

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE BATNA1 -BATNA-
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES



THESE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière

Sciences vétérinaires

Option

Anatomie normale des animaux domestiques

Présentée Par:

DAIKH Badis

THEME

**L'effet du plasma riche en plaquettes sur la
reconstitution des tissus chez les ovins**

JURY

Grade et université

Président : AYACHI Ammar

Professeur - Université BATNA-1

Examineur : BENHAMZA Louiza

Professeur - Université CONSTANTINE- 1

Examineur : AISSI Adel

Professeur - Université BATNA-1

Examineur : KHENENOU Tarek

MCA - Université SOUK AHRAS

Directeur de thèse: BENNOUNE Omar

Professeur - Université BATNA-1

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2018-2019.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Bennoune Omar

De l'institut des sciences vétérinaires et agronomiques de Batna.
Qui m'a proposé ce sujet de thèse, et m'a encadré tout au long de ce travail,
Pour sa disponibilité, son aide et ses conseils précieux.
Avec toute ma gratitude et mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur AYACHI Ammar

De l'institut des sciences vétérinaires et agronomiques de l'université Batna 1.
Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,
Hommages respectueux.

A Madame BENHAMZA Louiza

Professeur au département vétérinaire de Constantine
Qui m'a fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury de thèse.
Sincères remerciements.

A monsieur le Professeur AISSI Adel

Chef de département vétérinaire de l'institut des sciences vétérinaires et
agronomique de l'université de Batna 1.
Qui nous a fait l'honneur de faire partie de ce jury de thèse.
Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur KHENENOU Tarek

De l'institut des sciences vétérinaires de Souk ahras
Qui nous a fait l'honneur de faire partie de ce jury de thèse.

Sincères remerciements.

**Aux techniciens de l'institut des sciences vétérinaires et des sciences
agronomiques de l'université Batna 1 et aux techniciennes du laboratoire
d'hématologie et d'histologie du CHU de Batna.**

Merci à tous pour votre aide

DAIKH Badis

DEDICACES

À la mémoire vénérée de mon père,

A toute ma famille, ma mère, ma femme pour son soutien si précieux

A mes filles Ritedj, Assil et Norcine.

Sans oublier mes frères et sœurs pour le support et le soutien moral
tout au long de mes études.

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX.....	I
LISTE DES FIGURES.....	II
LISTE DES ABREVIATIONS.....	V
INTRODUCTION.....	1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I: ETUDE DE LA PEAU ET SES ANNEXES

1. Structure de la peau et ses annexes	3
1.1. L'épiderme	4
1.1.1. Les cellules.....	4
1.1.2. Les différentes couches de l'épiderme	5
1.2. Le derme.....	6
1.3. La jonction dermo-épidermique	7
1.4.L'hypoderme	7
2. La vascularisation, innervation et réseau lymphatique cutané	8
2.1. La vascularisation de la peau.....	8
2.2. L'innervation cutanée.....	8
2.3. Le réseau lymphatique cutané	9
3. Les annexes cutanées (glandes et phanères)	9
3.1. l'appareil pilo-sébacé	10
3.2. les glandes cutanées	11
3.2.1. La glande sébacée.....	11
3.2.2. Les glandes sudoripares	11
3.2.2.1. Les glandes eccrines	11
3.2.2.2. Les glandes apocrines.....	12
4. Histophysiologie de la peau	12
4.1. La protection	12
4.2. La sensibilité cutanée	12
4.3. La thermorégulation	13
4.5. La surveillance immunologique	13
4.6. La régénération de la peau	13

Chapitre II: ETUDE DE LA CICATRISATION DES PLAIES CUTANÉES CHEZ LES MAMMIFÈRES

1. Généralités.....	14
2. Les différentes étapes de la cicatrisation.....	16
2.1. la phase de réponse instantanée (hémostase)	17
2.2. Etape inflammatoire	17
2.3. la phase cellulaire de détersion.....	18
2.4. La phase proliférative des tissus:	19
2.4.1. La formation du tissu de granulation « bourgeon charnu ».....	19
2.4.2. La phase de contraction de la plaie	20
2.4.3. la phase d'épithélialisation	21
2.4.4. La phase de remodelage et de la maturation	22
3. Classification de la cicatrisation des plaies cutanées	23
3.1. la cicatrisation par première intention.....	23
3.2. la cicatrisation de deuxième intention.....	24
3.3. La cicatrisation par troisième intention.....	25
4. Les différents facteurs affectant la guérison des plaies.....	26
4.1. Les facteurs locaux.....	26
4.1.1. L'oxygène	26
4.1.2. Les Infections	27
4.2. Les facteurs systémiques.....	28
4.2.1. la température environnementale	28
4.2.2. L'hydratation.....	29
4.2.3. Le pH de surface	29
4.2.4. L'âge.....	29
4.2.5. Hormones sexuelles chez les sujets âgés.....	30
4.2.6. La nutrition.....	30
4.2.7. Vitamines, micronutriments et éléments traces.....	30
4.2.8. Le diabète	32

Chapitre III: LES PLAQUETTES: FONCTIONS, METHODES DE PREPARATION ET APPLICATIONS MEDICALES.

I. Anatomie et fonctions des thrombocytes.....	33
--	----

1. Structure des plaquettes.....	33
1.1. La membrane.....	34
1.2. Les microtubules	35
1.3. Les microfilaments	35
1.4. Les canalicules	35
1.5. Les organites	36
1.6. Les granules.....	36
2. Fonctions des plaquettes.....	36
2.1. Plaquettes et hémostase	37
2.1.1. Temps pariétal	37
2.1.2. Temps endothélio-plaquettaire	37
2.1.3. Le temps plasmatique.....	39
2.2. Plaquettes et inflammation	39
2.3. Plaquettes et biologie des tumeurs	39
2.4. Plaquettes et fonction de stockage	39
2.5. Plaquettes et fonctions de défense.....	39
II. Plasma riche en plaquettes: historiques, méthodes de préparation et utilisations thérapeutiques.....	40
1. Historique.....	40
2. Définition du plasma riche en plaquettes	40
3. Les différentes techniques de préparation du PRP.....	41
3.1. Méthodes classiques	41
3.1.1. Le prélèvement.....	41
3.1.2. La nature de l'anticoagulant utilisé	42
3.1.3. La quantité de sang total recueillie.....	42
3.1.4. Régime de centrifugation :	42
3.1.4.1. La première centrifugation	43
3.1.4.2. La deuxième centrifugation.....	44
3.1.5. Nombre des globules blancs.....	45
3.2. Méthodes récentes et kits commerciau.....	45
3.2.1. Plasmaphérèse	45
3.2.2. Protocoles Curasan® et Friadent-Schütze®.....	46
3.2.3. Protocole Harvest SmartPreP®.....	47
3.2.4. Protocole « Platelet concentrate collection system » (PCCS)®.....	48

3.3. Propriétés biologiques du plasma riche en plaquettes.....	48
3.3.1. Effet anabolique	51
3.3.2. Effet anti-inflammatoire	51
3.3.3. Effet d'échafaudage « Biomatériaux ».....	51
4. Utilisation médicale des concentrés plaquettaires autologues	52
4.1. Effets sur les structures ostéo-cartilagineuses :.....	52
4.2. Effets sur la cicatrisation cutanée	54
4.3. Autres domaines d'application.....	55

LA PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre IV : MATERIEL ET METHODES

I. Les animaux	57
II. Matériel et méthodes utilisées	57
1. Matériel pour prélèvement de sang	57
2. Matériel de la centrifugation	48
3. Matériel de la petite chirurgie	58
3.1. Matériel pour la réalisation des plaies cutanées	58
3.2. Matériel de l'examen anatomo-pathologique.....	59
4. Matériel de dénombrement des thrombocytes	59
5. Matériel des mesures morphométriques.....	59
6. Matériel d'observation	60
7. Les produits et réactifs utilisés	60
III. Les méthodes utilisées.....	61
1. Choix de l'anticoagulant	61
2. Les prélèvements.....	61
3. Préparation du PRP par une centrifugation unique (Groupe II et III).....	62
4. Préparation du PRP par la double centrifugation (groupes I et IV)	63
4.1. La première centrifugation:.....	63
4.2. La deuxième centrifugation:.....	63
5. Le dénombrement des plaquettes	64
6. Réalisation des frottis	65
6.1. Protocole	65
6.2. Technique de la coloration	66

7. Réalisation des plaies cutanées	66
7.1. Préparation de la peau	66
7.2. Les différents types de plaies	67
7.2.1. Les plaies d'excision	67
7.2.1. Les plaies d'incision	68
8. Traitements des plaies	68
9. Suivi post-opératoire	69
10. Suivi de la cicatrisation	69
10.1. Suivi macroscopique	69
10.2. Suivi microscopique	70
10.2.1. Prélèvements	70
10.2.2. La confection des coupes histologiques	71
10.3 Evaluation histologique de la cicatrisation cutanée	73
11. Testes statistiques	73

Chapitre V : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Etude expérimentale comparée des différents protocoles de préparation de plasma riche en plaquettes chez les ovins	74
1. Présentation des résultats	74
2. Examen des frottis	76
II. Evaluation de l'effet biologique du PRP autologue chez les ovins	78
1. Choix du protocole de préparation du PRP	78
2. Suivi clinique : Les observations cliniques	79
3. Etude des plaies d'incision	79
3.1. Evaluation des aspects macroscopiques des plaies	79
3.2. Etude histopathologique	82
3.2.1. Evaluation histologique de la cicatrisation des plaies	82
3.2.1.1. Biopsie d'une peau saine chez les ovins	82
3.2.1.2. Biopsies réalisées au 3 ^{ème} jour	82
3.2.1.3. Biopsies réalisées au 7 ^{ème} jour	84
3.2.1.4. Biopsies réalisées au 14 ^{ème} jour	85
3.2.1.5. Biopsies réalisées au 21 ^{ème} jour	85
3.2.1.6. Biopsies réalisées au 28 ^{ème} jour	86

4. Etude des plaies d'excision	89
4.1. Aspects macroscopiques	89
4.2. Suivi morphométrique : Etude de variation du pourcentage moyen de contraction des plaies.....	91
4.2.1. Présentation des données.....	91
4.2.2. Discussion	95
4.3. Suivi histopathologique.....	95
4.3.1. Présentation des données et discussion	95
Conclusion.....	104
Recommandations	105
Références.....	106
PUBLICATIONS	121

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Variations de l'épaisseur de la peau en fonction des espèces	4
Tableau 2 : Schéma général de la réponse inflammatoire..	17
Tableau 3 : Synopsis des facteurs de croissance présents dans le plasma riche en plaquettes	49
Tableau 4 : Résumé des principales études analysant l'efficacité du PRP sur les structures ostéoarticulaires	53
Tableau 5 : Résumé de principales études analysant l'efficacité du PRP sur la reconstitution des tissus cutanés.....	54
Tableau 6 : Résumé de principales études analysant l'efficacité du PRP sur la reconstitution des différents tissus	56
Tableau 7 : Tableau récapitulatif des différents protocoles utilisés lors de la préparation du PRP autologue chez les ovins.....	62
Tableau 8 : Description des différents scores histopathologiques de l'évaluation histopathologique semi-quantitative...	73
Tableau 9 : Résultats des moyennes de dénombrement des plaquettes des quatre groupes étudiés.....	75
Tableau 10 : Variation du pourcentage moyen de la réduction de la surface des plaies.	92
Tableau 11 : Résultats de l'évaluation histopathologique semi-quantitative.	96

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Vue tridimensionnelle schématique d'une coupe de la peau chez les mammifères.	3
Figure 2 : Organisation schématique de la structure de l'épiderme.....	5
Figure 3: Schéma de l'organisation des annexes cutanées	10
Figure 4: Les principaux événements et étapes de cicatrisation.	15
Figure 5: Les principales étapes de cicatrisation des plaies.....	16
Figure 6: Cicatrisation de la plaie à trois jours	18
Figure 7 : La phase proliférative	20
Figure 8: La phase de remodelage	23
Figure 9: Evolution macroscopique de la cicatrisation par deuxième intention des différentes formes de plaies.....	25
Figure 10: Classification de la guérison des plaies.	26
Figure 11 : Représentation schématique d'ensemble du thrombocyte avec son état de repos et son état d'activation.	33
Figure 12: Morphologie et ultrastructure des plaquettes.....	34
Figure 13: Fonctions des plaquettes	37
Figure 14 : Les différentes étapes de d'adhésion	38
Figure 15: Organigramme décrivant le concept technologique de production du PRP	43
Figure 16: La plasmaphérèse.....	46
Figure 17: Kit PRP Friadent-Schütze.....	47
Figure 18: Système PRP Smart PRP.....	48
Figure 19 : Les principaux effets biologiques du PRP.....	49
Figure 20: La centrifugeuse.....	58
Figure 21: Matériel de rasage, de la petite chirurgie et de biopsie (punch biopsie)	58
Figure 22: Micropipettes et hémocytomètre (Neubauer improved).....	59
Figure 23: le pied à coulisse numérique.....	60
Figure 24 : Microscope optique OPTIKA DM-25 doté d'une caméra.	60
Figure 25 : Diagramme de la préparation du plasma riche en plaquettes (PRP).	64
Figure 26 : : Aspect microscopique des plaquettes	65
Figure 27 : Les étapes de préparation de la peau.	67
Figure 28: Les différentes plaies d'excision.....	68

Figure 29: Les différentes plaies d'incision et d'excisions.	68
Figure 30: Mesure de contraction des plaies à l'aide d'un pied à coulisse numérique.	70
Figure 31: Biopsie cutanée à l'aide d'un punch biopsie.	70
Figure 32: Diagramme de la confection d'une coupe histologique.	72
Figure 33: Taux moyen des plaquettes dans le sang total et dans le PRP des différents groupes.	75
Figure 34: Les frottis réalisés à partir du sang et des échantillons de PRP (MGG x 100)	76
Figure 35: Proportion des plaquettes	78
Figure 36: Evolution de la cicatrisation et aspect macroscopique des plaies d'incision.....	81
Figure 37: Aspect histologique de la peau chez le mouton (H&E, X40).....	82
Figure 38: Aspect histologique à J3 (H&E, X40)	83
Figure 39: Aspect histologique à J7 (H&E, X40)	84
Figure 40: Coupe transversale de la plaie traitée par le PRP à J14 (H&E, X100).....	85
Figure 41 : Aspect histologique de la plaie traitée par le PRP à J21 (H&E, X40)	86
Figure 42: Coupe transversale de la plaie traitée par le PRP à J28 (H&E, X40).....	87
Figure 43 : Aspect macroscopiques de la cicatrisation.	90
Figure 44 : Variations du pourcentage de contraction de la surface des plaies en fonction des différents traitements administrés.	94
Figure 45 : Aspects histopathologiques des biopsies réalisées à partir des plaies d'excision (H&E, X40).....	98
Figure 46: Coupes histologiques au niveau des plaies au 3 ^{ème} jour de cicatrisation (H&E, X100) (H&E, X100).....	101
Figure 47: Coupes histologiques au niveau des plaies au 7 ^{ème} et 14 ^{ème} jour (H&E, X100). 102	

LISTE DES ABREVIATIONS

ACD: Adénosine citrate dextrose
ANOVA: Analyse de variance.
ARN: Acide ribonucléique.
ATP: Adénosine triphosphate.
CD 9: Cluster of Differentiation 9.
CPD : Citrate-phosphate-dextrose
CPD-A: Solution de citrate-phosphate-dextrose avec adenine.
cPRP : Concentré plaquettaire riche en plaquettes
GLUT3 : Transporteur de glucose 3
GPAR-1 : Récepteur couplé aux protéines-G
GPCR : Récepteurs couplés aux protéines G
GPIb-V-IX : Le complexe glycoprotéique plaquettaire
GPLA : protéine G activatrice d'une phospholipase A
HHDPs : Papilles dermiques de cheveux humains.
II bIII a : glycoprotéine alpha II beta3-integrine
IL: Interleukine
LSD: Différence la moins significative
MGG: May Grunwald et Geimsa
MMP-1, 3: Métalloprotéinases matricielle
PAF : Facteur d'activation des plaquettes
PAL : Phosphatase alcaline
PDGF: Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PMNL: Les leucocytes polymorphonucléaires
PRP: Plasma riche en plaquettes
TGF: Facteur de croissance transformant
TGF- β : Facteur de croissance transformant- β
Th1: Cellule T helper
TNF: Facteur de nécrose tumorale
TNF- α : Facteur de nécrose tumorale- α
VEGF: Facteur de croissance endothélial vasculaire

INTRODUCTION

La mise au point d'adjuvants chirurgicaux bioactifs capable de maintenir le processus inflammatoire et de potentialiser la cicatrisation fait partie des grands défis de la médecine régénérative. En effet toutes disciplines médicales faisant appel aux techniques d'autoréparation tissulaires restent un problème récurrent et objet de discussion de la recherche innovatrice (Dohan et al., 2005). Les concentrées plaquettaires autologues tels que le PRP (plasma riche en plaquettes), issus de la technologie des colles de fibrine des années 1990 offrent une nouvelle stratégie thérapeutique et un défi d'espoir au centre de l'attention des patients souffrant des pathologies réfractaires et rebelles aux traitements classiques. D'autant plus qu'ils peuvent s'avérer peu coûteux, de fabrication aisée et rapide. En outre, depuis janvier 2011, ils ne sont plus repris sur la liste des produits dopants (Smets et al., 2012). Dans cette optique, plusieurs études ont été rapportées mais largement controversées, dont la principale divergence est l'absence d'un consensus exact concernant les protocoles de sa préparation. (Anitua et al., 1999 ; Marx, 2004 ; Aghaloo et al., 2002).

La cicatrisation des plaies est l'un des événements biologiques les plus complexes après la naissance (Gillitzer et al., 2001). C'est un processus physiologique qui permet la restauration tissulaire grâce à une cascade organisée d'événements cellulaires et moléculaires complexes. Classiquement on distingue deux modes de cicatrisation des plaies cutanées suivant les conditions de traumatisme et de traitement. Des plaies de première intention, cicatrisent rapidement et sans contraction, et des plaies avec pertes de substance, cicatrisent moins rapidement ou par deuxième intention. Parmi les événements biologiques qui génèrent la cicatrisation, l'étape inflammatoire, dite parfois même cruciale, initiée souvent par un mécanisme d'hémostase qui a pour objet d'empêcher la perte accidentelle du sang. Ostvar et al., (2015), ont rapporté que les plaquettes jouent un rôle capital dans le processus de guérison des plaies cutanées, et leurs activations s'accompagnent par une production sécrétoire des différents facteurs de croissance qui agissent soit directement ou indirectement sur tous les aspects de la cascade de cicatrisation.

Actuellement, la cicatrisation est sujette aux complications de la peau chez les ovins. En médecine vétérinaire, la demande accrue aux produits qui accélèrent la

cicatrisation et améliorent l'aspect esthétique fait l'objet de plusieurs recherches médicales et économiques (Sardari et al., 2006).

Avec l'hypothèse que le plasma riche en plaquettes favorise la guérison des différents tissus et qu'il peut stimuler l'épithélialisation de la peau, cette présente thèse aura pour but d'évaluer l'efficacité du PRP autologue par son application topique sur des plaies cutanées produites expérimentalement chez les ovins.

