la néoangiogénèse, la phase de réparation épithéliale peut débuter. En effet, le tissu de granulation sert de support aux cellules épithéliales qui vont le recouvrir.

La réépithélialisation débute, sous l'effet du TGF β , PDGF et VEGF produits par les fibroblastes, environ une semaine post lésion (Kawasumi et al. 2012 ; Cañedo-Dorantes et Cañedo-Ayala 2019), lorsque le tissu de granulation a recouvert toute la blessure. Afin d'accélérer la fermeture de la plaie, la contraction des myofibroblastes se produit simultanément. La contraction cesse lorsque les bords du nouvel épithélium formé se rencontrent grâce au mécanisme d'inhibition de contact des cellules épithéliales (Cañedo-Dorantes et Cañedo-Ayala 2019). Les myofibroblastes sont des fibroblastes différenciés qui proviennent des bords de la plaie. Ils sont caractérisés par l'expression d' α -SMA (alpha smooth muscle actin), ce qui leur permet de se contracter comme les cellules du muscle lisse (Desmoulière et al. 1992 ; Kawasumi et al. 2012 ; Denis et al. 2013). Il est important que la contraction de la plaie se fasse le plus rapidement possible et de la façon la plus efficace pour limiter les risques de complication. Chez le cheval, la contraction des myofibroblastes est moins efficace que celle du poney (Wilmink et al. 2010). Cependant, cette inefficacité n'est pas due à un défaut de leur force de contraction. En effet, cette dernière est identique chez les deux équidés lorsque les fibroblastes sont cultivés sur un gel flottant (Wilmink et al. 2010). La seule différence possible est le milieu inflammatoire moins important du cheval qui influencerait les performances des myofibroblastes (Wilmink et al. 2010). L'organisation des fibroblastes dans le tissu de granulation d'une lésion au thorax est bien meilleure que celle observée au niveau de la partie distale du membre. L'organisation correcte de ceux-ci se fait au bout de 3 semaines lorsque la plaie se situe sur le thorax et reste chaotique durant 6 semaines au niveau du membre (Wilmink et al. 1999 ; Lepault et al. 2005). Ce défaut d'organisation proviendrait du milieu inflammatoire

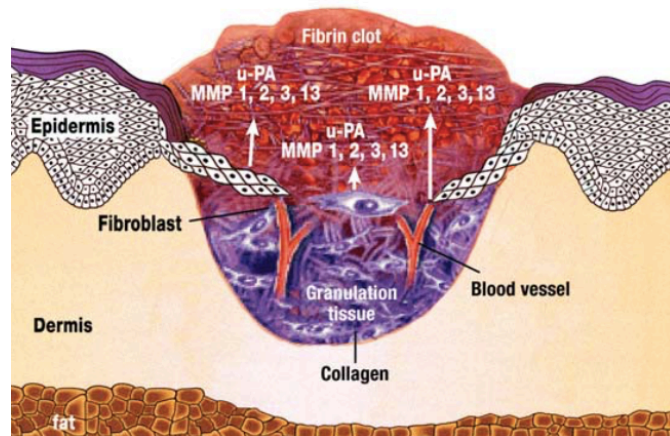


Figure 2 : acteurs cellulaires et moléculaires des dernières étapes de la cicatrisation - Tiré de Kujath et Michelsen 2008

spécifique à la partie distale du membre et diminuerait l'efficacité de la contraction, augmentant ainsi de façon directe le temps de cicatrisation.

Durant la réépithélialisation, les kératinocytes migrent à partir des bords de la plaie et ont une activité mitotique importante. Cette dernière est stimulée par les facteurs de croissance qui sont le FGF, l'EGF, le TGF α (Cañedo-Dorantes et Cañedo-Ayala 2019). La vitesse de réépithélialisation est impactée par la localisation de la plaie. Lepault et collaborateurs 2005 démontrent que ce processus est plus lent lorsque la lésion est située dans la partie distale du membre du cheval. Si une croûte se forme, les cellules épithéliales migrent en-dessous et celle-ci tombera lorsque l'épithélium aura recouvert toute la surface de la plaie.

La réépithélialisation est complète, toutefois la peau restera dépigmentée car les mélanocytes ne migrent pas, tout comme les cellules épithéliales formant les glandes sébacées et sudoripares. Néanmoins, la peau nouvellement formée reste fragile, elle subit donc un remaniement durant plusieurs mois, c'est la phase de maturation.

2.3. Phase de maturation

Les processus de néovascularisation ralentissent pour prendre fin. Un équilibre entre le dépôt de collagène et la collagénolyse se crée. Le tissu de granulation qui était très vascularisé et très cellulaire évolue alors en un tissu peu vascularisé et plus fibreux le rendant plus résistant. Le tissu fibreux va être remodelé. En effet, le dépôt des fibres de collagène par les fibroblastes durant la phase de réparation n'est pas réalisé de façon optimale. La collagénolyse permet de les remplacer par des fibres de collagène orientées dans le sens des lignes de tension de la peau et former ainsi une MEC plus résistante. Ce processus est régulé par toute une série de facteurs de croissance, de

cytokines, de métalloprotéases (enzymes chargées de la dégradation des protéines de la MEC) et de leurs inhibiteurs. On remarque aussi une diminution du collagène du type III et une augmentation du collagène de type I qui compose majoritairement la peau saine.

L'épiderme lui aussi va mûrir en s'épaississant grâce au processus de kératinisation de la peau.

3. Complication de la cicatrisation chez le cheval : l'hypergranulation

Le processus pathologique de l'hypergranulation n'est pas encore totalement compris et est multifactoriel. (Lepault et al. 2005). Le tissu de granulation exubérant se caractérise par une surface irrégulière, des bords dépassant les marges de la plaie, la présence d'une grande quantité d'exsudat, une inflammation chronique et une contraction médiocre à cause de la fibrose (Hackett et al. 2011 ; Couturier F. 2019). Son apparition occasionne un obstacle physique à la fermeture de la plaie car il empêche la réépithélialisation, retardant ainsi le rétablissement de l'animal (Lepault et al. 2005). Il existe des facteurs favorisant l'apparition du tissu de granulation exubérant comme la présence d'un corps étranger, d'un séquestre osseux ou encore d'une infection (Theoret et al. 2008). En plus de ces facteurs extérieurs, les chevaux possèdent une tendance intrinsèque à développer une inflammation chronique au niveau des plaies appendiculaires, ce qui prolonge la stimulation de la prolifération des fibroblastes via toute une série de cytokines et de facteurs de croissance dont le TGF- β (Lepault et al. 2005). Schwartz et collaborateurs (2002) dans leur étude mettent en évidence une synthèse importante de collagène au niveau de la plaie. Cela est rendu possible par la présence de nombreux myofibroblastes, de collagène de type I, de TGF- β 1 et une diminution de métalloprotéase 1 (MMP-1). La présence de ces différents acteurs signifie qu'il existe un déséquilibre entre la production et la dégradation du collagène. L'utilisation de facteurs inhibant la production de ce dernier ou stimulant sa collagénolyse serait une piste à suivre pour éviter la formation de tissu de granulation exubérant chez le cheval. Theoret et collaborateurs (2001) confirment l'implication du TGF β dans ce déséquilibre. Ils réalisent un dosage des isoformes 1 et 3 du TGF β au niveau de la plaie pour suivre la fluctuation de leurs taux dans le temps (14 jours). 24h après l'incision, une augmentation du taux de TG β -1 est observée dans les deux localisations (membre : 6037 ± 1496 pg/g, thorax : 5311 ± 997 pg/g). Il n'existe pas de différence significative entre le membre et le thorax. Le pic de TG β -1 diminue de façon graduelle pour retourner à son taux basal à j 14 au niveau de la