Notre étude consiste aussi à :

- Comparer les différentes méthodes de préparation du plasma riche en plaquettes chez les ovins, afin d'apprécier une méthode fiable de préparation du PRP chez les ovins.
- Caractériser les différentes étapes du processus cicatriciel cutané chez les ovins.
- Evaluer le processus de cicatrisation par des mesures morphométriques (étude de variation du pourcentage de contraction des plaies).
- Caractériser tous les changements histopathologiques de la cicatrisation cutanée chez les ovins, liés à l'administration du PRP.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : la peau et ses annexes

(Rappels anatomiques et fonctions physiologiques associées)

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La peau des animaux domestiques, est l'organe le plus étendu du corps, à la fois en poids et en superficie, elle se caractérise par de grandes variations selon la région du corps qu'elle recouvre (heath et al, 2008). Elle constitue une barrière physique entre l'environnement extérieur et l'intérieur de l'organisme. Elle protège l'organisme contre les agressions extérieures, qu'elles soient chimiques, physiques, microbiologiques ou immunologiques.

1. Structure de la peau et ses annexes

L'architecture de la peau est très complexe. Elle comprend, avec ses annexes, tous les tissus histologiques, sauf les tissus osseux et cartilagineux. La peau est subdivisée en quatre régions superposées qui sont de la superficie vers la profondeur (Wheater et al. 1979):

- l'épiderme, correspond à une couche superficielle en contact directe avec le milieu extérieur ;
- la jonction dermo-épidermique;
- le derme ou chorion, correspond à une couche épaisse de tissu conjonctif fibro-élastique ; nourricier et richement vascularisé.
- l'hypoderme, ou couche sous-cutanée qui contient du tissu adipeux en quantité variable (figure 1).

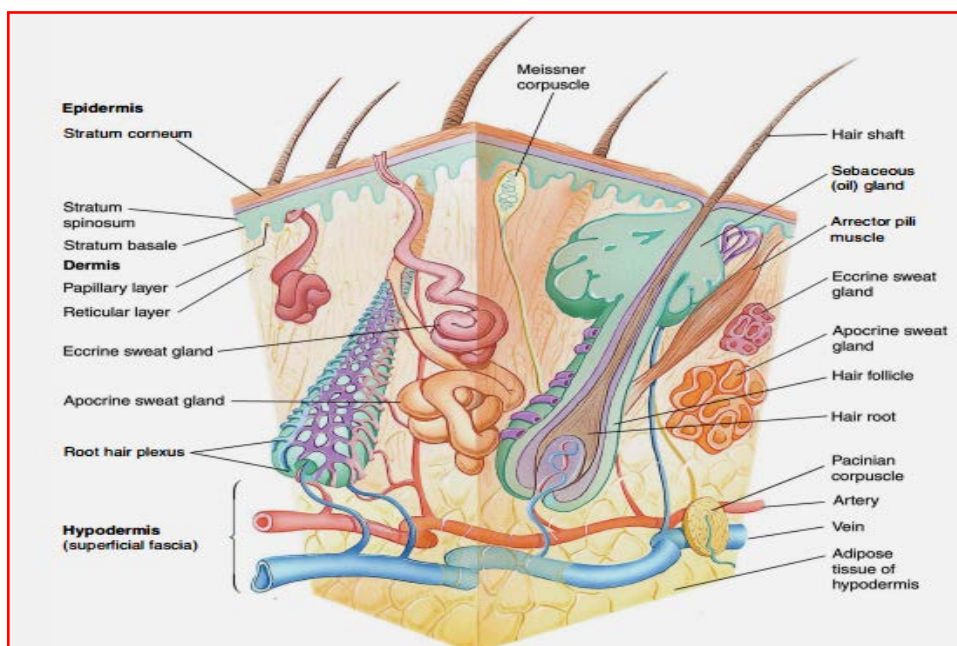


Figure 1: Vue tridimensionnelle schématisée d'une coupe de la peau chez les mammifères (Gartner et Hiatt, 2015).

Dans les différentes régions du corps la peau varie par son épaisseur (Tableau 1), sa couleur et la présence ou non des poils, glandes et ongles (Wheater et al., 1979).

L'épiderme est plus épais sur la ligne dorsale et plus fin sur la ligne ventrale, les aires prégénitales et les pavillons auriculaires. (Carlotti et Mathet, 1994).

Tableau 1: Variations de l'épaisseur de la peau en fonction des espèces

Espèce	Variation de l'épaisseur de la peau	Sources bibliographiques
Le chat	0,40 mm -02 mm	Moor et al., (2001)
Le chien	0,50 mm – 05mm	Moor et al., (2001)
Le cheval	01,70 mm – 6,3 mm	Scott et Miller 2003)
Le mouton	2,5mm-2,8mm	Alzhaxina et al.,(2014)
L'homme	0,50 mm – 03 à 04mm	Chevroment (1975)

1.1. L'épiderme

Correspond à une couche superficielle épithéliale d'origine épiblastique, de point de vue histologique, c'est un épithélium de revêtement pluristratifié pavimenteux kératinisé et avasculaire qui se renouvelle constamment. Il renferme quatre types de cellules épithéliales réparties en cinq couches (Marieb, 2010).

1.1.1. Les cellules

- **Les kératinocytes**, secrètent la *kératine* (protéine fibreuse) formant la masse principale de l'épiderme. Chaque kératinocyte évolue vers la kératinisation.
- **Les mélanocytes**, qui produisent de la mélanine qui colore les kératinocytes et donne la couleur de la peau. Ils protègent la peau des rayons ultra-violet du soleil.
- **Les cellules de Langerhans (macrophagocyte intra épidermique)**, produites par la moëlle osseuse, elles migrent vers l'épiderme où elles phagocytent les antigènes puis les présentent aux lymphocytes (réaction immunitaire).
- **Les cellules de Merkel**, mécanoréceptrice, en petit nombre elles jouent un rôle de récepteur sensoriel du toucher.

1.1.2. Les différentes couches de l'épiderme (Marieb, 2010): l'épiderme comporte cinq couches de cellules qui évoluent de la profondeur vers la surface (figure2)

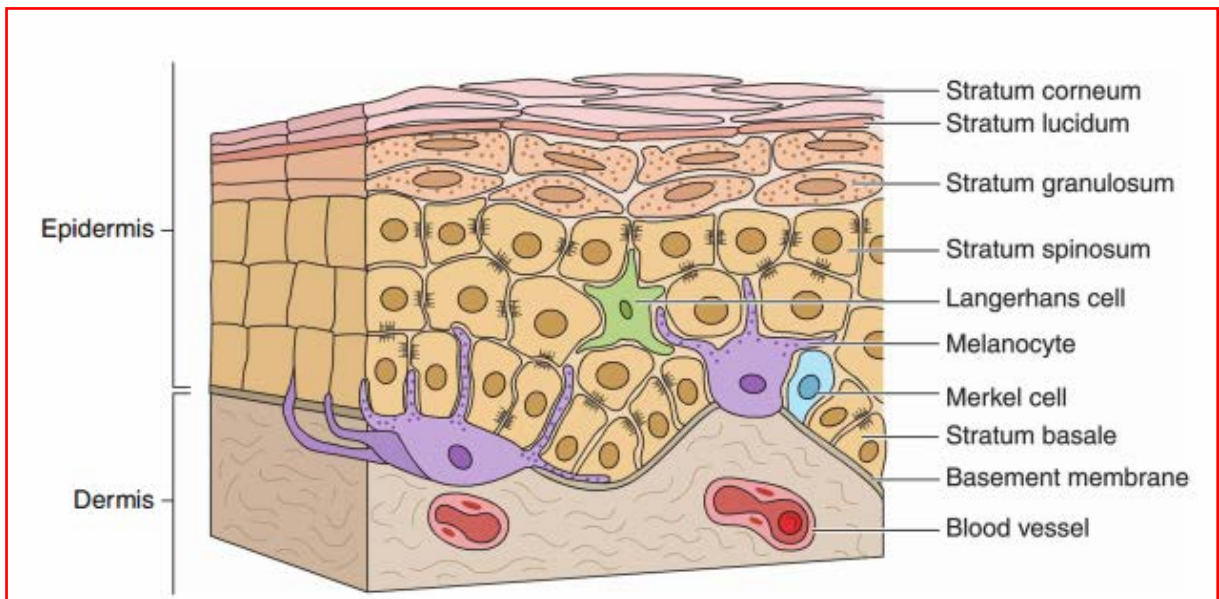


Figure 2 : Organisation schématique de la structure de l'épiderme (Gartner et Hiatt, 2015).

- **La couche basale** (*Stratum germinativum*)
 - Couche la plus profonde qui repose sur la membrane basale qui délimite la jonction dermo-épidermique (Dadoune et al., 1990).
 - Une seule assise de cellules précurseurs cubiques et rondes, basophiles principalement des kératinocytes (85-90%).
 - Indispensables à la cicatrisation c'est elle qui assure l'épithélialisation
- **La couche des cellules à épines ou couche épineuse** (*Stratum spinosum ou corps muqueux de Malpighi*).
 - Cette couche est composée de plusieurs assises de kératinocytes volumineux et polygonaux correspond aux cellules filles (acanthocytes) (Viguiet et Degorce, 1992).
 - Les limites cellulaires apparaissent hérissées d'épines (desmosomes) vers lesquelles convergent les tonofilaments (Dadoune et al., 1990).
 - Le nombre est variable en fonction de la région. Il ne dépasse pas une ou deux couches dans les zones poilues, plusieurs assises dans les zones glabres (les coussinets, la truffe, bourlet coronaire chez le cheval) (Scott et Miller, 2003).

- **La couche granuleuse (*Stratum granulosum*)**
 - Formée de 3 à 5 assises aplaties à noyau pycnotique extrêmement basophile caractérisée par la présence de nombreuses granulations intracellulaires (kératohyaline) participant au processus de kératinisation.
 - Chez les bovins, ces granules contiennent de l'histidine, de l'arginine, de la sérine et de la glycine (Roblin, 2008).
- **La couche claire (*Stratum lucidum*) seulement plante des pieds et paume des mains.**
 - D'aspect vitreux très réfringent, ne s'observe que dans la peau très épaisse seulement présente au niveau de l'épiderme épais qui apparaitre homogène et se colore fortement par l'éosine (Bevelander, 1973).
 - Cette couche homogène formée de 3 à 5 assises de cellules aplaties, éosinophiles et anuclées séparant le *stratum granulosum* et la couche cornée (Wheater et al., 1979).
- **La couche cornée (*Stratum corneum*) couche supérieur de l'épiderme**
 - Formée par l'entassement des cellules aplaties kératinisée et annuclées.
 - Cytoplasme dépourvu d'organites, est occupé par des fibres de kératine qui se présentent sous forme de microfilaments (Dadoune et al., 1990).

1.2. Le derme

Le derme, représente la majeure partie de l'épaisseur de la peau, allant de 0,6 mm ou plus dans la peau des paupières à 3mm ou plus dans la plante des pieds, et plus mince chez la femme que chez l'homme (Fawcett, 2002). Le derme ou chorion est une couche compacte de tissu conjonctif fibro-élastique, au sein duquel on observe le réseau vasculaire, le réseau nerveux et le système lymphatique de la peau (Stevens et al., 1993). Il est composé de deux couches, le derme papillaire superficiel, situé sous l'épiderme, et le derme réticulaire, plus profond, recouvrant l'hypoderme (Wheater et al., 1979). Certaines des papilles que le chorion envoie dans l'épiderme contiennent des anses capillaires et d'autre contiennent des terminaisons nerveuses (Bevelander, 1973). A l'état normal, le derme ne contient qu'un très petit nombre de cellules. Il s'agit essentiellement de fibroblastes inactifs qui assurent le renouvellement du tissu conjonctif, d'histiocytes, de mastocytes et quelques cellules d'origine sanguine : granulocytes, lymphocytes, ainsi que de rares plasmocytes (Coujard et al., 1980).

Dans la couche papillaire on distingue ainsi des cellules pigmentaires et elles se caractérisent surtout par la présence d'expansions nerveuses qui font généralement défaut dans le derme proprement dit, les corpuscules de Meissner, sont par excellence des organes de tact qui apprécient des contacts légers (Chevroment, 1975). Le derme est responsable de la texture, de l'élasticité, de la solidité et de la cicatrisation de la peau. Son rôle est majeur lors de cicatrisation par seconde intention ou la contraction fait intervenir ces propriétés élastiques qui contribuent pour donner à la peau son épaisseur normale (Muller, 1980 ; mailot, 1993).

1.3. La jonction dermo-épidermique

La jonction entre le derme et l'épiderme est une région importante reliant ces deux couches. Elle est organisée d'une façon à empêcher la séparation du derme et de l'épiderme par des forces de cisaillement (Stevens et al., 1993). En microscopie électronique on distingue trois composants superposés outre la membrane plasmique de la cellule basale (très sinueuse) de l'épiderme avec des hémi-desmosomes. De l'épiderme au derme, elle apparaît constituée de la lamina lucida contenant les lamnines 1, 5,6 et le nidogène, la lamina densa formée de collagène de type IV et la zone fibro-réticulaire, riche en fibronectine (Coujard et al., 1980 ; Dadoune et al., 1990).

1.4. L'hypoderme

L'hypoderme est constitué de tissu conjonctif lâche qui relie la peau aux organes sous-jacents, en leur assurant une certaine mobilité. L'hypoderme contient des cellules adipeuses qui forment le pannicule adipeux, dont l'importance variée selon la région du corps, le sexe et les habitudes alimentaires du sujet (Dadoune et al., 1990). Le tissu adipeux qu'il renferme est séparé par des cloisons fibreuses et contient les principaux vaisseaux sanguins et troncs nerveux destinées au derme sus-jacent (Stevens et al., 1993). Les fibres de base de l'hypoderme sont des fibres de collagènes dirigées en tous sens mais assez parallèlement à la surface de la peau. Elles sont abondantes et épaisses à la paume des mains, à la plante des pieds et adhérentes aux aponévroses sous-jacentes (Coujard et al., 1980). L'épaisseur de l'hypoderme varie en fonction des territoires cutanés mais aussi en fonction de l'état d'engraissement de l'animal. Les rôles de l'hypoderme sont principalement d'assurer une réserve énergétique adipeuse, une isolation thermique, une protection mécanique en amortissant des chocs et un maintien des formes de la surface corporelle. Il est également considéré comme un réservoir des stéroïdes et un site de métabolisme et de synthèse d'hormones stéroïdes telles que les œstrogènes (Olivry, 1993).

2. La vascularisation, innervation et réseau lymphatique cutané

2.1. La vascularisation de la peau

La peau reçoit le sang des gros vaisseaux situés dans le tissu sous-cutané qui donne naissance aux branches traversant l'hypoderme en donnant des collatérales pour les lobules adipeux et les glandes sudoripares. Ces vaisseaux forment un réseau artériel profond planiforme (Coujard et al., 1980). Ce réseau, siégeant à la jonction dermo-hypodermique appelé plexus cutané. Au niveau du derme moyen des branches ascendantes de ce réseau formant un réseau planiforme superficiel ou sous papillaire qui se ramifie et donne le réseau capillaire dans chaque papille, autour des glandes sébacées et de la gaine du follicule pileux (Fawcett, 2002). Le retour sanguin est assuré par un réseau veineux à disposition parallèle au réseau artériel. La vascularisation cutanée présente une disposition inhabituelle qui tient compte de plusieurs nécessités fonctionnelles parfois contradictoires : la nutrition de la peau, l'augmentation du flux sanguin pour faciliter la déperdition calorique en cas de chaleur, la vasoconstriction pour les diminuer lorsqu'il fait froid (Wheater et al., 1979).

2.2. L'innervation cutanée

La peau est un organe sensoriel, est richement innervée et donc particulièrement sensible à la douleur. Elle renferme de nombreuses terminaisons nerveuses de différents types (Wheater et al., 1979). Des nerfs efférents abondants activent les glandes de la peau et commandent le flux sanguin en changeant le calibre de petites artères (Fawcett, 2002). Ils innervent également les annexes cutanées, en particulier les muscles érecteurs des poils et les glandes sudoripares (Wheater et al., 1979). Des nerfs sensitifs afférents cutanés qui comprennent à la fois des terminaisons nerveuses libres et des terminaisons nerveuses encapsulées spécialisées. Les terminaisons libres (myélinisées ou non myélinisées) sont nombreuses et sont sensibles à la douleur, prurit et à la température (Stevens et al., 1993). Elles siègent dans le derme papillaire et envoient des rameaux dans l'épiderme dont certains s'associent avec des cellules de *Merkel* et agissent comme des mécanorécepteurs d'adaptation lente. Les corpuscules de *Meissner* qui sont des mécanorécepteurs d'adaptation rapide responsable de la sensation du toucher. Ils sont particulièrement abondants dans le derme papillaire de la pulpe des doigts et des orteils, et des paumes des mains et des plantes des pieds. Dans les corpuscules de *Vater-Pacini*, volumineux (1-2mm) isolé ou en petit amas, situé dans l'hypoderme capable surtout de déceler les vibrations et les mouvements (Dadoune et al., 1990). Les corpuscules de *Ruffini* sont de simples mécanorécepteurs dermiques fusiformes ou feuilletés (Coujard et al., 1980).

Ils sont constitués d'un neurone associé à des fibres de collagène, localisés surtout dans la plante du pied.

2.3. Le réseau lymphatique cutané

Les vaisseaux lymphatiques sont constitués par un réseau de vaisseaux à sens unique permettant le retour de liquide interstitiel vers le sang via des nœuds lymphatiques. Dans la peau, les capillaires lymphatiques naissent par une anse borgne (en cul-de-sac) au sommet des papilles dermiques et suivent le trajet du réseau veineux pour converger et former des canaux collecteurs qui par confluences successives aboutissent aux canaux lymphatiques principaux qui débouchent dans les grosses veines à la base du cou, près de l'oreillette droite (Viguié et Degorce, 1992). D'après (Skobe et Detmar, 2000), la structure des capillaires lymphatiques est différente de celles des capillaires sanguins sur plusieurs aspects importants :

- Les capillaires lymphatiques ont une lumière plus grande (jusqu'à 60µm) et plus irrégulière que celle des capillaires sanguins (17-22µm).
- Les cellules endothéliales des capillaires lymphatiques contiennent de nombreux filaments cytoplasmiques orientés longitudinalement, leur conférant une fonction contractile.
- Les capillaires lymphatiques ne sont pas entourés par une membrane basale ou celle-ci est peu développée.
- Les capillaires lymphatiques n'ont pas de péricytes
- Les capillaires lymphatiques présentent une moins grande densité de jonctions serrées et de jonctions adhérentes.

3. Les annexes cutanées (glandes et phanères)

Des annexes de la peau présentées dans la figure 3, font saillie à la surface et sont visibles. Ce sont les phanères, des productions cornées parmi lesquelles on range les poils, les ongles, les plumes des oiseaux (Chevroment, 1975). Dans ce qui suit nous n'envisagerons que le premier type de phanère (les poils).

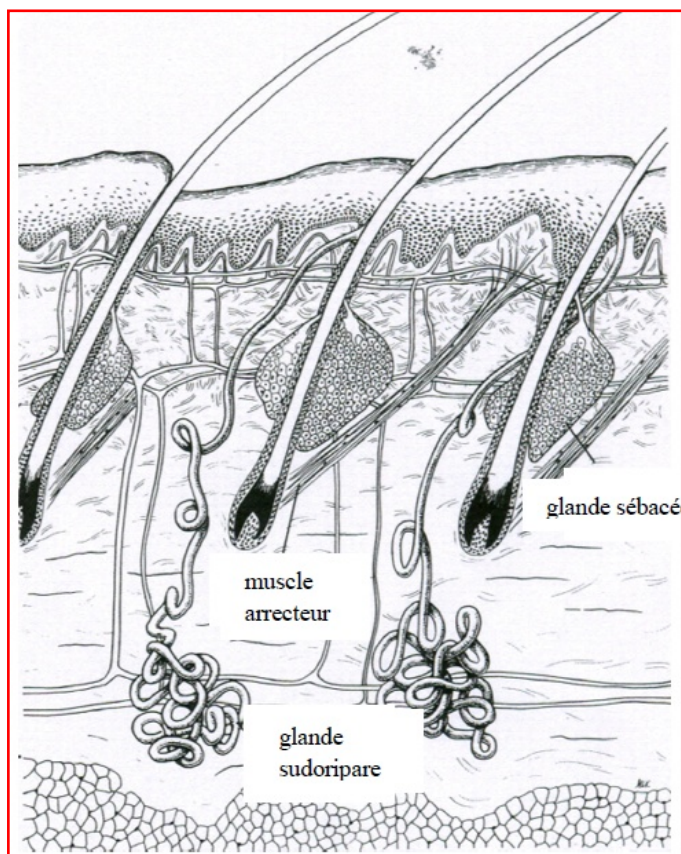


Figure 3: Schéma de l'organisation des annexes cutanées (Stashak, 1984)

3.1. L'appareil pilo-sébacé

Les poils sont présents sur toute la surface du corps sauf au niveau des jonctions cutanéomuqueuses où ils se raréfient. Les poils se développent à partir des invaginations profondes de l'épiderme, appelés follicules pileux. Ces derniers, forment une unité composée d'un poil, de deux glandes sébacées et d'un muscle arrecteur (Fawcett, 2002). Le poil proprement dit, il comporte deux parties ; la tige, qui dépasse la surface de la peau. Le bulbe qui termine la racine et entoure la papille conjonctive. Partant de son bulbe et de sa partie supérieur de flancs de la papille conjonctive, le poil présente une évolution ascendante, qui se termine par un filament kératinisé (Chevroment ,1975). Cet élément kératinisé possède en son centre une médulla, entourée par le cortex qui est recouvert par une fine cuticule. Le cortex, couche principale, pluristratifiée, est composée de cellules cornifiées (Bevelander, 1973).

Le bulbe du follicule pileux subit une atrophie considérable pendant les phases de régénération et de repos, il est remis en état au début de la phase de croissance suivante. Lié à la gaine de tissu conjonctif du follicule pileux, se trouve un ou plusieurs faisceaux de fibres de muscle lisse formant le muscle arrecteur du poil. Chez les animaux à toison leur contraction

sert à dresser les poils ce qui augmente l'efficacité de la fourrure comme une barrière thermique. Chez l'homme, leur contraction en réponse au froid confère à la peau l'aspect d'une chair de poule (Fawcett, 2002).

3.2. Les glandes cutanées

Chez les vertébrés supérieurs, les glandes de la peau sont de deux espèces : les glandes sébacées et les glandes sudoripares, auxquelles se rattache la glande mammaire. Elles drivent de l'ectoblaste primaire ; elles proviennent de bourgeons épidermiques qui se sont enfoncés dans le derme (Chevroment, 1975).

3.2.1. La glande sébacée

Les glandes sébacées sont des annexes des follicules pileux, présentes sous deux formes. Pour la plupart, elles sont associées aux follicules pileux et se développent sous forme de protrusions latérales à partir des follicules, à peu près à la jonction entre leur tiers supérieur et leurs deux tiers inférieurs (Wheater et al., 1979). La glande sébacée associée aux poils dérive d'un bourgeon de la gaine épithéliale externe du follicule pileux. Les glandes sébacées typiques sont acino-alvéolaires simples ou composées, à sécrétion de type holocrine. Elles sont constituées d'une partie sécrétrice, l'alvéole, et d'un canal excréteur court bordé par un épithélium pavimenteux stratifié en continuité avec la gaine épithéliale (Dadoune et al., 1990). Ces glandes secrètent une substance huileuse, le sébum, à la surface du poil, dans la partie supérieure du follicule. Le sébum protège les poils et la surface cutanée de l'eau. Au niveau des zones de transition entre la peau et les muqueuses (paupière, lèvres, gland petite lèvres et mamelon), les glandes sébacées sont indépendantes des poils et secrètent directement à la surface de la peau (Wheater et al., 1979).

3.2.2. Les glandes sudoripares

Il en existe deux types : les glandes sudoripares proprement dites ou glandes endocrines, indépendante du poil, et les glandes sudoripares modifiées, ou apocrines annexées au follicule pileux.

3.2.2.1. Les glandes eccrines

Les glandes eccrines, sont plus profondément situées et logées dans le tissu conjonctif sous-cutané. Elles sont présentes dans toute l'étendue de la peau ; elles manquent parfois au pavillon de l'oreille ainsi qu'à l'ourlet des lèvres et à la surface interne de prépuce

(Chevroment, 1975). Elles sont plus nombreuses au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds. Elles sont très développées chez les habitants des régions tropicales. Ces glandes élaborent la sueur, elles sont tubuleuses, constituées d'un canal excréteur sudorifère et d'une partie sécrétrice ou pelotonnée (glomérule) qui siège dans le derme.

3.2.2.2. Les glandes apocrines

Sont des glandes plus volumineuses que les précédentes. Elles ne débouchent pas directement à la surface de l'épiderme mais dans la gaine d'un follicule pileux ou à un orifice pilo-sébacé, à l'exception de la glande mammaire (Chevroment, 1975). Comme dans une glande sébacée, leur canal s'ouvre dans le canal d'un follicule pileux

4. Histophysiologie de la peau

La peau est un organe actif métaboliquement complexe, qui joue des rôles physiologiques importants :

4.1. La protection

Chez la majorité des vertébrés, la peau est considérée comme un moyen efficace de protection vis-à-vis des agressions extérieure (fourrure épaisse, plumes, écailles et épines). Néanmoins, chez l'homme et malgré l'absence de ces structures, la peau a toujours une fonction protectrice. En effet, la kératinisation de la couche cornée oppose une résistance souple aux traumatismes directs ou par tractions (Fawcett, 2002). Ces fonctions dépendent principalement du derme dont l'armature collagène extensible jusqu'à un certain point tandis que les fibres élastiques permettent le retour à la position antérieure. La protection contre les radiations est réalisée par le système pigmentaire constitué par les mélanocytes qui produisent des mélanosomes dispersées dans le cytoplasme des mélanocytes adjacents (Coujard et al., 1980). En ce qui concerne la protection vis-à-vis des micro-organismes, le revêtement cutané possède également un matériel intercellulaire riche en lipides qui empêche l'entrée des toxines provenant de l'environnement.

4.2. La sensibilité cutanée

Comme nous l'avons déjà mentionnée, la peau possède des récepteurs spécifiques éparpillés dans les différents points cutanés, capables d'assurer la transmission et de perception de diverses sensations de tact (toucher), de pression, de douleur et de froid (Chevroment, 1975).

4.3. La thermorégulation

La peau assure la fonction d'homéostasie thermique dans un milieu extérieur à température variable. La perte calorique se fait par convection, par radiation et par évaporation. Les deux premiers types d'échange thermique sont principalement sous effet de vasodilatation (ouverture des anastomoses artério-veineuses). L'évaporation, est assurée par les glandes sudoripares eccrines (Coujard et al., 1980). Dans un environnement chaud, le flux sanguin cutané peut augmenter chez l'homme jusqu'à 2 à 3 l/m/min. Dans des conditions extrêmes de froid, la vasoconstriction favorise les anastomoses artério-veineuses pour réduire le flux à 50 l/m/min (Fawcett, 2002).

4.5. La surveillance immunologique

En plus d'agir comme une barrière physique, la peau joue également un rôle immunologique important. Elle contient normalement tous les éléments de l'immunité cellulaire, à l'exception des cellules B (Gawkrodger, 2002). Les composants immunitaires les plus importants de la peau sont représentés essentiellement par les cellules de Langerhans qui présentent les antigènes aux lymphocytes. Bien que le nombre des lymphocytes observés dans l'épiderme paraisse faible. Mais dans l'organe tout entier resta plus important que dans le sang (Fawcett, 2002).

4.6. La régénération de la peau

D'une manière générale, les processus régénératifs tendent à rétablir un équilibre détruit, à assurer une réparation organique (Chevroment, 1975). Le renouvellement de l'épiderme est assuré par la division des cellules de la couche basale. La réparation des structures cutanées constitue le phénomène de la cicatrisation.

Chapitre II : Etude de la cicatrisation des plaies cutanées chez les mammifères

1. Généralités

La guérison des plaies est l'un des événements biologiques les plus complexes après la naissance. Il s'agit d'un processus complexe de remplacement des tissus morts par un tissu vital (Vidinsk et al., 2006). Une blessure est généralement définie comme étant tout type de lésions tissulaires, pouvant entraîner un changement de l'architecture originale des tissus et la rupture de l'homéostasie (Stocum, 1995; Gurtner et al., 2008). La blessure est suivie par l'activation de divers événements extracellulaires et intracellulaires qui agissent finalement pour rétablir l'intégrité tissulaire et de restaurer l'équilibre physiologique (Gurtner et al., 2008). Les détails du processus de réparation de la plaie sont complexes et variés, et influencés par de nombreuses caractéristiques telles que la taille, la gravité et la nature de la blessure, ainsi que le site de la blessure. Malgré cette diversité, le processus global de la cicatrisation est la séquence des événements de réparation qui sont le plus souvent très semblables (Gurtner et al., 2008).

Les plaies cutanées sont les lésions les plus fréquemment étudiées et bien documentées pour l'étude de la réparation des plaies en raison de leurs localisations, permettant ainsi un accès facile et une visualisation fiable (Ferguson et O'Kane, 2004). Selon la *Wound Healing Society*; Les plaies sont définies comme une perturbation de la structure et de la fonction anatomique normale de la peau (Atiyeh, 2002). Une plaie est généralement classifiée comme étant aiguë ou chronique. Les plaies aiguës sont caractérisées par des processus réparateurs de guérison qui se produisent d'une façon organisée en temps opportun plutôt que de processus régénératifs. Alors que dans les plaies chroniques, comme les ulcères de stase veineuse, les plaies de pression et les ulcères diabétiques, le processus de guérison réparatrice se produit à un taux réduit qui se traduit par la fermeture de la plaie incomplète.

Les investigations biomédicales sur des plaies cutanées d'incisions et d'excisions (y compris les plaies d'amputations et les brûlures) ont révélés une réponse cellulaire et tissulaire comparable et une séquence d'événements de réparation semblables. En effet, la cicatrisation fait intervenir une cascade de mécanismes biochimiques et cellulaires qui concourent à la restauration de la continuité de la peau et de la majorité de ces fonctions après un traumatisme. Il s'agit d'un processus inflammatoire spécifique au tissu cutané qui s'achève par la mise en place d'un tissu cicatriciel très fibreux (figure 4). Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à décrire les principaux mécanismes de guérisons des plaies cutanées chez les mammifères.

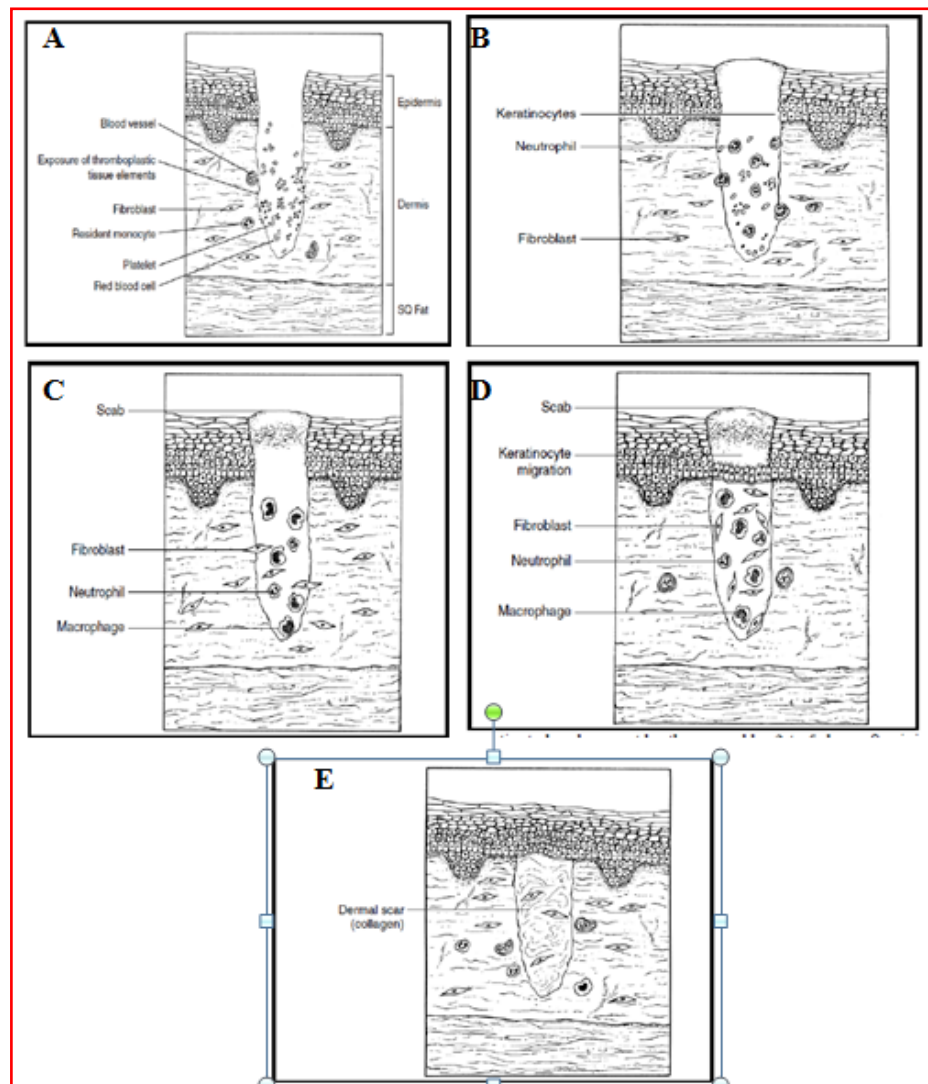


Figure 4: les principaux événements et étapes de cicatrisation (Kumar et al., 2015)

(A) Immédiatement après une lésion tissulaire, l'hémostase est réalisée par dé granulation plaquettaire et exposition des agents thromboplastiques tissulaires.

(B) Dans les 24 heures, un afflux de neutrophiles dans la plaie se produit. Les neutrophiles détruit les débris, les bactéries et sécrètent des cytokines pour l'attraction et l'activation des monocytes et des lymphocytes. Les kératinocytes commencent leur migration lorsqu'une matrice provisoire est présente.

(C) Deux à trois jours après la lésion, les macrophages deviennent le type cellulaire inflammatoire prédominant dans les cellules propres, des plaies non infectées. Ces cellules régulent alors le processus de réparation par la sécrétion d'une armada de facteurs de croissance, y compris les types qui induisent la migration et la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales.

(D) Les fibroblastes sont activés et présents sur le site de la lésion de 3 à 5 jours après la blessure. Ces cellules sécrètent Les composantes matricielles et les facteurs de croissance qui continuent de stimuler la guérison. La migration des kératinocytes commence La nouvelle matrice. La migration commence à partir des bords de la

plaie ainsi que des nids de cellules épidermiques des glandes sudoripares et Follicules pileux au centre de la plaie.

(E) La cicatrisation est le résultat de la guérison dans la peau postnatale. La cicatrice est composée de faisceaux de fibre de collagène désorganisés et denses. Le remodelage se produit jusqu'à 1 à 2 ans après la blessure et consiste en une nouvelle réticulation du collagène et une régression des capillaires qui rendent compte du ramollissement de la cicatrice et de son changement de couleur du rouge au blanc.

2. Les différentes étapes de la cicatrisation

Chez les mammifères, la réparation d'organes ou des tissus lésés ne se fait que par cicatrisation en association de la régénération des composants tissulaires. À ce jour, la cicatrisation cutanée a été largement étudiée chez la souris, le rat, le porc, le mouton, le marsupial, le singe et l'homme (Occleston et al., 2010). Différentes étapes se succèdent d'une manière continue sous la dépendance de facteurs dynamiques locaux, régionaux et systémiques. Traditionnellement, la cicatrisation est décrite selon quatre phases (figure 5) pour en simplifier la compréhension, mais elles sont toutes imbriquées les unes aux autres phases et pouvant coexister simultanément au sein d'une même plaie (Singer et Clarke, 1999 ; Miller et Nanchahal, 2005 ; Gurtner et al., 2008). Le schéma présenté ci-dessous (figure 4) et les données résumées dans le (Tableau 2), montrent les différentes étapes du processus cicatriciel ainsi que les principaux événements cellulaires observés.

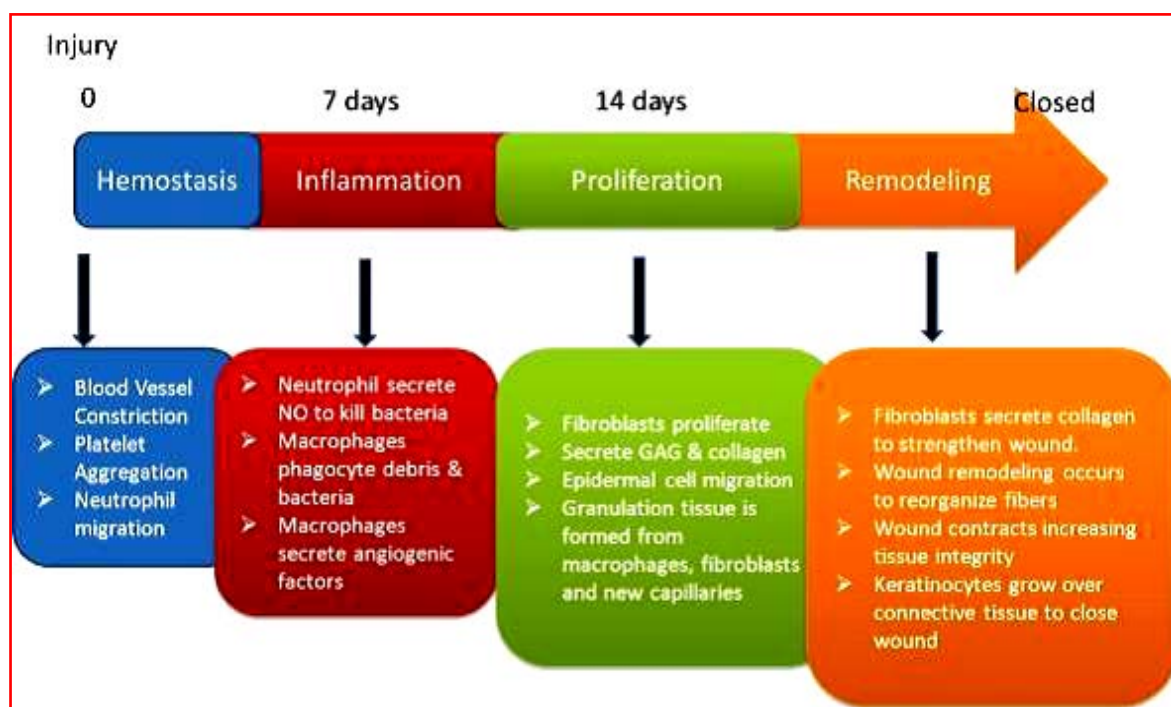


Figure 5: les principales étapes de la cicatrisation des plaies (Schwartz et al., 1999).