plaie du thorax mais un taux élevé est maintenu au niveau de la plaie du membre même après 14 jours. Le $TG\beta$ -3 quand à lui, augmente de façon progressive avec un pic à j 14 pour le membre et un pic à j 10 pour le thorax. Ceci met en évidence l'existence d'une régulation réciproque entre le $TG\beta$ -1 et le $TG\beta$ -3. Lorsque le $TG\beta$ -1 est élevé, le $TG\beta$ -3 est bas. Au vu de la différence d'efficacité de la cicatrisation entre le thorax et le membre, le ratio $TG\beta$ -1/ $TG\beta$ -3 serait l'un des facteurs l'influençant. Jørgensen et collaborateurs (2020) mettent en évidence cette réaction inflammatoire faible et prolongée au niveau des membres par le biais d'observations histologiques et la quantification de l'expression de gènes codant pour des cytokines et facteurs pro-inflammatoires. Cette chronicité de l'inflammation est caractérisée par un pic d'expression du gène MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) retardé (membre : j 14, corps : j 7) et une expression des gènes codant pour l'IL-1 β et l'IL-6 restant élevée jusqu'à j 27.

Une autre piste sur l'apparition du phénomène d'hypergranulation serait une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) incontrôlée (Jørgensen et al. 2019). C'est un processus se déroulant de façon physiologique durant l'embryogenèse. Une augmentation de l'expression des N-cadhérines et une diminution de l'expression des E-cadhérines permettent aux cellules épithéliales embryonnaires de switcher en cellules mésenchymateuses et d'acquérir la capacité de migrer (Greeburg et al. 1988). Jørgensen et collaborateurs (2019) mettent en évidence l'existence de ce switch chez le cheval : l'expression de N-cadhérine apparaît dans les kératinocytes de la périphérie de la plaie et l'expression de la E-cadhérine diminue. La TEM est un processus compliqué car elle est régulée par un nombre important de molécules dont le TGF- β . La production prolongée de ce dernier pourrait induire une stimulation excessive de la TME (les kératinocytes devenant des myofibroblastes) et contribuer à la formation du tissu de granulation exubérant (Jørgensen et al. 2019).

Aujourd'hui divers traitements médicamenteux (antibiotiques, corticostéroïdes topiques), non médicamenteux (bandages, thérapie par oxygène hyperbare) et chirurgicaux (débridement, greffe de peau, extenseurs de tissu) existent en médecine équine pour palier à cette hypergranulation et ce retard de cicatrisation (Maher et Kuebelbeck 2018). Des techniques en médecine régénérative ont aussi vu le jour et ont fait leur preuve dans la prévention de l'hypergranulation et la guérison accélérée des plaies appendiculaires chez le cheval (laser, membrane amniotique, cellules souches, acide hyaluronique, plasma enrichi en plaquettes (PRP)) (Dahlgren 2018).

4. L'axolotl, un modèle de guérison parfaite

L'axolotl, *Ambystoma mexicanum*, est une salamandre faisant partie de l'ordre des urodèles. Cette salamandre néoténique possède des propriétés de régénération exceptionnelles. Elle est capable de régénérer entièrement un membre, des parties du système nerveux central ou encore des organes internes (Seifert et al. 2012 ; Voss et al. 2019). Elle est également apte à guérir sans laisser aucune cicatrice à la surface de sa peau lorsque celle-ci a été lésée. L'axolotl a été largement étudié ces dernières décennies afin de comprendre les mécanismes qui permettent la guérison des différentes parties de son corps. En effet, il se distingue des mammifères par sa capacité à restaurer complètement un tissu endommagé, c'est-à-dire, que l'organe récupère sa structure et ses fonctions physiologiques originelles. Il est impossible de faire la différence entre l'élément nouvellement formé et l'ancien.

La régénération d'un organe de l'axolotl suit quatre étapes: (1) la phase inflammatoire (comprenant l'hémostase), (2) la réépithélialisation du moignon amputé, (3) la formation du blastème, (4) la dédifférenciation cellulaire et la repousse de l'appendice. Si les dommages causés à l'axolotl se limitent à la peau, la régénération ne suivra que les deux premières étapes car elle est indépendante de la formation d'un blastème (Seifert et Maden 2014). Le blastème n'est donc pas indispensable à la guérison cutanée mais il l'est pour la repousse d'un membre ou d'un appendice. Des travaux sont en cours sur son utilisation dans le traitement des plaies. Il y a peu de temps encore, le blastème était défini comme un amas homogène de cellules formé sous l'épiderme recouvrant la blessure. Ces cellules résulteraient de la dédifférenciation des cellules différenciées locales en cellules souches multi- ou pluripotentes qui ensuite se différencieraient et se réorganiseraient pour reformer la partie amputée de l'animal (Coulombel et al. 2009). Toutefois cette définition n'est plus d'actualité. En effet, Kragl et collaborateurs (2009) ont remis en cause cette hypothèse dans leur étude sur le suivi de la provenance des tissus formant le nouvel appendice suite à une amputation chez l'axolotl. Ils remarquent que chaque tissu produit en réalité des cellules progénitrices avec un potentiel restreint. Le blastème est donc en réalité un amas hétérogène de cellules progénitrices des différents tissus qu'il devra remplacer.

Ces étapes ont des points communs avec celles retrouvées chez les mammifères. Au cours de celles-ci, des différences sont observables au niveau de ; (1) la durée de la réponse inflammatoire, (2) du nombre de cellules recrutées au niveau du foyer inflammatoire, (3) du nombre et de la morphologie des myofibroblastes et (4) de la quantité de médiateurs produits par les cellules (Lévesque et al. 2006). Très peu d'études ont été menées sur la guérison cutanée en elle-même chez

l'axolotl, se focalisant prioritairement sur les mécanismes de régénération lors d'amputation d'une patte. Cependant, ces recherches peuvent apporter des réponses aux mécanismes sous-jacents à la guérison puisque l'une des étapes obligatoires de la régénération d'un membre est la couverture de celui-ci par un épithélium qui ne laisse pas de démarcation entre le corps et le nouvel appendice (Lévesque et al. 2006).

La guérison des plaies chez l'axolotl a été étudiée dans sa forme aquatique, dite paedomorphique et sa forme terrestre, dite métamorphique. La forme terrestre étant l'état adulte de l'axolotl, pourrait apporter des éléments de réponse sur les différences existantes entre mammifères et urodèles. Le déroulement de la régénération dans les deux formes de l'axolotl sera donc abordé dans la suite du travail.

4.1. La phase inflammatoire

Comme chez les mammifères, le processus de guérison de l'axolotl débute par l'hémostase qui se réalise en quelques secondes (Kawasumi et al. 2012). Celle-ci se limite à une fine couche de plasma coagulé dans le lit de la plaie, il n'y a pas de réelle formation d'un clou plaquettaire (Seifert, A.W., 2012). L'axolotl terrestre présente un clou plaquettaire plus conséquent mais reste réduit par rapport à celui trouvé chez les mammifères. En effet, il est constitué de globules rouges et de plasma mais il n'est pas encore établi en quelle mesure la fibrine contribue au maintien de ce caillot (Seifert et al. 2012). En effet, Seifert et collaborateurs (2012) n'ont pas réussi à mettre en évidence la présence de l'enzyme Platelet tissue activator (PLAT) dont le rôle est de transformer le plasminogène en plasmine dont le but est de dégrader la fibrine du clou plaquettaire. Il n'existe actuellement pas d'informations sur les différents facteurs de croissance contenus dans les granules des plaquettes chez les amphibiens et leur chimiotactisme exercé sur les cellules inflammatoires (Seifert et al. 2012).

Suite à l'hémostase, les cellules inflammatoires vont migrer à l'endroit où le tissu a été lésé. Comme chez les mammifères, les neutrophiles migrent au niveau du foyer inflammatoire et sont les premières cellules sur place. Cependant, ils sont en nombre restreint voir absents dans certains cas. Ils ne sont présents que 24h après les dommages causés à la peau (Lévesque et al. 2010, Seifert et al. 2012). Lévesque et collaborateurs (2010) attribuent l'absence de neutrophiles au type de trauma occasionné (biopsie en pleine épaisseur de la peau sans toucher le muscle). Ils sont d'ailleurs une

part mineure des leucocytes présents sur le site d'inflammation. Seifert et al. 2012 ont mis en évidence la présence de nombreux leucocytes entre le nouvel épiderme et la couche musculaire grâce à la détection de L-plastin dans les cellules. Ils remarquent également que le nombre de leucocytes est plus élevé chez l'axolotl métamorphique au début de la phase inflammatoire. La quantité de cellules leucocytaires tend à être égale dans les deux formes suite à la réépithélialisation. Leur présence est détectée jusqu'à 14 jours post lésion. Ziegels et collaborateurs (1971), lors de leur étude sur la migration des mélanocytes suite à une plaie chez l'axolotl, ont tenté de mettre en évidence la présence de macrophages mais sans succès. Cependant, si les macrophages ne semblent pas indispensables à la réparation de l'épiderme, ils le sont pour la régénération d'un appendice.

4.2. La phase de réparation

Aux abords de la plaie, des kératinocytes prolifèrent de façon minimale et migrent rapidement grâce à des pseudopodes (Wallace 1981 ; Kawasumi et al. 2012 ; Huang et al. 2016). Tanner et collaborateurs (2009) observent que la réépithélialisation chez l'axolotl est déclenchée par une augmentation du volume des kératinocytes qui ensuite migrent selon le mouvement d'un vortex. Moins de 24h, pour une plaie allant jusqu'à 4 mm de diamètre (Endo et al. 2003, Lévesque and al 2010, Seifert et al. 2012), suffisent à reformer la barrière avec le milieu extérieur. En effet, Lévesque et al 2010 ont remarqué que les cellules épithéliales commencent à migrer aux abords de la plaie à peine 1h après l'incision. Cette rapidité de migration est permise par la production de TGF β -1 par les kératinocytes sur le front de migration (Donaldson et al. 1995 ; Lévesque et al. 2010). Pour l'axolotl terrestre, dont l'épiderme est stratifié et non pseudostratifié comme pour sa forme aquatique, la réépithélialisation débute 18-24h post lésion comme chez les mammifères. La vitesse de réépithélialisation est aussi diminuée par rapport à la forme pédomorphique, le recouvrement d'une plaie de 4 mm de diamètre mettant environ 3 jours (Seifert et al. 2012, Ting-Yu Huang et al. 2016). 48h post lésion, l'analyse histologique met en évidence la présence de cellules cubiques parmi les cellules de l'épiderme. Celles-ci apparaissent en plus grand nombre entre le j4 et le j9, et s'agencent en un épithélium proche du muscle. Ces cellules cubiques n'ont pas fait l'état de recherches quant à leur nature mais elles rappellent fortement les cellules cylindriques retrouvées dans l'épiderme recouvrant le blastème dans son stade tardif (Lévesque et al. 2010 ; Seifert et al.

2012). Peut-être que ces cellules cubiques seraient dédifférenciées comme celles du blastème et permettraient la régénération des glandes de l'épiderme.

Le derme est régénéré grâce à l'accumulation de cellules sous l'épiderme entre J 9 et J 12 post lésion. Les fibroblastes s'accumulant pour régénérer le derme ne proviendraient pas du tissu conjonctif existant entre les cellules musculaires mais plutôt du derme des bords de la plaie (Lévesque et al. 2010). Cependant, ils ne sont appelés fibroblastes que par leur forme effilée et leur présence dans le derme. Lévesque et collaborateurs 2010 expliquent qu'on ne peut les identifier via un marqueur spécifique et ne font que supposer qu'il s'agit bien de fibroblastes de par leur localisation et leur forme. Durant leur étude sur le processus de guérison cutanée chez l'axolotl, Seifert et collaborateurs (2012) mettent en évidence que des cellules du muscle sous-jacent à la plaie continuent de se fragmenter 21 jours après l'incision pour donner des cellules mononucléées qui viennent peupler la zone entre le muscle et l'épiderme néoformé. L'origine des pseudo-fibroblastes envahissant le derme serait donc double : une prolifération et migration provenant du derme des bords de la plaie et une dédifférenciation des cellules musculaires. En plus des pseudo-fibroblastes, une nouvelle MEC est déposée pour former le derme à partir de 14 jours après la lésion.

Suite à l'épithélium néoformé, un fin matériel fibreux est déposé et correspondrait à la lame basale. Il faudra plus de 45 jours pour que la nouvelle lame basale soit complète, c'est-à-dire organisée en multiples couches de matériel fibreux (Lévesque et al. 2010 ; Seifert et al. 2012). Cette durée correspond également à la formation du nouveau derme. (Seifert et al. 2012).

La formation de la nouvelle matrice extra-cellulaire (MEC) est retardée car l'épithélium néo-formé est une source importante de métalloprotéases qui sont des enzymes chargées de la dégradation de ses différents composants. La présence de métalloprotéases est indispensable à la réépithélialisation complète de la plaie (Yokoyama 2007). En effet, Ferris et collaborateurs (2010) mettent en évidence que l'inhibition de la réépithélialisation est dose dépendante de l'inhibiteur I de la MMP-9. Le lit de la plaie ne contient qu'une petite quantité de MEC durant les dix premiers jours suite à sa formation avant d'augmenter (Lévesque et al. 2010). Alors que la fibronectine semble absente suite à l'hémostase (MEC provisoire des mammifères), à J7, Seifert et collaborateurs détectent sa présence aux marges de la plaie et sous l'épithélium néoformé. À partir de J 14, la fibronectine est présente en basse concentration dans le tissu de granulation et ce dans les deux formes. Le dépôt de collagène III est majoritaire sous l'épiderme. Ensuite celui-ci est

progressivement remplacé par du collagène de type I au fur et à mesure que le derme devient acellulaire. La fibrose de l'axolotl est donc transitoire et un processus de remodelage (encore non élucidé) permettrait de ne pas former de cicatrice (McCusker et al. 2015 ; Erickson et Echeverri 2018). Durant la régénération du derme, Seifert et collaborateurs remarquent que la tenascine-C est présente à une forte concentration à partir de J7 et celle-ci reste élevée jusqu'à la régénération complète du derme. La tenascine-C peut antagoniser l'activation des cellules T par la fibronectine et est aussi une molécule anti-adhésive promouvant la prolifération et la migration des cellules (Seifert et al. 2012). Toutes ces données mises ensemble ; un haut niveau de métalloprotéases, un haut niveau de tenascine-C, un faible niveau de fibronectine conduisent à l'hypothèse que l'axolotl produit une MEC dont les composants sont importants pour obtenir une réponse de régénération (Seifert et al. 2012 ; Erickson et Echeverri 2018).