Tableau 2 : Schéma général de la réponse inflammatoire (Delverdiere,2002).

	Durée	Chronologie	Evènements
Phase silencieuse	2 à 4 minutes	J0 Premières minutes	- lésion initiale - libération et activation de médiateurs vasoactifs
Phase vasculaire	Environ 24 heures	Le 1 ^{er} jour	- vasodilatation, stase - œdème - diapédèse des neutrophiles
Phase cellulaire de détersion	Environ 24 heures	J1 Le 2 ^{ème} jour	- activation des macrophages - diapédèse des monocytes - intervention éventuelle des lymphocytes - activation des fibroblastes
Evolutions possibles (exemples). Dépendent de l'étiologie de la plaie, de la réactivité du patient et des traitements réalisés.	Très variables	J2 2 ^{ème} jour après quelques jours de quelques jours à quelques semaines de quelques semaines à quelques mois	- résolution - abcédation - cicatrisation - chronicité (granulomes, infiltrats, ulcères, ...)

2.1. la phase de réponse instantanée (hémostase)

Cette réponse immédiate aux lésions tissulaires est principalement déclenchée par la rupture des vaisseaux sanguins et des cellules épidermiques présentées sur les bords libres du site de la plaie. Ces cellules transmettent plusieurs signaux dites de «stress» instantanément après la lésion tissulaire. Les vaisseaux sanguins locaux endommagés réagissent en favorisant l'agrégation plaquettaire pour former un caillot de fibrine « clou plaquettaire ». Ce dernier a pour objectif d'atteindre l'hémostase et d'arrêter la perte de sang (Shaw et Martin, 2009).

2.2. Etape inflammatoire

La phase inflammatoire (Figure 6) a lieu habituellement pendant les premières 48 heures suivant la lésion et est caractérisée par une hémostase et un recrutement de cellules inflammatoires sur le site de la plaie (Gurtner et al., 2008). Une blessure de la peau au-delà de l'épiderme, par des moyens naturels ou chirurgicaux, entraîne des dommages des vaisseaux sanguins ce qui se traduit immédiatement par l'hémostase. L'hémostase initie par la cascade de coagulation et se termine finalement par la formation d'un bouchon au niveau de la plaie (Singer et Clark, 1999; Gurtner et al., 2008). Pendant la coagulation, un bouchon plaquettaire a été formé (hémostase primaire), renforcé plus tard par la matrice de fibrine et les facteurs de coagulation (hémostase secondaire). Cette matrice de fibrine fonctionne également comme un échafaudage pour la migration cellulaire (Miller et Nanchahal, 2005).

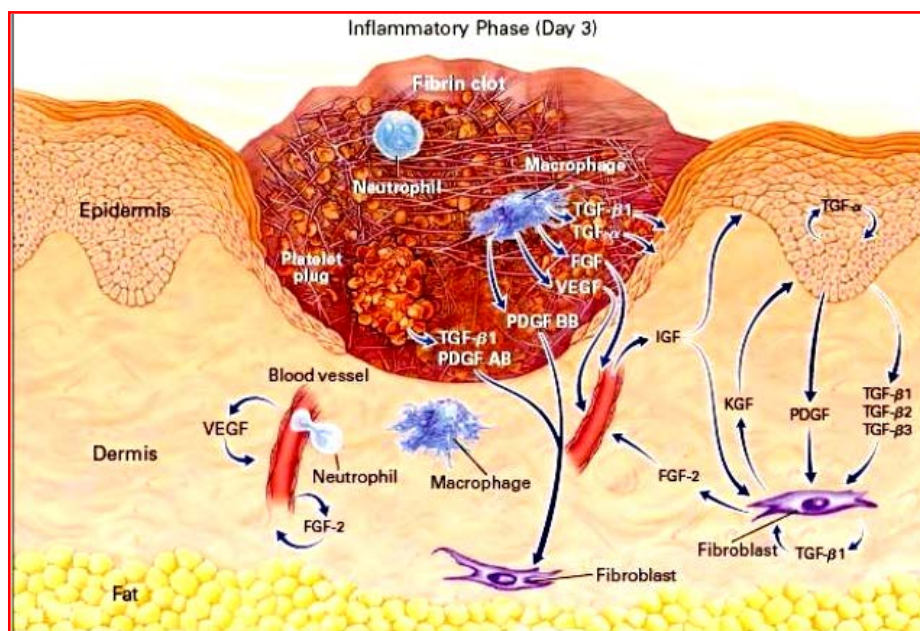


Figure 6: Cicatrisation de la plaie à trois jours (Singer et Clark, 1999).

2.3. la phase cellulaire de détersion

Les premières cellules envahissent le site de la plaie sont des neutrophiles et des monocytes (Miller et Nanchahal, 2005). Les neutrophiles vont affluer vers le site inflammatoire environ 06 heures après la formation de la plaie. Leur nombre atteint généralement un pic de 24 à 48 heures après la formation de la plaie puis décroît rapidement si la plaie n'est pas infectée (Fowler, 1993). Ils sont attirés sur le site de l'inflammation grâce à un médiateur chimiotactique au sein de la matrice extracellulaire précédemment formée tels

que l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α , le TGF- β , la fraction C5a du complément, le leucotriène B₄, des peptides solubles bactériens et des produits de dégradation tissulaires (Fowler, 1993 ; Gregory, 1999 ; He, 2006). Les secondes cellules à affluer sont les monocytes, environ 12 heures post-traumatisme. Cette migration est surtout influencée par le TGF- β , qui favorise la différenciation des monocytes en macrophages qui vont prédominer au 3^{ème}- 5^{ème} jour post-traumatisme. Les macrophages, participent au nettoyage du site de la plaie par phagocytose des débris et de divers micro-organismes (Miller et Nanchahal, 2005). Les macrophages libèrent également divers facteurs de croissance, y compris le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et le facteur PDGF, ce qui amorce la formation de tissu de granulation (Singer et Clark, 1999). Les lymphocytes arrivent plus tardivement sur le site de l'inflammation et leur nombre connaît un pic vers le 6^{ème} jour après la formation de la plaie. Les lymphocytes sécrètent la lymphokine soluble capable d'inhiber la réplication et la migration des fibroblastes et la synthèse de collagène. La phase de détersion se termine quand tous les obstacles à la cicatrisation ont été éliminés de la zone lésée. Une plaie infectée ne pourra jamais cicatriser.

2.4. La phase proliférative des tissus:

Chez l'homme la phase proliférative est subdivisée en 4 événements fondamentaux, qui se déroulent formellement entre le 2^{ème} et le 10^{ème} jour post-traumatisme.

2.4.1. La formation du tissu de granulation « bourgeon charnu »

La formation de tissu de granulation résulte de deux processus confondus ; l'activité fibroblastique associée à l'angiogenèse. Le rôle des macrophages au cours de ce processus est remarquable, ils produisent diverses substances qui stimulent l'angiogenèse et favorisent la différenciation des fibroblastes (figure 7). Ceux-ci incluent le facteur de croissance transformant (TGF), qui favorise la formation de nouveaux tissus et vaisseaux sanguins, et le facteur de nécrose (TNF), ce qui facilite la décomposition du tissu nécrotique, en stimulant la prolifération (Nathan et al., 1987). Le tissu de granulation est caractérisé par une densité élevée des fibroblastes, des granulocytes, des macrophages, des faisceaux de collagène lâchement organisés. Les fibroblastes sont les précurseurs de la matrice provisoire de plaie, sur laquelle la migration et l'organisation des cellules a lieu (Jacinto et al., 2001). La granulation est le terme utilisé pour décrire la nouvelle matrice de plaie composée de collagène et de la matrice extracellulaire (la fibronectine, les glycosaminoglycanes, les

protéoglycanes et l'acide hyaluronique). Cette nouvelle matrice fournit un échafaudage dans lequel de nouveaux capillaires se développent pour former le tissu conjonctif. La croissance des nouveaux vaisseaux sanguins est appelée angiogenèse. Ceci est stimulé par l'activité des macrophages et l'hypoxie des tissus résultant de la perturbation sanguine au moment de la blessure. Le rôle de l'oxygène dans la cicatrisation est complexe et pas encore complètement compris (Flanagan et al., 2000). L'état de la coloration de tissu de granulation est souvent un bon indicateur de la guérison des plaies. Il apparaît avec une rougeur classique et pourrait être facilement traumatisé. Un tissu de granulation de couleur foncée peut signaler que la plaie est ischémique ou infectée (Harding et al., 1994). Vers la fin de cette phase, le nombre de fibroblastes en maturation est réduit suite à une apoptose consécutive et une différenciation en myofibroblastes (Hinz, 2007).

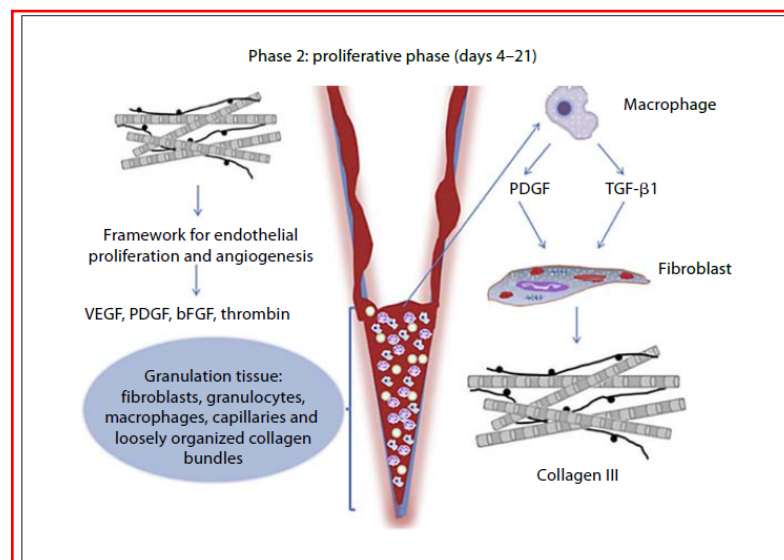


Figure 7 : la phase proliférative (Reinke et Sorg, 2012)

2.4.2. La phase de contraction de la plaie

La contraction de la plaie commence peu après la blessure (5 à 9 jours) et atteint son pic à 2 semaines après traumatisme. Le degré de contraction de la plaie varie avec la profondeur de la plaie. Pour les blessures de pleine épaisseur, la contraction peut diminuer jusqu'à 40% de la taille de la plaie, elle se produit à un taux de 0,75 mm / jour ce qui réduit la durée de cicatrisation. Ceci est influencé par de nombreux facteurs y compris la forme de la plaie, les blessures linéaires se contractent le plus rapidement ; tandis que les plaies circulaires plus lentement (Young et McNaught, 2001)

Les cellules prédominantes de ce processus contractile sont des myofibroblastes en raison de leur capacité à se rétracter. Cette contraction permet de réduire la surface à ré-épithélialiser et de réduire la durée d'épithélialisation. D'après Fowler (1993) et Johnston (1992), la contraction de la plaie est attribuée exclusivement aux myofibroblastes issues de la transformation des fibroblastes au cours de la formation du tissu de granulation, son effet est surtout remarquable au cours de guérison des grandes plaies ouvertes (Brown, 1988). Les myofibroblastes sont caractérisées par des faisceaux de microfilaments d'actine semblables à celles des cellules musculaires lisses (Darby et al., 1990). À l'intérieur de la plaie les myofibroblastes s'alignent le long des berges de la plaie, la contraction se produit dans les directions des lignes de tension de la peau. Cette contraction est influencée par un certain nombre de médiateurs tel que la PGF1, la 5-hydroxytryptamine, l'angiotensine, la vasopressine, les bradykinines, L'épinéphrine, la norépinéphrine, et la fibronectine (Singer et al., 1984). Aujourd'hui, Swaim et al., (2001) attribuent cette contraction à la fois aux myofibroblastes et aux fibroblastes qui peuvent organiser le tissu conjonctif avec consolidation du collagène en tirant la peau vers l'intérieur.

2.4.3. La phase d'épithélialisation

La réépithélialisation est le processus de la restauration épidermique après une blessure cutanée. Elle implique généralement plusieurs processus, y compris la migration des kératinocytes épidermiques dans la plaie, la prolifération des kératinocytes, la différenciation des Néo épithéliums dans un épiderme stratifié, et la restauration d'une zone de membrane de base intacte (BMZ) qui relie l'épiderme et le derme sous-jacent (Jie et al., 2007)

L'intervention des cellules épithéliales au cours de la cicatrisation des plaies se produit pendant le stade de prolifération. Le départ de l'épithélialisation commence une fois le tissu de granulation remplit le lit de la plaie. Les cellules épithéliales épidermiques proviennent de la marge de la plaie se divisent et migrent le long de la surface du tissu de granulation jusqu'à ce qu'ils forment une couche continue (Garrett et al., 1989). La migration des kératinocytes est produite 24 heures après traumatisme. En effet plusieurs éléments ont été impliqués dans la migration des kératinocytes, y compris la matrice extracellulaire, les intégrines, les métalloprotéinases et les facteurs de croissance sécrétés par les plaquettes, les macrophages et les fibroblastes pourraient également intervenir (Grove, 1982). Les cellules épithéliales migrent tout au long des fibres de collagène du tissu de granulation. Ce phénomène connu sous le nom de « direction de contact ». Ces phénomènes de prolifération et de migration

stoppent dès qu'une cellule migrante rentre en contact avec une autre cellule de même type « inhibition de contact » (Johnston, 1992). Plusieurs paramètres affectant le processus d'épithélialisation, un environnement humide accélère ce processus, ce dernier permet aux cellules épithéliales de migrer davantage. Le progrès de la migration des cellules épithéliales est significativement ralenti en présence des tissus nécrosés, ou d'une croûte qui forme une obstruction mécanique dans le lit de la plaie ce qui empêche les cellules épithéliales de creuser au sein de l'escarre de la région lésée. En outre, l'activité mitotique des cellules épithéliales est sensible aux fluctuations locales telles que la température. En effet, l'épithélialisation est sensiblement ralentie à des températures extrêmes (Lock et al., 1979 ; Myers et al, 1982).

A la fin de cette phase, le tissu de cicatrisation néoformé à partir de tissu conjonctif et de l'épithélium nouvellement formé va subir un remodelage tout au long d'un processus particulier de remaniement, c'est la phase de maturation.

2.4.4. La phase de remodelage et de la maturation

La phase de remodelage a été largement discutée surtout concernant le début de cette phase. Des données plus récentes confirment qu'à partir du moment où la phase proliférative atteint son pic (2-3 semaines après la blessure), le remodelage commence effectivement plus tôt. Il serait raisonnable de considérer le point de départ comme étant la première semaine. Cette phase de remodelage et de maturation peut durer un an ou plus (Gurtner et al., 2008). Le processus de remodelage (figure 7) caractérisé par une diminution de la composante cellulaire (apoptose) au site de la plaie, un arrêt de l'angiogenèse et l'accumulation de tissu cicatriciel avec accumulation dense et désorganisée de collagène fibreux (McCallion et Ferguson, 1996). Les signaux de ce remodelage sont encore largement inconnus et discutés. Néanmoins, l'étude des cicatrices excessives révèle que l'activité bloquante du facteur transformant- β (TGF β) suggère qu'elle peut jouer un rôle en arrêtant la formation de cicatrice en favorisant l'apoptose cellulaire. Le développement normal et la maturation de la cicatrice exige un certain équilibre établi entre collagénolyse et collagénogenèse. En effet la dégradation du collagène résulte de l'action des enzymes spécifiques de la collagénase produite par des fibroblastes, des neutrophiles et des macrophages qui fixent la molécule et la décomposent en morceaux caractéristiques de trois à quatre fragments. Ces fragments de collagène subissent une nouvelle dénaturation et une digestion par d'autres protéases. Cet équilibre permet d'organiser le tissu qui lui confère à la plaie une structure semblable à celle observée dans les tissus non

endommagés (remplacement du collagène de type I par du collagène de type III). Malgré cela, Les plaies n'atteignent jamais le même niveau de résistance tissulaire initiale (Young et McNaught, 2001). Ce tissu cicatriciel nouvellement formé présente des variations biomécaniques surtout celles de la résistance à la traction. D'après Francis et al., (2014), cette résistance est de 15% à la 03^{ème} semaine après la blessure, elle est 60% vers la 06^{ème} semaine et de 80% au 06^{ème} mois. Comme la cicatrice mûrit, le niveau de vascularité diminue et la cicatrice passe avec le temps du rouge au rose au gris. Concernant la nouvelle peau de cicatrisation elle révèle une déficience ou une absence totale des follicules pileux, et des glandes sébacées, avec une mauvaise mobilité, élasticité et absence de pigmentation.

En résumé, le processus de cicatrisation normale commence par un processus d'hémostase et de dépôt de fibrine, résultant d'une cascade ordonnée d'évènements inflammatoires et tissulaires (Diegelmann et Evans , 2004). Ceci est suivi par l'attraction et la prolifération des fibroblastes et le dépôt de collagène, et enfin le remodelage par réticulation du collagène et la maturation des cicatrices. (Figure 8). Malgré cette séquence ordonnée d'évènements responsables de la guérison normale des plaies, des réponses pathologiques conduisant à une fibrose ou à des ulcères chroniques peuvent se produire si une partie de la séquence de cicatrisation est modifiée.

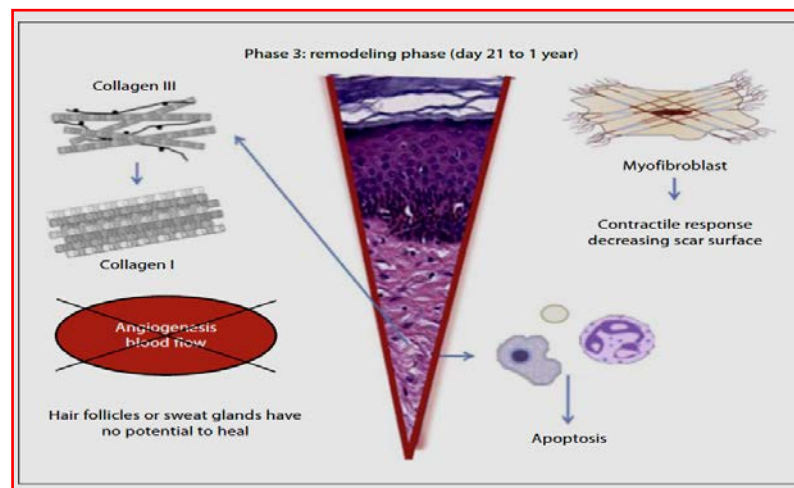


Figure 8: la phase de remodelage (Reinke et Sorg ,2012)

3. Classification de la cicatrisation des plaies cutanées

3.1. Cicatrisation par première intention

Il s'agit du mode de cicatrisation le plus rapide, il est obtenu le plus souvent après suture chirurgicales de la plaie (Misirlioglu et al., 2003), ou fait suite à des lésions accidentelles (les

coupures franches). Une telle guérison est typique dans les cas où les bords de la plaie sont rapprochés de manière adéquate. Ces plaies guérissent spontanément et entraînent une cicatrisation orientée le long des lignes de fibres de collagène à l'intérieur du derme (Atiyeh et al., 2002). La cicatrisation par première intention de la plaie nécessite plusieurs conditions (Johnson et al., 2005) :

- Affrontement bord à bord des lèvres de la plaie.
- Absence de toute sorte de corps étrangers et de tissus devitalisés.
- Absence d'hémorragie et la plaie doit être aseptique.