Le TGF- β 1 est produit de façon transitoire au niveau des kératinocytes sur le front de migration. On le retrouve aussi exprimé dans le lit de la plaie, sous le nouvel épithélium formé, un jour après la blessure. Ensuite, son taux devient indétectable (Seifert et al. 2012). Ce facteur de croissance induit la production d' α -SMA qui permet la contraction des fibroblastes lors de la cicatrisation chez les mammifères. Cette protéine n'est pas retrouvée dans les fibroblastes de l'axolotl lors du processus de guérison (Lévesque et al. 2010 ; Seifert et al. 2012). Malgré l'absence d' α -SMA l'axolotl réalise une contraction de la plaie de façon similaire à ce qui est observé chez les mammifères (Seifert et al. 2012 ; Yokoyama et al. 2018). De façon surprenante, la contraction est plus importante dans la forme pédomorphique que la métamorphique ($67\% \pm 4,4\%$ et $37,9\% \pm 9\%$ respectivement) (Seifert et al. 2012).

L'axolotl, dans sa forme pédomorphique, guérit complètement de ses plaies après 90 jours (Lévesque et al. 2010 ; Seifert et al. 2012). Il n'existe aucune discontinuité, macroscopique comme microscopique, entre la peau lésée et la peau nouvellement formée.

5. Éléments et hypothèses mis en avant pour comprendre la régénération des urodèles

Seifert et collaborateurs (2012) ont réalisé un schéma (figure 3) comparant la cicatrisation chez les mammifères et la guérison chez l'axolotl dans sa forme pédomorphique et sa forme métamorphique. Il nous permet de comparer la durée de chaque étape de la cicatrisation et de la

guérison ainsi que leur intensité maximale. En comparant le processus de cicatrisation des mammifères à celui de l'axolotl, les observations suivantes peuvent être faites ;

- L'hémostase est d'intensité moindre,
- La réaction inflammatoire est plus courte (13 j vs 15 j) et surtout d'intensité moindre, même si une phase plus aigüe est commune aux deux modèles,
- La réépithélialisation de la plaie est réalisée en 24h, alors qu'environ une semaine sera nécessaire pour les mammifères, elle est 5 à 10x plus rapide que celle des mammifères (Tanner et al. 2009),
- Le dépôt de la matrice extra-cellulaire est retardé, elle ne commence qu'à J 10 post lésion alors qu'elle aura débuté à J 1 chez les mammifères,
- La contraction de la plaie est similaire dans les deux modèles,
- La formation d'un tissu cicatriciel n'est présente que chez les mammifères
- Les annexes cutanées (glandes à mucus) sont régénérées au bout de trois mois chez l'axolotl (Seifert et al. 2012). Lors de la formation de la cicatrice chez les mammifères, les follicules pileux et les glandes ne sont pas régénérées, le tissu est simplement remodelé.

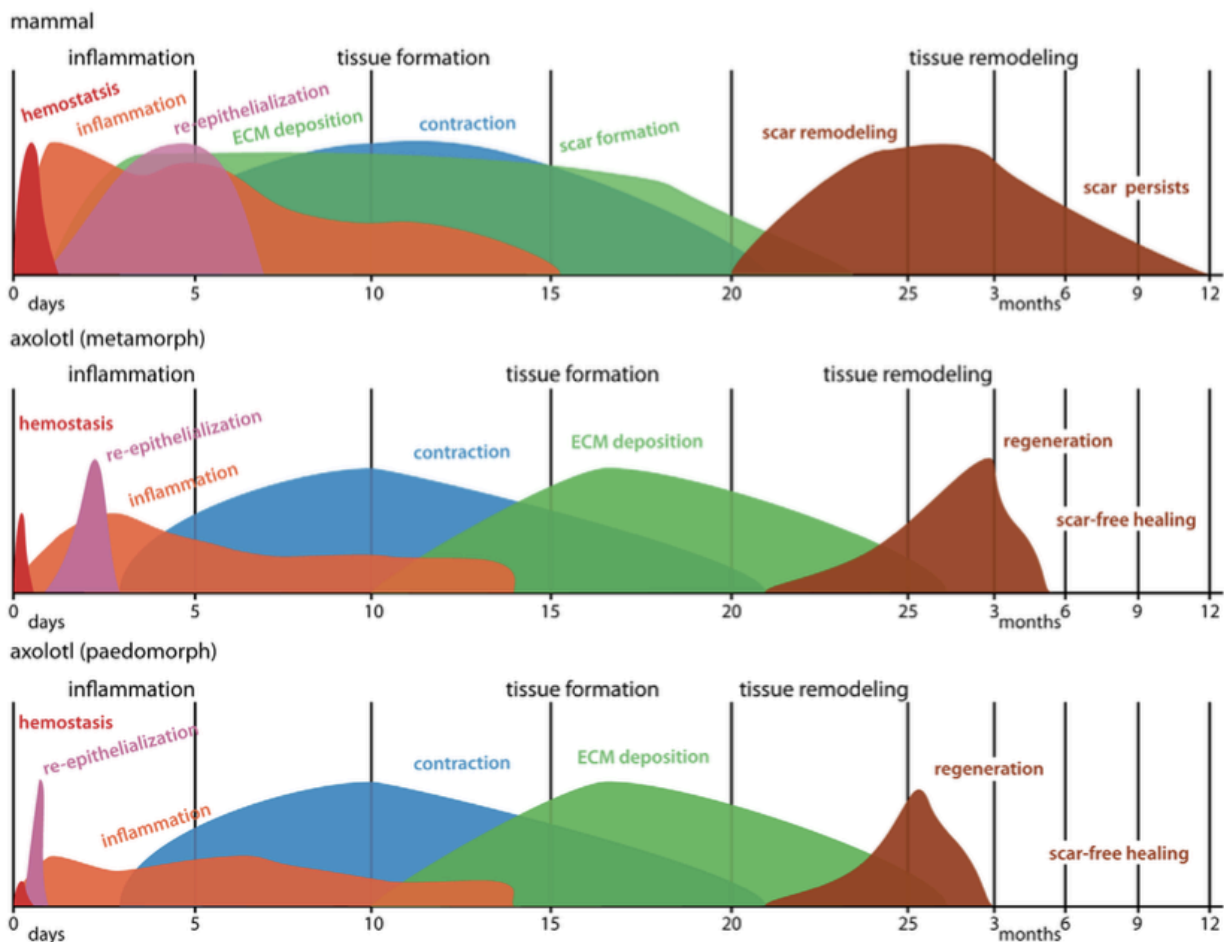


Figure 3 : comparaison des processus de cicatrisation et de guérison en terme d'intensité (axe x) et de durée (axe y) - Tiré de Seifert et al. 2012

De façon intéressante, Erickson et Echeverri (2018), au travers de leurs observations, mettent en évidence qu'il existe trois traits communs aux animaux capables de régénération : (1) une réépithélialisation rapide, (2) une réaction immunitaire amortie et (3) un retard du dépôt de collagène allant de pair avec un remodelage de la MEC.