La guérison ou cicatrisation par première intention est caractérisée par :

- La phase inflammatoire qui est très brève (Johnson et al., 2005 ; Misirlioglu et al., 2003) caractérisée par un exsudat séro-hémorragique riche en fibrine, tout en assurant un collage des deux lèvres de la plaie.
- L'épithélialisation est assurée en 48 h suivant l'incision, et décollement de la croûte après 5-6 jours après.
- La cicatrisation a l'aspect d'un liseré rouge, légèrement en relief.
- La résistance de la plaie commence vers le 5^{ème} -6^{ème} jour après incision, puis atteint les 80% en 10-12 jours pour devenir maximale en 14-20 jours seulement (Johnson, 1992).

3.2. Cicatrisation de deuxième intention

Il existe plusieurs formes qui se guérissent en fonction de l'aspect initial de la lésion (figure 9) avec perte de substances, c'est le cas où les plaies sont importantes et couplées à une perte de tissu étendue suite à un traumatisme massif tel que des brûlures de troisième degré. L'ensemble des ces lésions cicatrisent lentement avec un processus prolifératif associé à une contraction de la plaie suite à un mouvement centripète du revêtement cutané autour de la plaie sans formation de nouvelle peau (Milne, 1979 ; Berthe, 1983 ; Andersson, 1996). Les phases de cicatrisation par deuxième intention sont généralement plus prononcées que la guérison par intention primaire et entraînent habituellement une formation accrue de cicatrice avec un tissu fibreux recouvert de peau fine et glabre. La peau ne retrouvera ses caractéristiques mécaniques proches des tissus normaux qu'après plusieurs mois de maturation.

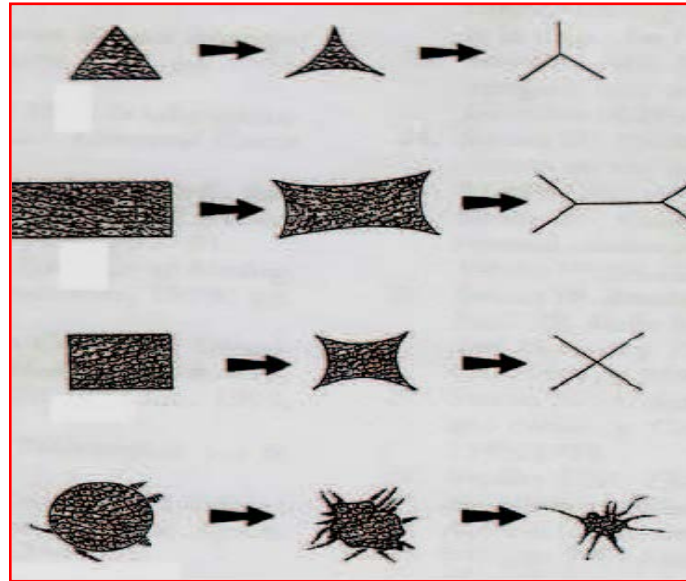


Figure 9: Evolution macroscopique de la cicatrisation par deuxième intention des différentes formes de plaies.

3.3. La cicatrisation par troisième intention

Une telle cicatrisation est typique dans les cas où il y a une fermeture primaire retardée (figure 10). Cela se produit dans les cas où les plaies sont infectées ou contiennent des débris étrangers et ne peuvent pas être fermées jusqu'à ce que les complications soient résolues. La guérison par l'intention tertiaire est également aidée par la reconstruction chirurgicale du greffon cutané dans les grandes plaies ouvertes de la peau. L'échec de guérir dans un mois, dans ces cas, peut conduire à un état chronique (Atiyeh et al., 2002).

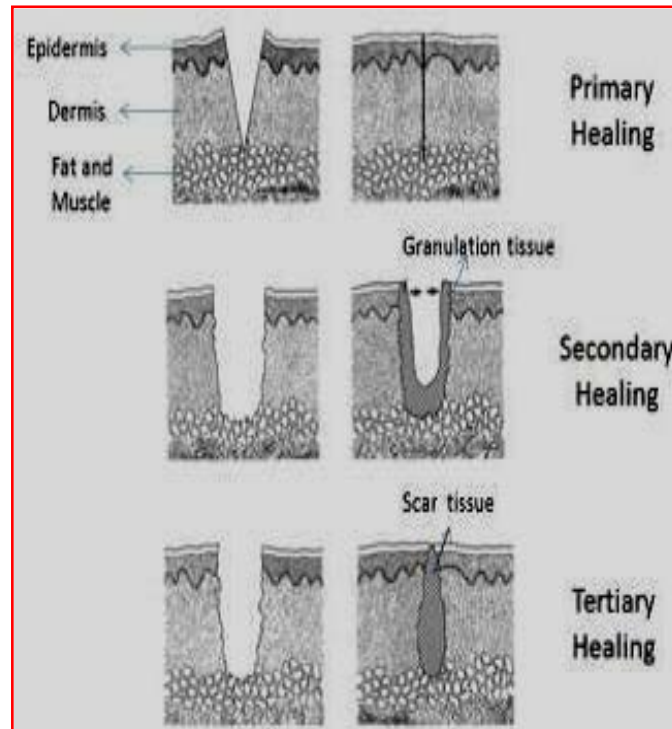


Figure 10: Classification de la guérison des plaies (Schwartz et al., 1999).

4. Les différents facteurs affectant la guérison des plaies

4.1. Les facteurs locaux

4.1.1. L'oxygène

L'oxygène est important pour le métabolisme cellulaire, en particulier au cours de la production de l'énergie par l'intermédiaire de l'ATP. Le processus de cicatrisation nécessite un apport adéquat en oxygène. Ce dernier, semble très important pour la guérison des plaies. En effet, il prévient les plaies des différentes infections (Hunt, 1980), il induit ainsi l'angiogenèse, et augmente la différenciation et la migration des kératinocytes. Il favorise également la prolifération des fibroblastes et la synthèse du collagène car il peut agir comme un substrat dans l'hydroxylation de la proline et de la lysine. En outre, l'oxygène favorise la contraction de la plaie (Bishop, 2008; Rodriguez et al., 2008).

Certains auteurs ont montré que la différenciation des fibroblastes est bloquée à des pressions partielles d'oxygène de 30- 40mmHg. En outre, la synthèse de collagène ne peut avoir lieu que si la $PO_2 > 40\text{mmHg}$ (Hunt et Pai, 1972). Malgré le rôle capitale de l'oxygène au cours du processus de cicatrisation, à son tour l'hypoxie tissulaire au début de ce processus devrait être très essentielle, en stimulant la production des cytokines et des facteurs de croissance (le PDGF, le TGF- β , le VEGF, le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) et l'endothéline-1) à

partir des macrophages, des kératinocytes et des fibroblastes qui sont les principaux promoteurs cruciaux de la prolifération cellulaire (Rodriguez et al., 2008). Dans la pratique chirurgicale chez des personnes âgées et ceux atteints de maladie vasculaire périphérique ont une mauvaise cicatrisation, par conséquent on contraste que l'oxygène améliore la cicatrisation des plaies. Bien que l'hypoxie soit l'un des stimulateurs pour les neutrophiles et les macrophages. L'oxygène est nécessaire pour la phagocytose et pour son fonctionnement optimale. Une étude randomisée a démontré que l'apport d'oxygène pendant la période préopératoire réduit le risque de surinfection des plaies (Rodriguez et al., 2008).

4.1.2. Les infections

Une fois la peau blessée, les micro-organismes qui sont normalement séquestrés à la surface de la peau, pouvant facilement accéder aux tissus sous-jacents. La classification des plaies infectées est basée essentiellement sur l'état de répllication des micro-organismes. Divers aspects infectieux des plaies ont été distingués, infection de contamination, de colonisation, infection locale avec colonisation critique et infection locale avec propagation d'une infection invasive. En effet, la contamination d'une plaie est définie comme la présence de micro organismes incapable de se replier sur une plaie, tandis que la colonisation est définie comme la présence de micro-organismes de répllication sur la plaie sans lésion tissulaire. L'infection locale avec colonisation critique est un stade intermédiaire, là où des microorganismes de répllication atteignent la lésion avec début des réponses tissulaires locales. L'infection invasive est définie comme la présence de micro-organismes au sein d'une plaie avec une blessure subséquente à l'hôte (Edwards et Harding, 2004). Une fois que l'infection est installée, nous pouvons constater que le processus infectieux détériore la cicatrisation sur plusieurs axes :

- L'infection, en absence de décontamination efficace, prolonge la phase inflammatoire de la cicatrisation, tandis que les niveaux bactériens sous-infectieux semblent accélérer la guérison des blessures et la formation du tissu de granulation (Robson et al., 1990 ; Laato et al., 1988).
- La présence de streptocoque bêta-hémolytique, la cicatrisation sera détériorée par à une prolongation de l'inflammation (la clairance microbienne est incomplète), associée à une perturbation de l'épithélialisation (dépôt de collagène) et un raccourcissement de la durée de contraction (Robson, 1997)

- Les endotoxines G- diminuent le degré d'oxygénation des tissus et stimulent la phagocytose et la libération de collagénase.
- les endotoxines peuvent prolongés les cytokines pro-inflammatoires telles que Interleukine-1 (IL-1) et le TNF- α . Cette situation est responsable parfois des plaies chroniques.
- En présence d'une infection apparente, la migration des leucocytes, leur pouvoir phagocytaire est diminué.
- La colonisation excessive bactérienne affecte l'angiogenèse et l'épithélialisation avec un tissu de granulation des plaies plus œdémateux, hémorragique, et plus fragile.
- L'épithélialisation ne se déroule pas en présence d'une importante charge bactérienne parce que les toxines et les métabolites des bactéries inhibent l'épidermisation et même digèrent les protéines tissulaires et polysaccharides dans le derme (Robson, 1990 ; Lawrence , 1987).
- *P. aeruginosa* et Staphylococcus semblent jouer un rôle important dans l'infection bactérienne dans les plaies. Plusieurs ulcères chroniques probablement ne guérissent pas en raison de la présence de biofilms contenant *P. aeruginosa*, protégeant ainsi les bactéries de l'activité phagocytaire des neutrophiles. Ce mécanisme peut expliquer l'échec des antibiotiques comme remède contre les plaies chroniques (Bjarnsholt et al., 2008).

4.2. Les facteurs systémiques

4.2.1. La température environnementale

La guérison des plaies est accélérée aux températures environnementales de 30°C, alors que la résistance à la traction diminue de 20% dans un environnement froid (12°C). Chez les animaux, une température inférieure à 28°C, provoque une hypothermie responsable d'une vasoconstriction et une diminution de la résistance à la traction jusqu'au cinquième jour postopératoire (Broughton et Rohrich, 2005).

4.2.2. L'hydratation.

La guérison d'une plaie bien hydratée est beaucoup plus rapide qu'une plaie sèche, d'où l'utilité de l'usage des pansements et des greffons occlusifs. Certains auteurs suggèrent que la bonne hydratation de la plaie permet de contrôler la prolifération de tissu de granulation et accélère le processus d'épithélialisation (Broughton et Rohrich, 2005).

4.2.3. Le pH de surface

Un milieu acide favorise les événements d'une cicatrisation correcte plus qu'un milieu basique. En outre, les plaies chroniques sont généralement caractérisées par un pH basique. Plusieurs études ont été rapportées dans ce contexte, confirment l'importance du pH lors de la cicatrisation des plaies. Kaufman et al, (1984) ont déclarés qu'un pH acide présentait une cicatrisation des plaies significativement plus rapide que celles ayant cicatrisées en milieu neutre et alcalin. Il est à noter que le pH de la surface agit sur la cicatrisation à plusieurs niveaux, stimule ainsi la destruction du collagène anormale, favorise l'angiogenèse, stimule l'activité des macrophages et des fibroblastes et limite la pullulation microbienne (Lieu et al, 2002 ; Schultz et al, 2003).

4.2.4. L'âge

L'âge est un facteur de risque majeur qui altère énormément le processus cicatriciel des plaies.

L'âge du patient affecte un certain nombre d'éléments clefs dans la guérison des plaies, notamment le taux de la multiplication des cellules et le taux de production de diverses substances par cellules (Broughton et Rohrich, 2005). Des études cliniques animales au niveau cellulaire et moléculaire ont permis de montrer qu'ils existent des changements liés à l'âge. En effet, il est bien établi que l'effet de vieillissement sur la cicatrisation des plaies chez les personnes âgées en bonne santé, est liée à un retard temporel dans la cicatrisation des plaies (Gosain et DiPietro, 2004; Keylock et al.,2008). La cicatrisation retardée chez les personnes âgées est associée à une réponse inflammatoire altérée, telle que l'infiltration retardée par les lymphocytes T dans la zone de la plaie, associée à une altération de la production des chimiokines et une réduction de pouvoir phagocytaire des macrophages (Swift et al., 2001). L'âge peut affecter également la ré-épithélialisation chez des souris âgées par

rapport aux jeunes souris (Swift et al ; 1999). Certains auteurs, proposent que le facteur réel contribuant à retarder la guérison chez les personnes âgées est l'intolérance à l'ischémie lors des processus normaux de cicatrisation des plaies. D'autres études confirment l'importance de ce facteur qui entraîne une diminution de la sécrétion des facteurs de croissance, avec diminution du pouvoir contractile des myofibroblastes associée à une angiogenèse retardée (Gosain et DiPietro, 2004).

4.2.5. Hormones sexuelles chez les sujets âgés

En outre à l'âge de l'individu, les hormones sexuelles semblent jouer un rôle important dans le phénomène de la cicatrisation des plaies. Les déficits de la cicatrisation sont remarquables chez les hommes âgés en bonne santé par rapport aux femmes âgées en bonne santé. Les œstrogènes affectent la guérison des plaies en régulant une variété de gènes associés à la régénération et la stimulation de la fonction épidermique (Hardman et Ashcroft, 2008). Des études cliniques indiquent que les œstrogènes peuvent améliorer la déficience de la guérison liée à l'âge chez les deux sexes, tandis que les androgènes régulent négativement la cicatrisation cutanée (Gilliver et al., 2007).

4.2.6. La nutrition

Chez le rat, la malnutrition se manifeste par une diminution de la force de résistance à la traction des plaies. Son effet est particulièrement marqué au début de processus de la guérison (Temple et al ; 1975). Chez l'homme, un taux de protéines sériques inférieur à 2g % est associé par une phase inflammatoire prolongée et une fibroplasie altérée (Powanda et al., 1981). Concernant le rôle des hydrates de carbone et les graisses, restent moins connus. Le glucose est essentiel en tant que source de l'énergie pour les leucocytes pendant la phase inflammatoire de la cicatrisation des plaies. Les graisses sont nécessaires pour la synthèse de nouvelles cellules. Cependant l'insuffisance d'acides gras essentiels ne s'accompagne pas d'un effet néfaste sur la guérison des plaies (Pollack, 1979).

4.2.7. Vitamines, micronutriments et éléments traces

Les vitamines C, A et E montrent des effets antioxydants et anti-inflammatoires puissants. Cependant leurs déficiences nuisent considérablement le processus cicatriciel.

- La vitamine C a de nombreux rôles au cours de la cicatrisation des plaies, une déficience en vitamine C peut entraîner une détérioration du processus de la guérison des plaies, ceci est probablement lié à une diminution de la synthèse du collagène et de la prolifération des fibroblastes avec une angiogenèse défectueuse. En outre, la carence en vitamine C peut affecter la réponse immunitaire ce qui augmente la susceptibilité d'avoir des infections (Arnold et Barbul, 2006; Campos et al., 2008). Cependant, chez tous les animaux domestiques à l'exception du cobaye, l'apport exogène de vitamine C n'est pas nécessaire (Hosgood, 2003).
- La carence en vitamine A conduit à un dysfonctionnement du processus habituel de la cicatrisation des plaies. Son déficit s'accompagne par un retard de la prolifération des fibroblastes et un défaut de la synthèse du collagène et des hyaluronates .
- La vitamine E, maintient et stabilise l'intégrité des cellules en protégeant la membrane contre la destruction par oxydation. Des expériences animales ont montré que les suppléments par la vitamine E est bénéfique pour la guérison des plaies (Arnold et Barbul, 2006).
- Plusieurs micronutriments ont été jugés importants pour une réparation optimale. Le magnésium fonctionne comme un cofacteur pour de nombreuses enzymes impliquées dans la synthèse du collagène tandis que le cuivre est un co-facteur requis pour la cytochrome oxydase, pour la superoxyde dismutase cytosolique antioxydante, et pour la réticulation optimale du collagène. Le zinc est un cofacteur pour les ARN et ADN polymérase, et une déficience en zinc provoque une altération significative de la cicatrisation des plaies. Le fer est important pour l'hydroxylation de la proline et de la lysine et, par conséquent, une grave carence en fer peut entraîner une diminution de la production de collagène (Shepherd, 2003; Arnold et Barbul, 2006; Campos et al., 2008).

En résumé, les protéines, les hydrates de carbone, l'arginine, la glutamine, les acides gras polyinsaturés, les vitamines A, C et E, le magnésium, le cuivre, le zinc et le fer jouent un rôle important dans la cicatrisation des plaies, et leurs déficiences affectent tous les événements du processus cicatriciel.

4.2.8. Le diabète

Le diabète sucré affecte la guérison des tissus par voie métabolique, vasculaire et neuropathique. En effet, l'ischémie correspond à une complication majeure du diabète, elle rend le patient vulnérable aux infections (Morain et Colen, 1990). A cet effet, plusieurs fonctions cellulaires seront déprimées et qui sont impliquées dans le processus de détérioration de la cicatrisation des plaies chez les diabétiques. Parmi ces fonctions déprimées, l'immunité défectueuse des cellules T, les défauts de chimiotactisme des leucocytes, la réduction du pouvoir phagocytaire, et les dysfonctionnements des fibroblastes et des cellules épidermiques (Loots et al., 1998; Sibbald et Woo, 2008). En outre, le diabète est souvent accompagné d'une hypoxie qui contribue à compromettre la guérison en induisant une insuffisance d'angiogenèse. Plusieurs études ont étudiées les mécanismes derrière cette réduction de la restauration de processus cicatriciel tel que la diminution de la production du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (Brem et Tomic-Canic, 2007).

Chapitre III : Les plaquettes : fonctions, méthodes de préparation et applications médicales.

I. Anatomie et fonctions des thrombocytes

La plaquette sanguine fut décrite par Done (1842), Zimmerman (1860), Schultz (1865), Osler (1874) et Hayem (1878), mais c'est Bizzozero (1882) qui, le premier, reconnut la véritable signification de ce petit corpuscule : c'est l'élément figuré essentiel de l'hémostase (Kayser, 1970).

Les plaquettes sont des cellules anucléées, de forme biconcave arrondie ou ovale, d'un diamètre variant de 1 à 4 μm . Dans le sang circulant, le nombre moyen des thrombocytes varie de $150 \text{ à } 400 \times 10^9 / \text{L}$ chez l'homme et de $500 \text{ à } 800 \times 10^9 / \text{L}$ chez les ovins (Feldman, et al., 2000). Les plaquettes ayant un temps de demi-vie moyen de sept jours chez la plus part des mammifères domestiques.

Les plaquettes sont formées dans la moelle osseuse par pincement du cytoplasme de cellules précurseur appelées mégacaryocytes. Par la suite, les thrombocytes nouvellement formées gagnent d'abords les sinusoides de moelle osseuse avant d'être extrudées dans la circulation sanguine (Everts et al., 2006).

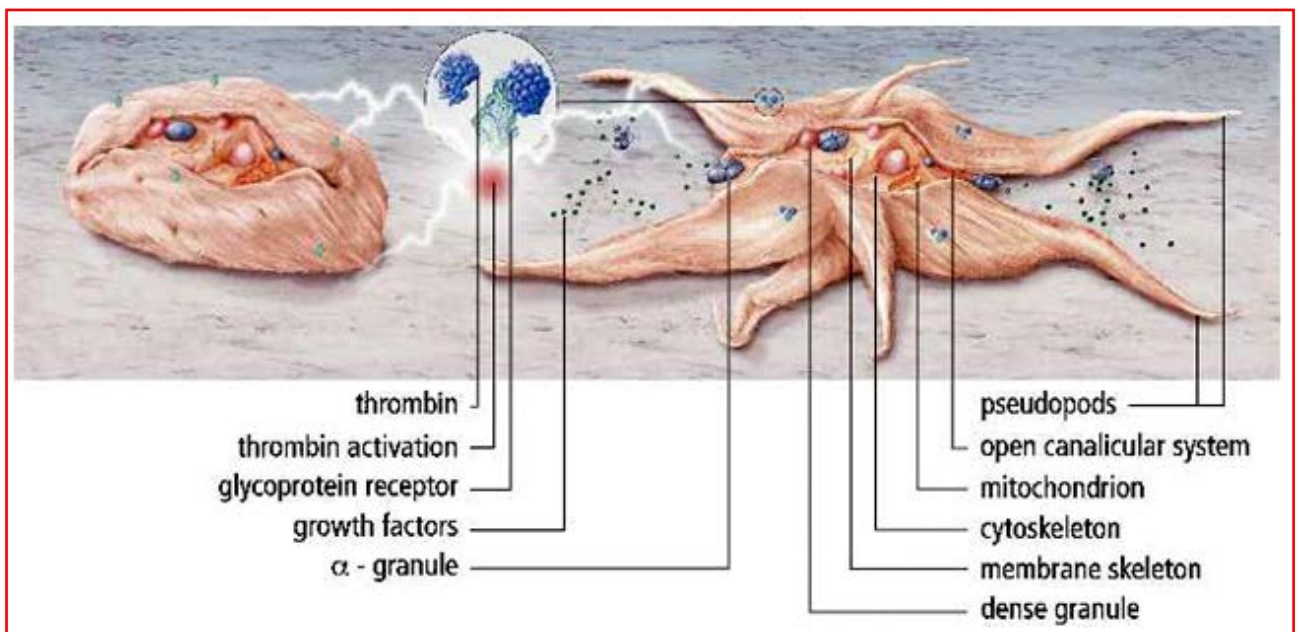


Figure 11 : Représentation schématique d'ensemble du thrombocyte (Everts et al.,2006)

1. Structure des plaquettes

Les thrombocytes sont limités par une membrane semblable à celles des autres cellules. Ce sont des disques biconvexes, ovoïdes minces. Quand elles sont observées en coupe, elles sont fusiformes. Dans les frottis sanguins colorés, elles présentent deux zones concentriques :

une zone périphérique mince, pale, appelée le hayalomère très riche en actine et en myosine, et une région centrale plus grande et colorée plus intensément : le granulomère. Ce dernier contient de petites granulations azurophiles et des particules de glycogène et des canalicules minces qui s'ouvrent à la surface des thrombocytes qui peuvent servir de passage aux produits de sécrétion en cas d'activation (Fawcett, 2002). L'ultrastructure observée à l'aide de microscopie électronique révèle des composants structuraux qui maintiennent leur forme discoïde aplatie. On distingue de l'extérieur vers l'intérieur: la membrane plasmique, le cytosquelette et les différents organites intracellulaires (blanche, 1992 ; George, 2000).

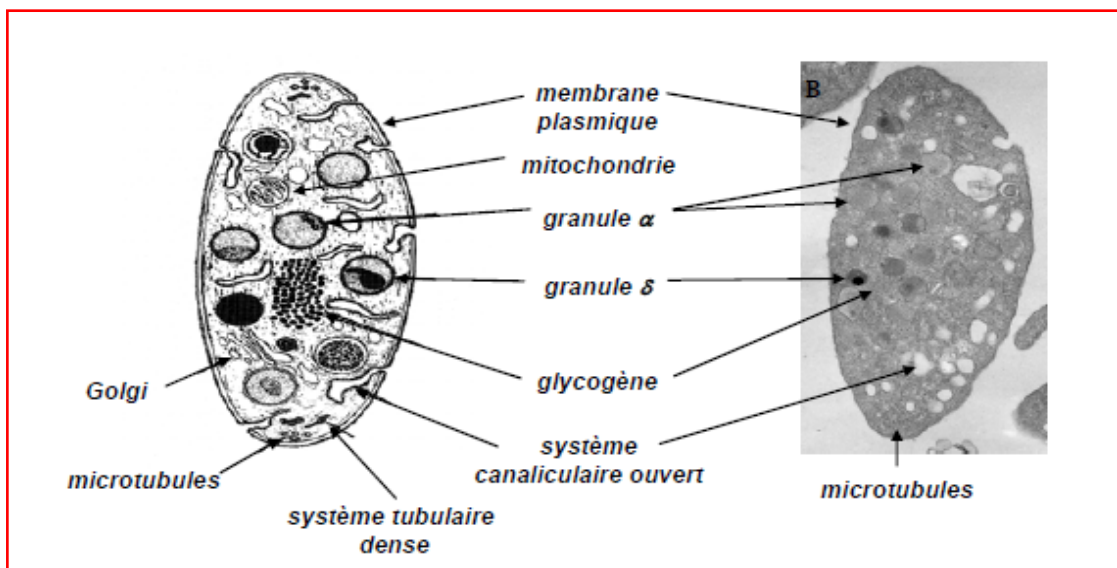


Figure 12: Morphologie et ultrastructure des plaquettes (Everts et al., 2006).

1.1. La membrane

La membrane plasmique des plaquettes est semblable aux autres cellules. Elle comporte trois feuillets superposés et elle est constituée de protéines de phospholipides et de cholestérol. La proportion de chacun de ces constituants est différente de celles de la membrane érythrocytaire. La surface externe est recouverte d'une couche caractéristique appelée espace périplaquettaire occupée par des polysaccharides et de l'acide sialique capable de piéger des facteurs de coagulation (fibrinogène et plusieurs enzymes). Asymétriquement des phospholipides agencés (par exemple, phosphatidylsérine et phosphatidylinositol) présents dans la couche interne de la membrane plasmique maintiennent la stabilité de sa surface à l'état non pro-coagulant. Pendant l'activation de la surface plaquettaire expose progressivement les aminophospholipides à une floppase ATP-dépendante et une scrabblase pour initier la cascade de coagulation (Heemskerk et al., 2002). En outre, la face

interne, est constituée de microfilaments semblables aux filaments de l'hayalomère capables de former des pseudopodes (Lord-Dubé et l'Italien, 1983). La membrane plaquettaire, est le site d'expression de divers récepteurs de surface et radicaux lipidiques nécessaires à la signalisation et aux trafics intracellulaire. Parmi ces marqueurs le CD36, CD63, CD9, GPCR, IIbIIIa et GLUT-3. Ces récepteurs de surface déclenchent également la libération de granules α qui jouent un rôle dans des fonctions multiples, à savoir, la coagulation, l'inflammation, l'athérosclérose, l'immunité, l'angiogenèse, la réparation des plaies et dans les processus tumoraux (Blair et Laumenhaft, 2009).

1.2. Les microtubules

Les microtubules se repartissent en faisceaux de 3 à 10 éléments, à la périphérie de la cellule. Ce sont des structures rigides, circonférentielles, périphériques, formées de microfilaments. Ils sont responsables de la forme discoïde de la plaquette au repos. Après activation plaquettaire ils se dépolymérisent, ce qui entraîne un changement de forme des plaquettes (Lord-Dubé et l'Italien, 1983)..

1.3. Les microfilaments

Ils sont formés d'actine et de myosine qui se polymérisent en présence de calcium. Ils constituent la structure de base des microtubules. Dans la plaquette au repos, ils sont peu nombreux, situés en particulier sous la membrane et associés aux glycoprotéines GPIB-IX, GPIa et GPIIa (Lord-Dubé et l'Italien, 1983).

1.4. Les canalicules

On distingue deux types de systèmes de canalicules "tunnels", le système canaliculaire ouvert (OCS) résulte de l'invagination interne de la membrane. Ce système permet l'endocytose de substances plasmatiques. Il permet aussi la libération du contenu des granules et représente une source de membranes utilisables lors de changement de forme des plaquettes tel que la formation de pseudopodes lors de l'activation plaquettaire (Michelson, 1992).

Le système tubulaire dense, provient de l'ergastoplasme résiduel. D'après White et al., (1972) ; Brass et al., (1993), l'ensemble de ces canalicules denses semble jouer un rôle dans la séquestration du calcium à l'aide d'une cascade de réactions impliquant l'activation du

récepteur couplé aux protéines G PAR-1. Ce système dense pourrait également contenir des enzymes de la voie de synthèse des prostaglandines (Boneu et Cazenave, 1997).

1.5. Les organites

Les mitochondries sont de petites tailles, rondes ou ovales, au nombre de 1 à 5 par plaquette participent dans le processus de production de l'énergie cellulaires. L'appareil de golgi ou ce qui reste de celui-ci est identique à celui des mégacaryocytes. Les ribosomes sont en grand nombre jeunes et de grande taille ; celles-ci sont le siège d'une synthèse protéique intense (Lord-Dubé et l'Italien, 1983)..

1.6. Les granules

Sont certainement des lysosomes (Kayser, 1970). Ils sont nombreux, entre 3 à 5 par plaquette. Les thrombocytes possèdent 3 types de granules (α , β et λ). Les granules α contiennent des facteurs de coagulation comme le fibrinogène, le facteur Von Willebrand, de la fibronectine (protéine adhésive) et des facteurs de croissance (comme la PDGF). Mais également des protéines plasmatiques incorporées tels que l'albumine et des immunoglobulines. D'après Geoffrey et al., (2000) ; Offermanns (2006), les thrombocytes contiennent aussi des mucopolysaccharides, des protéines cationiques, de l'ADP, de l'ATP, du facteur 3 plaquettaire, de la sérotonine et de l'histamine. Les granulations denses (granules β), sont reliées à la membrane et à la surface de la cellule. Elles contiennent du calcium, de l'ADP qui favorise l'agrégation plaquettaire. Ces granules denses contiennent aussi chez certaines espèces (le lapin) de la sérotonine vasoconstrictrice. Les granules denses sont souvent plus grands et plus opaques. Ils contiennent des nucléotides, du calcium, des catécholamines de la sérotonine et le facteur 4 plaquettaire (Lord-Dubé et l'Italien, 1983). Les granules λ ; qui correspondent aux lysosomes et renferment des hydrolases acides pouvant séquestrer la thrombine. En outre des granules, les thrombocytes contiennent aussi des peroxyosomes mais peu nombreux et ont une activité peroxydasique élevée due à une catalase.

2. Fonctions des plaquettes

En résumé la figure ci-après établie par (Ghoshal et Bhattacharyya, 2014) permettant de mieux comprendre les principales fonctions engendrées par les thrombocytes.

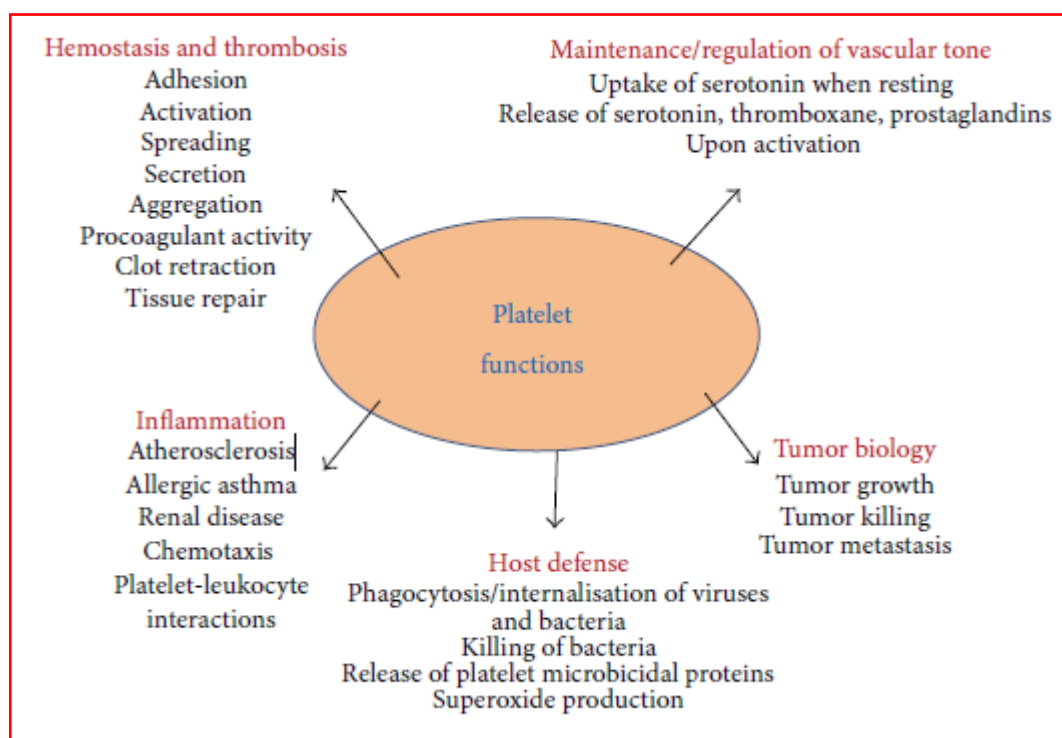


Figure 13: Fonctions des plaquettes (Ghoshal et Bhattacharyya, 2014)

2.1. Plaquettes et hémostasie

Les animaux disposent de plusieurs mécanismes visant à empêcher la perte accidentelle du sang. Ces mécanismes sont groupés sous le nom de l'hémostasie. Cette dernière comporte trois étapes successives :

2.1.1. Temps pariétal

Correspond à la durée durant laquelle un phénomène reflexe entraînant un ralentissement ou un arrêt momentané de la circulation d'un ou des vaisseaux lésés suite à un traumatisme.

2.1.2. Temps endothélio-plaquettaire

Toute lésion, même minime, de l'endothélium vasculaire est suivie d'une accumulation plaquettaire. Il est bien établi, par la majorité des auteurs, que l'adhésivité, l'agréation et la métamorphose visqueuse sont mises en jeu et contribuent à la formation d'un thrombus blanc ou clou hémostatique. En effet, l'adhésivité (figure 14) est la propriété qu'ont les thrombocytes de se fixer à des surfaces étrangères. En cas d'une blessure ou d'un traumatisme d'un vaisseau, les plaquettes s'adhèrent aux fibres de collagène et se gonflent. Le facteur VonWillebrand est indispensable à cette étape (Coujard et al., 1980). C'est à ce moment, qu'on parle de la sécrétion plaquettaire, là où les thrombocytes se comporte comme une

véritable cellule sécrétoire. Ils rejettent dans le milieu extérieur le contenu des granules denses (ADP, nucléotides, catécholamines, hydrolases acides, sérotonines, le facteur 3 et facteur 4 plaquettaire).

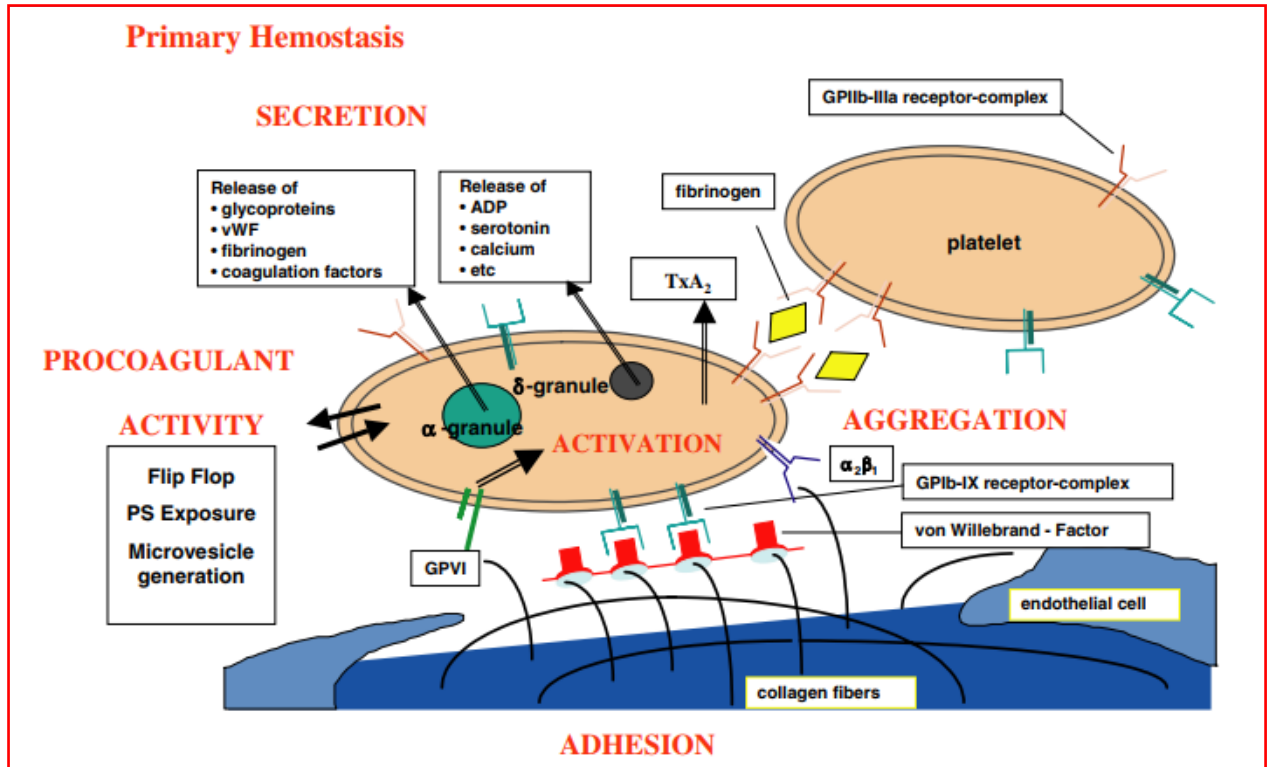


Figure 14 : les différentes étapes de d'adhésion (Harrison, 2005).

L'agrégation plaquettaire, est sous dépendance de l'ADP des voies intrinsèques et extrinsèques. On parle alors de l'activation plaquettaire ou début de la cascade de coagulation (Grazul-Bilska et al., 2003). La coagulation est la conversion du fibrinogène en fibrine qui transforme le sang en un gel autour de l'agrégat de plaquettes. Le caillot ainsi formé représente non seulement une barrière mécanique qui empêche l'écoulement de sang, mais également, il représente une matrice provisoire composée d'un réseau de fibrine, de cellules et de plusieurs protéines de la matrice extra cellulaire comme la fibronectine, la vitronectine et la thrombospondine (Werner et Grose, 2002). La coagulation faisant intervenir plusieurs facteurs dont la plupart d'entre eux ne sont que des facteurs plasmatiques adsorbés par les plaquettes. Cette adsorption est favorisée par une atmosphère d'agrégation des plaquettes (Roskame, 1922).