Seifert et collaborateurs (2012) ainsi que Lévesque et collaborateurs (2010) ont soulevé plusieurs questions quant aux facteurs pouvant permettre à l'axolotl de guérir rapidement et sans cicatrice. En effet, ses capacités de régénération peuvent être dues à son milieu aquatique ou encore à son état néoténique (Seifert et al. 2012). Peut-être que celui-ci est incapable de créer un tissu fibreux comme les mammifères lors de la cicatrisation (Lévesque et al. 2010).

En effet, l'axolotl pourrait avoir gardé des capacités de régénération comparables à celles observées chez les embryons de mammifères durant le premier tiers de gestation grâce à sa forme néoténique. Cette hypothèse a été réfutée de deux façons par Seifert et collaborateurs (2012 et 2014). La première est le fait que la forme terrestre de l'axolotl, étant la forme adulte, garde les mêmes capacités de guérison, bien que ralenties, que la forme aquatique (Seifert et al. 2012). La deuxième étant que la transposition du modèle de guérison chez l'embryon à l'adulte est limitée (Seifert et Madon 2014). En effet, les différentes études menées sur le processus de régénération chez divers embryons de mammifères indiquent qu'elle est caractérisée par ; (1) une réaction inflammatoire faible, (2) une fibrose réduite et (3) une néovascularisation faible (Denis et al. 2013). Ces conditions se rapprochant fortement de celles observées chez l'axolotl. Seulement, la peau lésée de l'embryon n'entamerait pas en réalité un programme de réparation. L'endroit où le tissu a été excisé continue juste à se développer, ce qui mimerait la formation d'un nouvel épiderme et derme au niveau de la lésion. Cette hypothèse est appuyée par le fait que le moment où la guérison sans cicatrice survient quand le développement embryonnaire est achevé (Denis et al. 2013). Ce qu'il manque aux mammifères adultes, c'est la possibilité pour leurs cellules de retourner à un stade dédifférencié et donc de revenir à un programme génétique de type foetal. Ce qui conforte l'idée que ce n'est pas le fait que l'axolotl soit proche d'un stade embryonnaire qui lui procure ses capacités de régénération (Seifert et Madon 2014).

Un deuxième facteur permettant à l'axolotl de guérir parfaitement de ses blessures serait qu'il évolue dans un milieu aquatique. Mais cette hypothèse est infirmée par le fait que la forme terrestre de l'axolotl mexicain garde les mêmes propriétés de régénération bien qu'elles soient plus lentes que pour la forme aquatique (Seifert et al. 2012). Cette augmentation du temps de régénération pourrait s'expliquer en partie par le changement de milieu dans lequel vit l'axolotl et aussi par le fait que son épiderme est stratifié et non pseudostratifié comme celui de la forme aquatique.

Un autre facteur serait que l'axolotl est incapable de former du tissu fibrotique et donc cicatriciel. Cette hypothèse a été infirmée par Lévesque et al. 2010 suite à l'injection de bléomycine à différentes concentrations (100 µg/mL ou 1 mg/mL) au pourtour de plaies chez l'axolotl. La bléomycine est un agent anti-cancéreux dont le mode d'action repose sur la rupture des doubles et simples brins de l'ADN, inhibant ainsi la division cellulaire. Suite aux injections répétées de 100 µg/mL de bléomycine durant 30 jours en sous-cutané, un tissu fibreux a été mis en évidence au niveau de la plaie et la nouvelle membrane basale a mis plus de temps à se déposer. Ce tissu fibreux était encore plus important à la dose de 1 mg/mL et la membrane basale n'a pas été régénérée suite à ces injections.

Les facteurs environnementaux ainsi que la condition néoténique de l'axolotl ayant été écartés de l'équation, il ne reste que le milieu inflammatoire créé lors de la guérison qui diffère de celui des mammifères. Cette différence provient du fonctionnement de son système immunitaire dit immature (Denis et al. 2013 ; Erickson et Echeverri 2018). Il est qualifié de la sorte car l'axolotl, bien qu'il possède des lymphocytes B et T, présente un répertoire limité de MHC II. L'axolotl aurait aussi un système immunitaire se rapprochant de celui du fœtus (Denis et al. 2013). Chez le fœtus, la réponse immunitaire est biaisée vers la réponse Th2. En conséquence, l'expression de ; TNF, IFN- α , IFN- γ , IL-12; IL- β 1 est diminuée et l'expression de ; IL-6, IL-8, IL-10 et IL-23 est augmentée (Flamand 2014). Demircan et collaborateurs (2018) mettent en évidence la baisse significative des taux d'IFN- α , d'IFN- γ et d' IL- β 1 chez des souris traitées avec des greffes cellulaires d'axolotl. De plus, le nombre total de neutrophiles présents sur le foyer inflammatoire ainsi que dans la circulation sanguine est fortement réduit chez l'axolotl (Seifert et al. 2012). Ce recrutement réduit peut s'expliquer par la composition, la densité et la morphologie de la MEC de l'axolotl qui influencent sur la concentration des facteurs inflammatoires et la migration des cellules inflammatoires (Erickson et Echeverri 2018). En effet, les différentes concentrations de facteurs pro- et anti-inflammatoires modifieraient l'expression de certains gènes, communs aux mammifères ou propres à l'axolotl. Des études en génomique ont démontré que les gènes du développement sont fortement conservés entre les espèces (Denis et al. 2013). En se basant sur cette observation, il est plausible que les gènes impliqués dans la régénération de l'axolotl aient été conservés chez le cheval. Leur activité étant réprimée/neutralisée par des facteurs inhibiteurs chez les mammifères ou stimulée chez l'axolotl (Denis et al. 2013). L'épigénétique serait la façon d'atteindre la guérison pour le cheval. L'épigénétique regroupe les mécanismes modifiant de façon réversible, transmissible et adaptative l'expression des gènes sans en changer la séquence ADN. Ces

mécanismes sont le plus souvent une méthylation de l'ADN ou des modifications des histones (Godwin 2014). Il faudrait que les cellules mammaliennes recréent le pattern moléculaire de l'axolotl lors du processus de guérison.

6. Comment utiliser le modèle de l'axolotl pour une perspective de thérapie régénérative chez le cheval ?

Le but final de l'utilisation de l'axolotl en tant que modèle dans la médecine régénérative est de réussir à établir un dialogue avec les cellules afin de leur transmettre un message de guérison et non de cicatrisation. Pour cela, il faut utiliser les bons mots (les facteurs de croissance et les cytokines) au bon moment. Les cellules des mammifères et les cellules de l'axolotl sont capables de répondre aux mêmes facteurs de croissance car ce sont des molécules fortement conservées au travers des différentes espèces. Si le décryptage du message de guérison était complet, il serait donc possible de l'utiliser pour le transmettre aux cellules assurant la cicatrisation. Celles-ci entameraient alors un programme de reconstruction de la peau sans imperfection. Il serait alors possible au niveau local, en trouvant la bonne séquence de molécules, d'induire la régénération de la peau et plus encore. Cependant, ce message n'est pas encore entièrement décrypté et fait l'objet de nombreuses recherches tant en génétique qu'en histologie et immunologie.

Une autre solution pour utiliser le modèle de l'axolotl en médecine régénérative est de l'utiliser en tant que greffe. En effet, puisque les cellules des mammifères sont capables de répondre aux mêmes facteurs de croissance et signaux que celles de l'axolotl, en utilisant les cellules du blastème, il serait possible d'arriver aux mêmes résultats que si le message de guérison avait été décrypté.

Demircan et al. 2016, dans leur étude randomisée en simple aveugle « Axolotl cells and tissues enhances cutaneous wound healing in mice » mettent en évidence la guérison complète de plaies cutanées chez des souris en utilisant le blastème d'axolotl. Afin que le blastème soit formé, trois conditions doivent être réunies : (1) un épithélium doit avoir recouvert la plaie (Wallace 1981), (2) une innervation adéquate doit être présente (Singer 1974) et (3) la présence de cellules du tissu conjonctif d'origine ayant mémorisé la position dans l'espace des différents tissus composants l'appendice (French et al. 1976; Bryant et al. 1981). Ils ont réalisé six groupes contenant chacun six souris ; groupe 1 : greffe d'un blastème, groupe 2 : greffe de tissu provenant de la queue, groupe 3 : traitement à base de cellules du blastème, groupe 4 : traitement à base de cellules provenant de la queue, groupe 5 : groupe contrôle traité avec du sérum physiologique, groupe 6 : groupe contrôle positif traité au Madécassol, une crème topique contre les ulcérations cutanées. Afin de caractériser

le degré de guérison des tissus lésés après traitement, ils ont évalué divers paramètres sur le plan macroscopique (la fermeture de la plaie), histopathologique (organisation du derme et de l'épiderme, épaisseur du tissu de granulation, angiogenèse et vascularisation) et immunologique (production de facteurs pro-inflammatoires ; IL-1 α , IL- β , IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α) durant 10 jours. Au terme de leurs observations, ils ont constaté que les groupes ayant reçu une greffe d'axolotl avaient : (1) une vascularisation et (2) une réépithélialisation meilleures, (3) une formation du tissu de granulation plus rapide, (4) un niveau de production des différentes cytokines pro-inflammatoires moins élevé et (5) une présence de follicules pileux chez certaines souris. Cette différence est significative entre le groupe contrôle positif (traitement au Madécassol) et les groupes traités avec les échantillons d'axolotl. Au niveau des taux de cytokines et molécules pro-inflammatoires, ils mettent en évidence une baisse significative d'IL-1 α , d'IL- β -1, IFN- γ et de TNF- α chez les souris traitées avec des cellules ou tissus provenant de l'axolotl par rapport aux souris du groupe contrôle. Une baisse de l'IL-4 et IL-10 n'est pas mise en évidence. Chez les animaux traités au Madécassol, une baisse significative de l'IL-1 α et de l'IL- β -1 par rapport au groupe traité avec du sérum physiologique est observée. Cette étude montre qu'un dialogue entre les cellules murines et celles de l'axolotl est établi et qu'il permet l'absence de cicatrice chez la souris.

Oveissi et collaborateurs (2019) ont étudié les effets sur la cicatrisation d'un hydrogel d'alginate enrichi en nanoparticules de pectine chargées en lipoxigénase épidermique d'*Ambystoma mexicanum* (AmbLOXe). Cette protéine est connue pour accélérer le processus de cicatrisation, en effet, elle joue un rôle important dans sa capacité de régénération. Seulement, il fallait créer un système permettant de protéger l'AmbLOXe de l'inactivation une fois qu'elle serait instillée et qui permettrait de faire perdurer son activité. Pour cela, ils mirent au point des nanoparticules de pectine chargées en AmbLOXe (Pec-NPs) qu'ils ont ensuite placée dans un hydrogel d'alginate. Ensuite, pour tester l'efficacité de leur produit in vivo, ils ont réalisé trois groupes de six rats ayant subi une blessure chirurgicale de 1,5 cm de diamètre au niveau du dos et ont suivi l'évolution de la plaie durant 12 jours. Le groupe contrôle fut traité avec 1 ml de solution saline, le groupe 2 avec 100 mg d'hydrogel d'alginate contenant des nanoparticules de pectine (Pec-NPs) et le groupe 3 avec 100 mg d'hydrogel d'alginate contenant des nanoparticules de pectine enrichies en AmbLOXe (AmbLuxe Pec-NPs).

Afin de caractériser la vitesse de fermeture de la plaie des différents groupe, ils ont mis au point une formule :

$$\text{Fermeture de la plaie (\%)} = 100 \times \frac{(\text{surface de la plaie à } j_0 - \text{surface de la plaie à } j_n)}{\text{surface de la plaie à } j_0}$$

Au jour 4 et 12, trois rats de chaque groupe furent prélevés pour observer l'évolution de la plaie au niveau histologique. Ils ont évalué la réépithélialisation grâce à un système de scoring : 0 pour une réépithélialisation qui couvre les marges de la plaie, 1 pour une réépithélialisation qui couvre moins de la moitié de la surface de la plaie, 2 pour une réépithélialisation qui couvre plus de la moitié de la surface de la plaie, 3 pour une réépithélialisation qui couvre entièrement la plaie avec une épaisseur irrégulière, 4 pour une réépithélialisation qui couvre toute la surface et dont l'épaisseur est normale. Ils ont en plus évalué la distance entre la lame basale de l'épiderme et le plus bas niveau de la cicatrice. Celle-ci est reconnue par le fait que les bandes de collagène sont majoritairement déposées dans un sens et qu'elles sont plus fines. Leurs observations au bout de 12 jours de traitement, révèlent que le groupe traité avec l'hydrogel d'alginate AmbLOXe Pec-NPs et celui traité avec l'hydrogel d'alginate Pec-NPs présentent une amélioration significative de la fermeture de la plaie par rapport au groupe contrôle. Cette amélioration pourrait être attribuée au fait que l'hydrogel d'alginate apporte un milieu humide enclin à supporter la cicatrisation. Cependant, la surface de fermeture de la plaie est significativement plus petite dans le groupe traité avec l'hydrogel d'alginate AmbLOXe Pec-NPs par rapport à celui traité avec l'hydrogel d'alginate Pec-NPs. Cet effet est donc attribué à l'action de l'AmbLOXe. Pour ce qui est de la réépithélialisation, c'est le groupe traité avec l'hydrogel d'alginate AmbLOXe Pec-NPs qui a montré les meilleurs résultats en terme de rapidité. À J4, le score de réépithélialisation était de 1.66 ± 0.57 pour un score de 0.66 ± 0.57 pour le groupe traité à l'hydrogel d'alginate Pec-NPs et pour un score de 0.33 ± 0.57 pour le groupe contrôle. Cependant, aucun groupe n'a présenté une réépithélialisation complète au bout des 12 jours d'observation. Au vu des résultats, la rapide réépithélialisation observée pour le groupe traité à l'hydrogel d'alginate AmbLOXe Pec-NPs peut être attribuée aux effets stimulants de l'AmbLOXe sur la prolifération et la migration des kératinocytes. Pour chacun des groupes, ils ont aussi investigué la présence ou non d'une cicatrice. Dans chacun des groupes, la formation d'une cicatrice était présente mais son épaisseur varie selon le traitement que les rats avaient subi. En effet, les rats du groupe contrôle ont montré la plus grande épaisseur de tissu cicatriciel et le groupe traité avec l'hydrogel d'alginate AmbLOXe Pec-NPs avait la cicatrice la moins épaisse. Ils n'ont pas pu mettre en évidence de différence significative de l'épaisseur de la cicatrice entre le groupe contrôle et le groupe traité avec l'hydrogel d'alginate Pec-

NPs. La promotion de la réépithélialisation peut donc être un facteur qui induit une moindre formation de la cicatrice.