2.1.3. Le temps plasmatique

Le plasma subit la coagulation, où un réseau insoluble de fibrine va renforcer le thrombus blanc. La formation d'un caillot sera suivi de sa rétraction, puis sa lyse. La coagulation est un phénomène complexe mettant en œuvre une douzaine de facteurs plasmatiques (Kayser, 1970).

2.2. Plaquettes et inflammation

Les plaquettes jouent un rôle capital lors de l'inflammation soient directement lors de l'hémostase primaire ou secondairement par l'ensemble des facteurs de croissances qu'elles contiennent (voir chapitre II).

2.3. Plaquettes et biologie des tumeurs

Les plaquettes jouent un rôle polyvalent dans la progression du cancer (Ghoshal et Bhattacharyya, 2014). L'environnement pro coagulant fourni par les plaquettes peut assurer la coagulation des cellules cancéreuses, les protéger du système immunitaire, ce qui incite la formation de tumeurs (Belloc et al., 1995). Les plaquettes facilitent la migration et l'invasivité de la cellule tumorale, provoquant des métastases. Il a été signalé dans le cancer du sein et de l'ovaire que les plaquettes augmentent le pouvoir envahissant des cellules cancéreuses qui peuvent induire la poursuite de la progression de la maladie (Bambace et al., 2011). En outre, les cellules tumorales ont également la capacité d'agrèger les plaquettes (Jain et al., 2010) et d'augmenter également la chance d'induire des métastases. Récemment, les chercheurs ont montré que l'activation de la thrombine contribue énormément à la progression de la tumorigenèse et l'angiogenèse (Ruf and Mueller, 2006).

2.4. Plaquettes et fonction de stockage

Les plaquettes absorbent et transportent des substances telles que la sérotonine, l'adrénaline, et l'histamine chez le lapin. Les plaquettes fixent la sérotonine par un mécanisme actif faisant intervenir l'ATP. La libération de cette dernière est sous effet de la thrombine (Kayser, 1970).

2.5. Plaquettes et fonctions de défense

Les plaquettes sont douées d'une sorte de phagocytose s'exerçant vis-à-vis des virus et particules de thorotrast (Haguenau et coll, 1963). Le virus est probablement incorporé par un

processus de type pinocytaire (Kayser, 1970). Comme les hématies, les plaquettes sont capables d'adsorber sur leur surface des mixovirus. Les plaquettes pouvant également former une sorte d'enveloppe autour des microbes.

II. Plasma riche en plaquettes: Historiques, méthodes de préparation et utilisations thérapeutiques

1. Historique

Le concept et la description du PRP ont été commencés sur un terrain d'hématologie. Les hématologues ont créé le terme PRP pour la première fois afin de décrire un plasma contenant un taux plaquettaire supérieur à celui du sang périphérique. Initialement et au cours des années 1970, le PRP a été utilisé comme un produit de transfusion pour traiter des patients souffrant de la thrombocytopénie (Alves et al, 2018).

Dix ans plus tard, des résultats encourageants ont été publiés par un certain nombre de chercheurs, et plusieurs champs d'application, ont été envisagés par des équipes de recherches telles que la chirurgie cardiaque, la chirurgie dentaire, la chirurgie pédiatrique, gynécologie, urologie, chirurgie plastique et ophtalmologie. (Alves et al, 2018)

Par la suite, le PRP a été utilisé principalement dans le champ musculo-squelettique comme le traitement des blessures sportives. Avec son utilisation chez les sportifs professionnels, il a attiré l'attention dans les médias. Plus récemment, au cours des années 1990, son intérêt augmente considérablement, avec le progrès remarquable de la médecine régénérative. En effet, des investigations lourdes ont été effectuées par de nombreux chercheurs car le PRP a été sollicité d'une manière remarquable, surtout par les patients souffrant des maladies réfractaires et rebelles au traitement classiques.

Actuellement, le domaine de dermatologie, est préoccupé par des recherches sur les effets du PRP, surtout ceux de la régénération tissulaire, la cicatrisation des plaies et les effets de rajeunissants de la peau (Sclafani et McCormick, 2012) et l'alopécie (Li et al., 2012).

2. Définition du plasma riche en plaquettes

Le plasma riche en plaquettes est défini d'après Marx (2001) ; Borriero et al.,(2010) et Kaux et al., (2011), comme une petite fraction de plasma contenant des concentrations plus élevées de plaquettes en comparaison avec le sang total, et par conséquent une concentration

accrue en facteur de croissance. Marx et al., (1998) ont rapportés pour qu'un PRP possède des propriétés de stimulation doit contenir 1 000 000 plaquettes/ μ l dans un volume de 5 ml de plasma, à partir d'un volume sanguin initial de 54 ml. D'après Xie et al., (2014), le PRP est obtenu traditionnellement par un processus de centrifugation de sang total autologue. Il s'agit en effet d'après Marx (2001) d'un volume restreint de plasma très concentré en thrombocytes avec un nombre moyen en plaquettes 4 fois plus élevé par rapport au sang total.

3. Les différentes techniques de préparation du PRP

Classiquement le PRP autologue est obtenu par un processus de centrifugation de sang total à l'aide d'une simple centrifugeuse de laboratoire. Actuellement, d'autres méthodes modernisées seront envisagées, faisant appel à des techniques lourdes d'hématologie beaucoup plus perfectionnées permettant de préparer le PRP avec séparation stricte des plaquettes. Les différents protocoles et méthodes d'obtention du PRP, ainsi que les principaux domaines d'application sont comme suit :

3.1.Méthodes classiques

Toutes les méthodes conventionnelles décrites dans la littérature, sont basées exclusivement sur la centrifugation du sang total prélevé, mais largement controversées dont la principale divergence est l'absence d'un consensus officiel concernant les étapes et les modalités de préparation du PRP (Anitua et al., 1999; Aghaloo et al., 2002). Dans ce contexte, notre aperçu général des différentes publications de la littérature, nous laisse penser que les paramètres suivants semblent affecter considérablement soit la quantité ou la qualité du PRP.

- Le site de prélèvement
- La nature de l'anticoagulant utilisé
- La quantité de sang total initial
- Le régime de centrifugation (vitesse et durée)
- Le nombre total des globules blancs.

3.1.1. Le prélèvement

Chez l'homme, dans le cadre d'une préparation clinique, le sang est prélevé à partir de la veine cubitale médiane ou de la veine basilique (Everts et al., 2006). Chez les animaux, la

veine jugulaire représente un site de prédilection où le diamètre important de la veine, facilite l'écoulement du sang et préserve l'intégralité structurale des plaquettes.

3.1.2. La nature de l'anticoagulant utilisé

A propos des anticoagulants utilisés lors de préparation du PRP, la majorité des scientifiques préfèrent des solutions citratés tels que le citrate de sodium et l'acide citrate dextrose (Mart et al., 1999). L'utilisation d'éthylène diamine tetraacetic acid (EDTA) est à éviter car cet anticoagulant fragmente les plaquettes (Landesberg et al., 2000). Actuellement le dextrose a été largement utilisé en médecine humaine et animale. En général, d'après Everts et al., (2006) un ratio de 1 ml de citrate-dextrose-adenosine-acide (ACD) à 7-8 ml de sang total devrait être maintenu pour que les thrombocytes conservent leur intégralité structurale ainsi que le PRP obtenu, présente des propriétés de stimulation.

3.1.3. La quantité de sang total recueillie

Dans ce contexte, plusieurs recherches ont été publiées, mais également largement controversés. Ce qui est commun entre les chercheurs, la quantité tolérable du sang total prélevé, ne dépasse pas la limite optimale de routine lors d'un prélèvement sanguin (de quelques ml jusqu'au 50 ml).

3.1.4. Régime de centrifugation

Fondamentalement, la préparation du PRP nécessite un processus de centrifugation du sang total. Ce processus doit être stérile et précisément adapté à la séparation des plaquettes et des globules rouges et leur séquestration dans des concentrations élevées. Ce processus doit être achevé sans abimer ou provoquer une lyse préalable des thrombocytes pourrait déclencher ainsi la libération prématurée des facteurs de croissance (Nagata et al, 2010). Plusieurs protocoles simplifiés de préparation du PRP par usage d'une centrifugation unique ont été développés pour faciliter leurs applications cliniques (Anitua, 1999 ; Landesberg et al., 2000). Cependant, le nombre de plaquettes du PRP obtenu au moyen de ce protocole unique de centrifugation semble être faible. Malgré cela, Anitua, (1999) a démontré une amélioration et accélération de la régénération osseuse et une cicatrisation des tissus mous plus rapide et

prévisible dans les futurs sites pour les implants qui ont été traités avec PRP préparé par une simple centrifugation. Marx et al., (1998) ont déclaré qu'une double centrifugation est incontournable pour concentrer vraiment les plaquettes du sang autologue.

La figure ci-dessous établie par Perez et al., (2014) facilite la compréhension des étapes de préparation du PRP obtenu par un régime de double centrifugation.

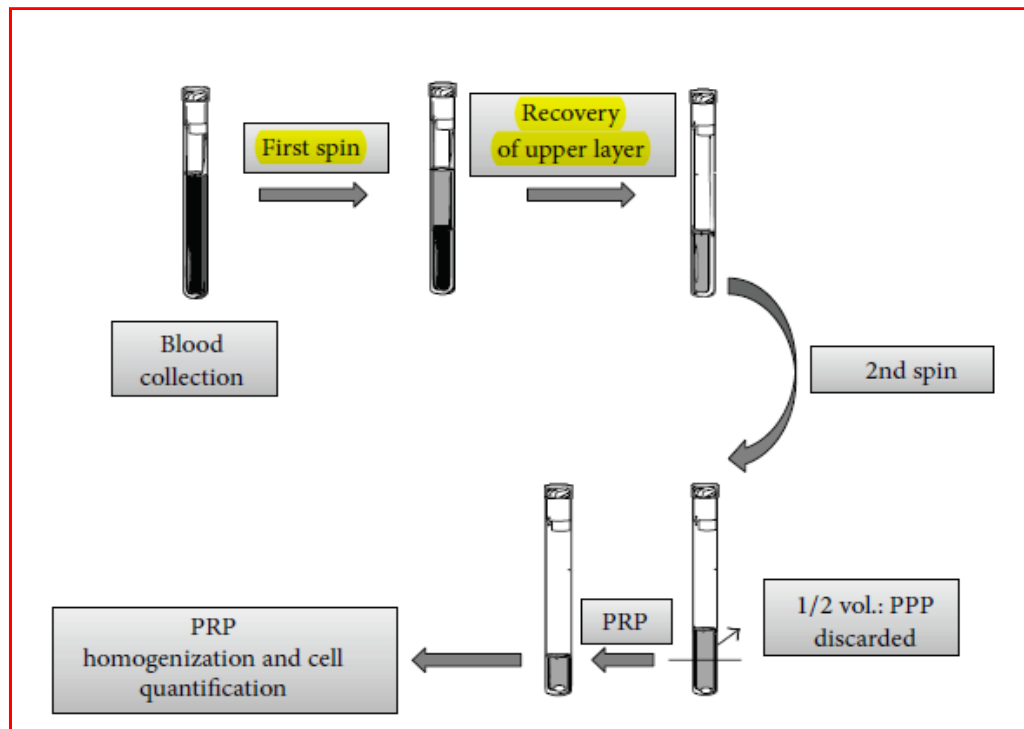


Figure 15: Organigramme décrivant le concept technologique de production de PRP (Perez et al., 2014)

D'abord, avant toutes manœuvres, le sang total initialement recueilli doit être dans des tubes qui contiennent des anticoagulants.

3.1.4.1. La première centrifugation

Permet la séparation du sang en trois fractions distinctes :

- Une couche supérieure (55%) contient principalement du plasma acellulaire, principalement constitué de molécules plasmatiques circulantes (en particulier le fibrinogène) et pauvre en plaquettes, dénommé platelet-poor plasma (PPP) ou plasma pauvre en plaquettes.

- une couche intermédiaire (5%) qui est connue comme la couche leucocytaire et qui est riche en fibrinogène et en plaquettes. Son aspect blanchâtre caractéristique l'a fait appeler manteau blanchâtre (buffycoat) ; c'est elle qui composera la majeure partie du futur concentré plasma riche en plaquettes (cPRP) mais à ce stade, elle est encore difficilement séparable de façon scientifique des autres fractions (Dohan et al., 2005),
- une couche inférieure qui se compose principalement de globules rouges.

Seule la couche supérieure et la couche leucocytaire sont transférées dans un autre tube vide et vont subir à nouveau la deuxième centrifugation.

3.1.4.2. La deuxième centrifugation

Au cours de ce stade, le régime de centrifugation préconisé est beaucoup plus long et plus rapide que celui de la première centrifugation précédente (hard spin). Il permet de faire sédimenter les plaquettes au fond du tube, de manière à obtenir à nouveau trois fractions distinctes :

- Une fraction résiduelle sous forme d'un petit point rouge en bas de tube.
- Une fraction plasmatique claire acellulaire (80%) en haut de tube qui correspond au plasma pauvre en plaquettes.
- Une fraction intermédiaire, très riche en plaquettes, qui correspond au PRP.

À ce stade, et à l'aide d'une seringue on peut facilement recueillir le PRP. On se débarrasse d'abord de la majeure partie du PPP, de manière à n'en laisser que le strict nécessaire à la remise en suspension des plaquettes concentrées. Puis l'ensemble est agité et pour obtenir un PRP en suspension prêt à l'emploi. Il est à noter, que la coloration rose du PRP final, résulte des hématies résiduelles en suspension lors de l'aspiration des plaquettes (Dohan et al., 2005). A ce moment, le PRP obtenu est prêt à être utilisé soit directement où son activation est assurée par le contact direct avec le collagène, ou activé directement par un ajout des substances d'activation tel que la thrombine bovine et du chlorure de calcium.

3.1.5. Nombre des globules blancs

A son tour, ce paramètre est largement discuté lors de la préparation du PRP. En effet, plusieurs études ont été publiées dans ce contexte, il y a actuellement un désaccord dans la littérature sur la présence des cellules de la lignée blanches dans le PRP. Evertset al., (2007) ;Ehrenfest et al.,(2009) ;tXie et al(2014), ces auteurs ont rapportés que la présence des globules blancs (L-PRP) offre un avantage et fournit une protection naturelle contre les infections et les réponses allergiques. D'autres auteurs ne recommandent pas la présence des globules blancs dans le PRP. Marx et al., (2002) et Perez et al., (2014), ont déclaré que la présence des globules blancs, pouvant être nocifs lors de cicatrisation des tissusabimés, et qu'il peut gêner l'épithélialisation par une libration prématurée de facteurs pro-inflammatoires potentiellement responsable d'une dégradation de la matrice extracellulaire.

3.2.Méthodes récentes et kits commerciaux

3.2.1. Plasmaphérèse

La plasmaphérèse est une méthode de purification sanguine extracorporelle permettant defractionner les différents éléments du sang, tout en particulier de concentrer les plaquettes (figure 16)(Pruijm et al., 2008). Deux procédures seront possiblement envisagées, soit à flux discontinu (c'est-à-dire que le patient reste connecté à la machine qui lui filtre le sang jusqu'à obtenir le nombre de plaquettes souhaité) ou à partir d'une poche de 500 ml de sang prélevé sous anticoagulant, dont le concept reste le même (Dohan et al., 2005).

Le principe de cette technique modernisée nécessite une ultracentrifugeuse différentielle qui sépare dans un premier temps le PPP des autres éléments figurés du sang et le transférer vers soit une poche qui peut être réinfusée plus tard, soit directement vers le patient. Puis, un lecteur optique constate que la centrifugation commence à séparer un sérum beaucoup plus blanchâtre (le buffycoat) correspondant à un concentré plaquettaire (PRP), et fait basculer automatiquement le liquide décanté vers une poche différente, tout en ralentissant la vitesse de centrifugation (pour permettre un clivage précis entre cPRP et culot d'hématies).

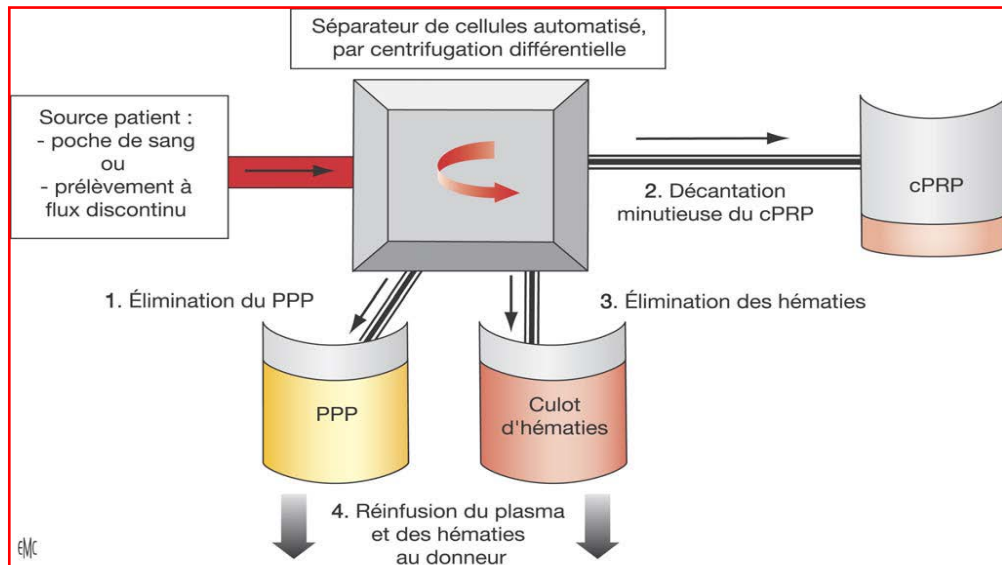


Figure 16: La plasmaphérèse (Dohan et al., 2005)..

Enfin, dès que le lecteur optique détecte les premiers éléments rouges, il sait qu'il s'agit du culot d'hématies et le transfère soit vers une troisième poche qui peut être réinfusée plus tard, soit directement vers le patient (si celui-ci est encore connecté à la machine).

Cette méthode permet d'obtenir 30 à 40 ml de PRP à partir de 450 ml de sang total. À flux discontinu, on peut même récolter jusqu'à 300 ml de PRP (Dohan et al., 2005).

À noter que l'on retrouve toujours une petite quantité d'hématies dans notre poche de concentré plaquettaire, liée aux difficultés techniques d'une séparation parfaite des différentes strates de sédimentation obtenue par centrifugation. C'est ce qui explique que, une fois remis en suspension (dans du PPP résiduel, par exemple), le concentré plaquettaire prenne un aspect rosé (Dohan et al., 2005).