7. Conclusion

Le modèle de l'axolotl est très intéressant tant par sa complexité que par les prouesses dont cet animal est capable. Bien que les mécanismes menant à la guérison ne sont pas élucidés dans leur globalité, tant au niveau génétique, qu'au niveau immunologique, les travaux de Demircan et collaborateurs (2016) et de Oveissi et collaborateurs (2018) sont très encourageants. Au travers de ces études, ils démontrent que les cellules des mammifères sont réceptives aux messages envoyés par les cellules et produits cellulaires de l'axolotl et peuvent donc induire une amélioration de la cicatrization voire l'absence de cicatrice. Une « greffe » de cellules provenant de cette salamandre suffisant à engendrer une fermeture de plaie sans cicatrice chez des souris au bout de seulement 10 jours.

Toutefois, l'axolotl est-il un modèle pour la médecine régénérative dans l'espèce équine ? Si les cellules murines sont capables de répondre aux signaux envoyés par les cellules de l'axolotl, il y a des raisons de croire que celles des chevaux en seront tout autant capables. Cependant, les plaies encourues chez les souris ou même chez l'axolotl, ne dépassent jamais que quelques millimètres. Or, la taille des plaies que subissent les chevaux sont souvent d'une taille bien supérieure. L'utilisation des traitements détaillés plus haut sera-t-elle suffisante à éviter le tissu de granulation exubérant en induisant une rapide réépithélialisation de la plaie? Des études sur l'utilisation des cellules d'axolotl dans le traitement de plaies plus grandes devraient être menées afin de déterminer les limites de leur efficacité par rapport à la taille de la lésion. Et ainsi déterminer les limites de l'utilisation de ce modèle en médecine régénérative.

Ensuite, la faible réponse inflammatoire et le faible taux de TGF β -1 jouent un rôle dans l'apparition du tissu de granulation exubérant chez le cheval. Dans le modèle de l'axolotl, ces deux paramètres caractérisent justement l'absence de cicatrice. Cependant, le cheval présente une réaction inflammatoire chronique et faible au niveau de la plaie retardant ainsi sa fermeture. L'axolotl quant à lui, malgré sa faible réaction inflammatoire, ne développe pas d'inflammation chronique et reforme la barrière épithéliale très rapidement (moins de 48 h pour une plaie allant jusqu'à 8,5 mm (Huang et al. 2016)). Encore une fois, la vitesse de réépithélialisation d'une lésion

de plus grande taille devrait être investiguée. Car dans le cas du cheval, l'utilisation de « greffe cellulaire » d'axolotl pourrait peut-être augmenter les chances d'apparition d'un tissu d'hypergranulation si la réépithélialisation n'était pas assez rapide. Ensuite, puisque le décodage de la régénération est loin d'être complet, il est probable que le pattern de facteurs de croissance, cytokines et enzymes dans sa globalité puisse éviter le phénomène d'hypergranulation chez les équidés tout en induisant une fermeture de la lésion sans cicatrice ou en améliorant son apparence.

De plus, l'utilisation de cellules d'axolotl comme greffes soulève une question éthique en terme de bien-être animal. En effet, même si les animaux sont anesthésiés lors de leur amputation ou du prélèvement de leurs cellules, qu'en est-il du stress pouvant être subi par les axolotls suite à ces actes? Une étude récente tente de quantifier et de qualifier la douleur de l'axolotl et l'efficacité d'analgésiques (butorphanol et buprénorphine) (Llaniguez et al. 2020). Cependant, lors des différents travaux abordés pour la réalisation de ce travail, aucun ne fait mention d'une analgésie apportée après incision de la peau ou amputation de la queue ou d'un membre.

Pour terminer, l'étude menée par Oveissi et collaborateurs prouve que les cellules mammaliennes sont capables de répondre à une enzyme propre à l'axolotl. Même si une cicatrice est présente à la fin du traitement, l'apparence du tissu cicatriciel est nettement améliorée et la fermeture de la plaie est bien plus rapide. L'utilisation de l'AmbLOXe dans un hydrogel d'alginate pourrait être étudiée chez le cheval pour apprécier son efficacité et son aptitude à éviter la formation d'un tissu de granulation exubérant.

En conclusion, l'axolotl pourrait être un modèle en médecine régénérative dans le traitement des plaies chez le cheval. Cependant, d'autres études doivent être menées afin de comprendre de façon plus fine et précise les mécanismes de la régénération. Grâce à cette compréhension, il sera peut-être possible un jour de reprogrammer de façon locale les cellules participant à la cicatrisation afin qu'elles entament un programme de régénération similaire à celui de l'axolotl. Ces travaux pourront s'étendre, en plus de la guérison des plaies cutanées, à la régénération de parties du corps comme les muscles, les tendons ou même les nerfs. Cet urodèle hors normes offre des perspectives brillantes dans l'établissement de futures thérapies en médecine régénérative.

8. Bibliographie

1. Bertone A., Sullins K., Stashak T., Norrdin R., 1985. 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.* 46(7):1438-1444.
2. Bryant, S.V. , French, V. & Bryant, P.J., 1981. Distal regeneration and symmetry. *Science*, 212, 993–1002.
3. Cañedo-Dorantes L., Cañedo-Ayala M., 2019. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *International Journal of Inflammation*, 1–15.
4. Couturier Fleur, 2019. Prévention et traitement du tissu de granulation exubérant chez les équidés. *Le nouveau praticien vétérinaire équine* 48, 13.
5. Dahlgren L.A., 2018. Regenerative Medicine Therapies for Equine Wound Management. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 34, 605–620
6. Demircan T., Keskin I., Gunal Y., Ilhan A.E., Kolbasi B., Ozturk G., 2016. Axolotl cells and tissues enhances cutaneous wound healing in mice. *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 9.
7. Denis J.-F., Lévesque M., Tran S.D., Camarda A.-J., Roy S., 2013. Axolotl as a Model to Study Scarless Wound Healing in Vertebrates: Role of the Transforming Growth Factor Beta Signaling Pathway. *Advances in Wound Care* 2, 250–260.
8. Desmoulière A., Rubbia-Brandt L., WALz T., Gabbiani A., 1992. α -Smooth Muscle Actin Is Expressed in a Subpopulation of Cultured and Cloned Fibroblasts and Is Modulated by T-Interferon 10. *Expt. cell Res.* 201, 64-73.
9. Dovi J., He L., DiPietro L., 2003. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukoc Biol* 73, 448–455.
10. Endo T., Bryant S.V., Gardiner D.M., 2004. A stepwise model system for limb regeneration. *Developmental Biology* 270, 135–145.
11. Erickson J.R., Echeverri K., 2018. Learning from regeneration research organisms: The circuitous road to scar free wound healing. *Developmental Biology* 433, 144–154.
12. Ferris D.R., Satoh A., Mandefro B., Cummings G.M., Gardiner D.M., Rugg, E.L., 2010. Ex vivo generation of a functional and regenerative wound epithelium from axolotl (*Ambystoma mexicanum*) skin: Generation of regenerative wound epithelium. *Development, Growth & Differentiation* 52, 715–724.
13. Flamand V., 2014. La tolérance néonatale aux allo-antigènes. *Médecine/sciences* 30, 166-72
14. French V., Bryant P., Bryant, 1976. Pattern regulation in epimorphic fields. *Science*, 193, 969–981.
15. Godwin J., 2014. The promise of perfect adult tissue repair and regeneration in mammals: Learning from regenerative amphibians and fish: Prospects & Overviews. *BioEssays* 36, 861–871.
16. Hackett R.P., 2011. How to Prevent and Treat Exuberant Granulation Tissue. *AAEP PROCEEDINGS*, 57
17. Huang T.-Y., Chang C.-C., Cheng N.-C., Wang M.-H., Chiou L.-L., Lee K.-L., Lee H.-S., 2017. Reepithelialization of large wound in pedomorphic and metamorphic axolotls: re-epithelialization in axolotls. *Journal of Morphology* 278, 228–235.
18. Jørgensen E., Hjerpe F.B., Hougen H.P., Bjarnsholt T., Berg L.C., Jacobsen S., 2020. Histologic changes and gene expression patterns in biopsy specimens from bacteria-inoculated and

noninoculated excisional body and limb wounds in horses healing by second intention. *American Journal of Veterinary Research* 81, 276–284.

19. Jørgensen E., Pirone A., Jacobsen S., Miragliotta V., 2019. Epithelial-to-mesenchymal transition and keratinocyte differentiation in equine experimental body and limb wounds healing by second intention. *Vet Dermatol* 30, 417.
20. Kawasumi A., Sagawa N., Hayashi S., Yokoyama H., Tamura K., 2012. Wound Healing in Mammals and Amphibians: Toward Limb Regeneration in Mammals, in: Heber-Katz, E., Stocum, D.L. (Eds.), *New Perspectives in Regeneration, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 33–49.
21. Kragl M., Knapp D., Nacu E., Khattak S., Maden M., Epperlein H.H., Tanaka E.M., 2009. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 460, 60–65.
22. Kujath P., Michelsen A., 2008. Wounds – From Physiology to Wound Dressing. *Deutsches Aerzteblatt* 105, 239-48
23. Llaniguez JT, Szczepaniak MA, Rickman BH, Gelovani JG, Hish GA, Cotroneo TM., 2020. Quantitative and Qualitative Behavioral Measurements to Assess Pain in Axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 59(2), 186-196.
24. Lepault E., Celeste C., Dore M., Martineau D., Theoret C.L., 2005. Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse. *Wound Repair Regen* 13, 520–529.
25. Lévesque M., Villiard É., Roy S., 2010. Skin wound healing in axolotls: a scarless process. *J. Exp. Zool.* 314B, 684–697.
26. Maher M., Kuebelbeck L., 2018. Nonhealing Wounds of the Equine Limb. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 34, 539–555.
27. McCusker C., Bryant S.V., Gardiner D.M., 2015. The axolotl limb blastema: cellular and molecular mechanisms driving blastema formation and limb regeneration in tetrapods: The Axolotl Limb Blastema. *Regeneration* 2, 54–71.
28. Oveissi F., Tavakoli N., Minaiyan M., Mofid M.R., Taheri A., 2020. Alginate hydrogel enriched with *Ambystoma mexicanum* epidermal lipoxygenase-loaded pectin nanoparticles for enhanced wound healing. *J Biomater Appl* 34, 1171–1187.
29. Schlag G., Redl H., Turnher M., Dinges H.P., 1986. The Importance of Fibrin in Wound Repair. *Plastic Surgery - Maxillofacial and Dental surgery* 4.
30. Schwartz A.J., Wilson D.A., Keegan K.G., Ganjam V.K., Sun Y., Weber K.T., Zhang J., 2002. Factors regulating collagen synthesis and degradation during second-intention healing of wounds in the thoracic region and the distal aspect of the forelimb of horses. *American Journal of Veterinary Research* 63, 1564–1570.
31. Seifert A.W., Maden M., 2014. New Insights into Vertebrate Skin Regeneration, in: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, pp. 129–169.
32. Seifert A.W., Monaghan J.R., Voss S.R., Maden M., 2012. Skin Regeneration in Adult Axolotls: A Blueprint for Scar-Free Healing in Vertebrates. *PLoS ONE* 7, e32875.
33. Theoret C.L., Barber S.M., Moyana T.N., Gordon J.R., 2001. Expression of transforming growth factor [beta], [beta], and basic fibroblast growth factor in full-thickness skin wounds of equine limbs and thorax. *Veterinary Surgery* 30, 269–277.
34. Van Den Boom R., Wilmink J., O’Kane S., Wood J., Ferguson M., 2002. Transforming growth factor-b levels during second- intention healing are related to the different course of wound contraction in horses and ponies. *Wound repair and regeneration*. 10, 7.

35. Voss S.R., Ponomareva L.V., Dwaraka V.B., Pardue K.E., Baddar N.W.A.H., Rodgers A.K., Woodcock M.R., Qiu Q., Crouner A., Blichmann D., Khatri S., Thorson J.S., 2019. Regulates Transcription at the Outset of Axolotl Tail Regeneration. *Sci Rep* 9, 6751.
36. Wilmlink J.M., Nederbragt H., Weeren P.R., Stolk P.W.T., Barneveld A., 2010b. Differences in wound contraction between horses and ponies: the in vitro contraction capacity of fibroblasts. *Equine Veterinary Journal* 33, 499–505.
37. Wilmlink J.M., van Weeren P.R., 2005. Second-intention repair in the horse and pony and management of exuberant granulation tissue. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 21, 15–32.
38. Wilmlink J.M., Weeren P.R., Stolk P.W.Th., Mil F.N., Barneveld, A., 1999. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. *Equine Veterinary Journal* 31, 61–67.
39. Yang L., Qiu C.X., Ludlow A., Ferguson M.W.J., Brunner G., 1999. Active Transforming Growth Factor- α in Wound Repair 154, 7.
40. Yokoyama H., 2007. Initiation of limb regeneration: The critical steps for regenerative capacity: Initiation of limb regeneration. *Development, Growth & Differentiation* 50, 13–22.
41. Yokoyama H., Kudo N., Todate M., Shimada Y., Suzuki M., Tamura K., 2018. Skin regeneration of amphibians: A novel model for skin regeneration as adults. *Develop. Growth Differ.* 60, 316–325.
42. Ziegels J., 1971. The melanocytes of the Axolotl. Their modifications during skin regeneration. *Arch Biol (Liege)*. 82(3):407-428.