3.2.2. Protocoles Curasan® et Friadent-Schütze®

Ces deux protocoles obéissent à la loi fondamentale de préparation du PRP, c'est-à-dire que sa préparation nécessite toujours la centrifugation, réalisée par une simple centrifugeuse de laboratoire. Ces deux méthodes sont sensiblement similaires, nécessitent l'usage d'un kit de tubes de 10 ml de capacité contenant un anticoagulant citraté (CPD-A). La différence entre les deux méthodes réside uniquement d'après certains auteurs (Weibrich et al, 2003) dans le temps et la vitesse de centrifugation. Le processus de préparation du PRP passe par les deux étapes fondamentales de double centrifugation déjà motionnées, avec :

- Une première centrifugation de 10 minutes à 2400 tours /min (soit environ 400g) ;
- Une deuxième centrifugation de 15 minutes à 3600 tours /min (soit environ 600g).
- La quantité totale produite de PRP est de 0.4ml pour le protocole (Curasan®), elle est de 0,8ml pour Friadent-Schütze®. Le PRP est placé dans une seringue d'auto mélange couplée à de la thrombine bovine (et chlorure de calcium), pour obtenir un gel utilisable cliniquement.

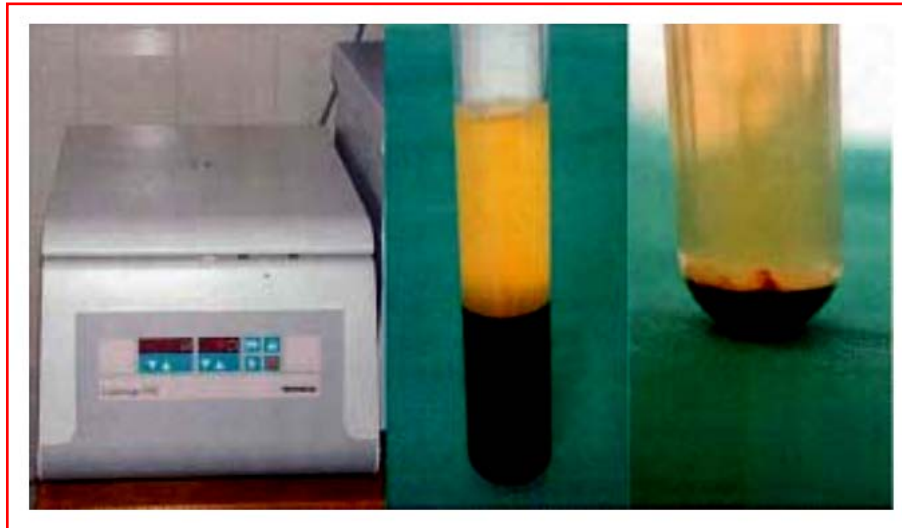


Figure 17: Kit PRP Friadent-Schütze (centrifugeuse, vacutainer après première et deuxième centrifugation) (Weibrich et al.,2003).

3.2.3. Protocole HarvestSmartPRP®

Son fonctionnement repose sur une idée astucieuse : un dispositif constitué d'une double chambre de centrifugation, c'est une technique entièrement automatisée où le processus global de centrifugation de cette machine (figure 18) ne dure que 12 minutes. Le sang total recueilli par la chambre est de 60 ml, centrifugé avec un programme standard de trois vitesses automatiques, permet d'avoir 8 ml de PRP (Dohan et al., 2005).



Figure 18: Système PRP SmartPRP(Weibrich et al.,2003).

3.2.4. Protocole «Platelet concentrate collection system » (PCCS)®

Technique hautement automatisée de production du PRP, où la machine utilisée est dotée de deux poches plastiques solidarisées par un anneau (qui permet leur mise en place dans la centrifugeuse) et reliées par un tubule clampé. Au cours de préparation, la première centrifugation suit un régime de 3000 tours/min pendant 3 minutes et 45secondes, et un second régime à 3000 tours/min durant 13 minutes. Cette technique correspond au premier pas de l'industrie médico-scientifique pour fournir aux professionnels de santé des machines et des protocoles simplifiés parfaitement adaptés aux conditions de l'exercice chirurgical. Cependant, ce protocole demande encore plusieurs interventions humaines délicates, ce qui disparaît avec la SmartPreP® (Dohan et al., 2005).

3.3.Propriétés biologiques du plasma riche en plaquettes

Le plasma riche en plaquettes est également connu sous le nom de plaquettes riche en facteurs de croissance (FG), matrice de fibrine riche en plaquettes (PRF) et PRF concentré de plaquettes (Rubina et Grimalt, 2018). On admet raisonnablement, que ces propriétés

biologiques dépendent étroitement des constituants qu'ils le contiennent. En effet, Xie et al (2014), ont simplifiés toutes ces propriétés, par le schéma suivant de la (figure 19).

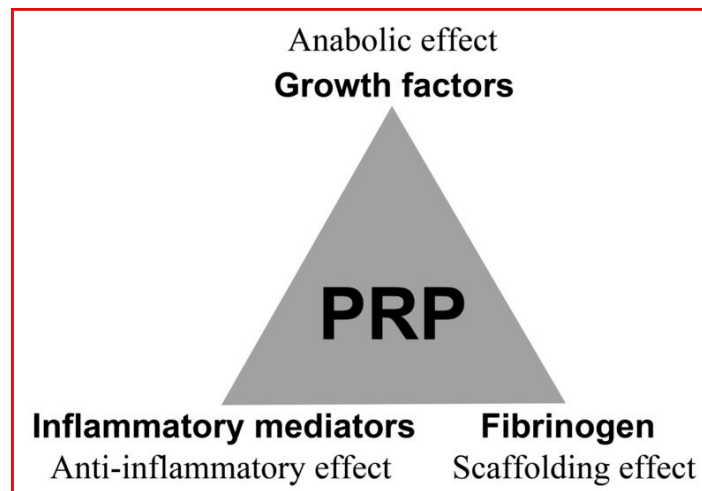


Figure 19 : les principaux effets biologiques du PRP (Xie et al.,2014).

Les principaux facteurs de croissance sont énumérés dans le tableau ci-dessous établi par Everts et al.,(2006), ainsi que leurs fonctions biologiques.

Tableau 3: Synopsis des facteurs de croissance présents dans le PRP (Everts et al., 2006).

Facteur de croissance	Source	Fonctions
TGF-β (Transforming Growth Factor-beta)	Plaquettes, matrice extracellulaire de l'os, matrice du cartilage, cellules TH1 activées et naturel kiler NK. cellules, macrophages / monocytes et Neutrophiles.	Stimule la cellule mésenchymateuse indifférenciée prolifération; régule l'activité endothéliale, et la synthèse fibroblastique et la mitogenèse ostéoblastique; régule la synthèse du collagène et la sécrétion de collagénase; régule les effets, mitogéniques des autres facteurs de croissance; stimule la chimiotaxie endothéliale et l'angiogenèse; inhibe la prolifération des macrophages et des lymphocytes

B FGF (Basic Fibroblast Growth Factor)	Les plaquettes, les macrophages, les cellules mésenchymateuses, chondrocytes, ostéoblastes	Favorise la croissance et la différenciation des chondrocytes et les ostéoblastes; mitogène pour les cellules mésenchymateuses, (chondrocytes et ostéoblastes).
PDGFa-b (Platelet Derived GrowthFactor)	Les plaquettes, les ostéoblastes, les cellules endothéliales, macrophages, monocytes, muscle lisse cellules	Mitogénique pour les cellules mésenchymateuses et les ostéoblastes; stimule la chimiotaxie et la mitogenèse des cellules : fibroblastes / gliales / musculaires régulation de la sécrétion de collagénase et la synthèse de collagène; stimule les macrophages et le chimiotactisme des neutrophiles.
EGF (EpidermalGrowth Factor)	Plaquettes, macrophages, monocytes	Stimule la chimiotaxie endothéliale / angiogenèse; régule la sécrétion de collagénase; stimule la mitogenèse épithéliale / mésenchymateuse
VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	Plaquettes, cellules endothéliales	Augmente l'angiogenèse et la perméabilité des vaisseaux, stimule la mitogenèse des cellules endothéliales
CTGF (Connective Tissue Growth Factor)	Les plaquettes par endocytose de environnement extracellulaire dans la moelle osseuse	Favorise l'angiogenèse, la régénération du cartilage, la fibrose et l'adhésion des plaquettes

3.3.1. Effet anabolique

Divers facteurs de croissance, facteurs de coagulation, molécules d'adhésion, cytokines, chimiokines et intégrines sont conservés dans les plaquettes. Après activation du PRP, les plaquettes peuvent libérer une multitude de facteurs de croissance à des concentrations significativement supérieures aux taux sanguins initiaux, notamment le facteur de croissance transformant β (TGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF), les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), les facteurs de croissance épidermiques (EGF) (Deborah et al., 2018). Il est bien établi d'après Xie et al., (2014) que l'ensemble de ces cytokines pouvant induire un effet anabolisant, telles que le facteur de croissance transformant- β , l'IGF, le facteur de croissance fibroblastique et le PDGF pouvant stimuler la prolifération des cellules souches mésenchymateuses chondrocytaires et multipotentes.

3.3.2. Effet anti-inflammatoire

Les thrombocytes du PRP pouvant être également une source importante des médiateurs et des modulateurs inflammatoires. Woodell-May et al., (2011), ont rapportés que l'incubation des plaquettes avec des billes de polyacrylamide, les plaquettes peuvent libérer de nombreuses cytokines anti-inflammatoires, y compris l'antagoniste des récepteurs IL-1 (IL-1ra), le récepteur soluble du facteur de nécrose tumorale (TNF) I et II, IL-4, IL-10, IL-13 et de l'interféron. D'après Alaaeddine et al., (1999) le PRP peut également réduire la production de prostaglandine E2 induite par le $\text{TNF}\alpha$. En ce qui concerne les cytokines pro-inflammatoires, telles que : IL-1 α , IL-1 β , $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-8, IL-17 et IL-18, leurs concentrations sont beaucoup plus faibles dans le PRP que celles des cytokines anti-inflammatoires. Cette différence significative entre les concentrations de cytokines anti-inflammatoires et celles des facteurs pro-inflammatoires dans le PRP suggère que l'administration du PRP peut supprimer l'inflammation dans l'arthrose, protégeant ainsi le cartilage et réduisant la douleur.

3.3.3. Effet d'échafaudage « Biomatériaux »

Le PRP possède une variété de protéines plasmatiques, qui sont connues pour être des composants essentiels dans le mécanisme de guérison des tissus conjonctif Eppley et al., (2004). Le plasma contient du fibrinogène et d'autres facteurs de coagulation, qui peuvent être activés pour former un échafaudage de fibrine provisoire permettant aux cellules d'adhérer, de migrer et de proliférer (Xie et al., 2014). En outre au sein de cette maquette les plaquettes s'agrègent le long de ces fibres pendant la coagulation, l'échafaudage tridimensionnel qui en

résulte peut également agir comme un réservoir de facteurs de croissance qui exercent des effets favorables sur les cellules (Xie et al., 2012). Les avantages cliniques de la matrice de fibrine PRP sont bien connus dans la chirurgie maxillo-faciale (Anitua et al., 2006). Comme le cartilage articulaire ne contient aucun vaisseau sanguin et est donc incapable d'initier le même processus de cicatrisation que les autres tissus ayant un bon potentiel de régénération, l'introduction de l'échafaudage PRP peut limiter l'étape initiale de cicatrisation et de réparation tissulaire.

4. Utilisation médicales des concentrés plaquettaires autologues

Dans la littérature, plusieurs domaines d'applications du PRP, ont été envisagé par les scientifiques. En médecine animale, des études ont été publiées, dont la cicatrisation ostéo-cartilagineuse attire une attention particulière des chercheurs (Chicharro-Alcántara et al., 2018 ; Abrams et al., 2013).

4.1.Effets sur les structures ostéo-cartilagineuses

A ce jour, des études réalisées sur des espèces animales très variées (le rat, le lapin mouton, chèvre chien, cheval, porc...).

Du fait du nombre important des recherches effectuées sur la cicatrisation osseuse et cartilagineuse chez les animaux, les résultats obtenues sont récapitulées dans le tableau ci-dessous de la manière suivante :

Tableau 4 : Résumé de principales études analysant l'efficacité du plasma riche en plaquettes sur des structures ostéoarticulaires.

Références	Model animal	Préparation du PRP	méthodes	Conclusion
Hernandez-Fernandez et al, (2013)	mouton	40ml de sang total collecté dans 4 tubes citratés, centrifugés à 1800 rpm pendant 8 minutes. 3 ml du PRP activé par 0,15 ml de chlorure de calcium à 10 % (0,05 ml chlorure de calcium/ml de plasma), pour obtenir le gel.	20 moutons âgés de quatre mois ont subi une ostéotomie de la diaphyse fémorale suivie par ostéogenèse de distraction.	La seule différence significative détectée était un fémur plus large (épaisseur diaphysaire accrue). Tandis qu'aucune preuve radiologique ou histologique que l'administration de PRP au début des phases de distraction et d'ostéogenèse améliore la formation osseuse.
Kon et al, Mouton (2010)	Mouton	20 ml de sang total dans des tubes citratés (citrate de sodium à 3,8 %), un rendement de $316 \pm 36\%$ par rapport au sang périphérique	Le PRP a été ajouté à un échafaudage nanocomposite d'hydroxyapatite. Des lésions ostéochondrales des condyles ont été créés chez 24 moutons. Les animaux ont été sacrifiés et évalués six mois après la chirurgie	L'échafaudage hydroxyapatite-collagène a amélioré la réparation des lésions ostéochondrales, mais la combinaison avec des facteurs de croissance plaquettaires n'ont pas un effet additif, au contraire, l'administration du PRP perturbant le processus de régénération.
Milano et al, (2010)	Mouton	60 ml de sang total, l'anticoagulant est non rapporté. La 1 ^{ère} centrifugation : 2400 rpm pendant 3 minutes puis 2 ^{ème} centrifugation 3000 rpm pendant 12 minutes. Le pourcentage des plaquettes est 4 fois plus a sa valeur normale.	L'hypothèse de l'étude était que le PRP peut améliorer la réparation du cartilage après les microfractures par une lésion chondrale chronique complète du condyle fémorale médiale réalisée sur 15 moutons.	Le PRP a montré un effet positif sur la réparation et la restauration du cartilage après microfractures. La procédure était plus efficace lorsque le PRP a été utilisé comme un gel en comparaison avec l'injection du liquide intra-articulaire. Cependant, l'analyse histologique a révélée qu'aucun traitement n'a produit le cartilage hyalin.
Forriol et al, (2009)	mouton	65mL de sang total, centrifugé 2220 g pendant 8 min. le Gel a été obtenu par ajout de thrombine : chaque 1 ml de concentré plaquettaire a été ajouté dans un tube stérile en verre de 100 ml de la thrombine stérile. Nombre des plaquettes non rapporté.	Un défaut osseux de 6 cm dans la mandibule de 15 moutons, âgés de 8 ans, a été reconstruit en utilisant divers allogreffes de côtes congelées, rhOP-1 (rh BMP-7), plasma riche en plaquettes (PRP), et une combinaison d'allogreffe de côtes congelée et rhOP-1.	Le PRP, ne stimule aucune formation osseuse, alors que les moutons recevant rhOP-1 ont montré une certaine formation osseuse. Les animaux recevant à la fois rhOP-1 et allogreffe ont montré la plus nouvelle formation d'os. La combinaison de l'allogreffe osseuse avec des facteurs de croissance démontrée propriétés ostéoconductrices ainsi que ostéoinductives importantes.
Nair et al, (2009)	Chèvre	20 ml de sang total dans des tubes héparines (5 UI ml l de sang, subissent la centrifugation à 2500 rpm pendant 5 min. 8-9 ml de PRP une augmentation de 1,5 fois des plaquettes dans le PRP que dans le sang total).	Défaut segmentaire (2 cm) créé dans un modèle de fémur de chèvre.	La combinaison de HASi avec les cellules et le PRP étaient un avantage supplémentaire qui pourrait favoriser l'expression de nombreuses protéines ostéoinductives, menant à une régénération osseuse plus rapide et la dégradation des matériaux.
Filardo et al, (2014)	Mouton	20 ml de sang total prélevé sous citrate de sodium. Double centrifugation : la 1 ^{ère} centrifugation: à 200G pendant 05 minutes et a 2 ^{ème} centrifugation 1000G pendant 15 minutes. Le PRP présente un de rendement de $582\% \pm 119\%$.	Des défauts diaphysaires ont été créés chez des moutons. L'échafaudage final a ensuite été implanté dans le métatarse de 15 moutons adultes croisés (Mérinos-Sarda),	Dans tous les traitements testés, ces analyses ont mis en évidence la présence d'os nouvellement formé à l'interface des échafaudages osseux. Bien que l'absence d'effet substantiel du PRP a été démontrée. L'augmentation de l'échafaudage + BMSC a montré la valeur la plus élevée du contact os-implant et de la nouvelle croissance osseuse à l'intérieur de l'échafaudage osseuse, en particulier lorsqu'elle est combinée aux CSBM.

4.2.Effets sur la cicatrisation cutanée

Chez les ovins, peu d'études ont été réalisées dans un contexte de l'évaluation de l'efficacité thérapeutique du PRP sur la cicatrisation cutanée. Des études effectuées chez différentes espèces sont récapitulées dans le tableau ci-après.

Tableau 5 : Résumé des principales études animales analysant l'efficacité du PRP sur la reconstitution des tissus cutanés.

Références	Model animal	Préparation du PRP	méthodes	Conclusion
Ostvar et al, (2015)	lapin	le sang total sous EDTA a été centrifugé à 2400 tr / min pendant 10 min puis à 3500 tr / min pendant 15 minutes. Le taux de rendement plaquettaire est non rapporté ainsi que des leucocytes	Des anomalies de résection bilatérales de 3 cm ont été créées chirurgicalement sur la partie dorso-latérale de la peau chez 15 lapins	L'utilisation de PRP améliore la cicatrisation cutanée chez le lapin par une contraction rapide des plaies et angiogenèse mieux adaptée au jour 14 et en particulier au jour 21..
Alishahi et al, (2014)	Chien	20 ml de sang total à été prélevé sans anticoagulant dans des tubes de verre secs et ont été immédiatement centrifugés à 3000 tours par minute pendant 10 minutes avec une centrifugeuse de table spécifique à température ambiante.après centrifugation formation d'un gel de fibrine	Effet de fibrine riche en plaquettes sur des sites lésionnels d'incision.	Les résultats ont démontré que la fibrine riche en plaquettes améliorait et accélérât la cicatrisation cutanée incisionnelle.
Carter et al, (2003)	Chaval	1 litre de sang total a été prélevé sous dextrose, la séparation a été effectuée par un séparateur de cellules sanguines MCS (Haemonetics corp). Le rendement plaquettaire moyen de PRP (250 ml) est de $4,9 \times 10^{11}$ / litre. L'activation du PRP est réalisée à l'aide de thrombine (200 UI/ml) et 5 M d'acide ascorbique.	des plaies 2,5 cm ² pleine de plaie épaisseur cutanée ont été créées au-dessous du genou et du jarret d'un cheval pur-sang.	L'étude histopathologique a révélé que Le PRP accélère la réépithélialisation au 7 ^{ème} jour de cicatrisation et promet la reconstitution du derme au 79 ^{ème} jour de cicatrisation

4.3. Autres domaines d'application

A la suite des résultats prometteurs obtenus sur modèle animal, de nombreuses applications cliniques ont été également réalisées (Dohan et al., 2005). Le PRP a été utilisé localement en ophtalmologie sous forme d'adjuvant au traitement chirurgicale des déchirures de la macula (Gehring et al, 1990). En outre, l'utilisation du PRP trouve ses intérêts dans de nombreux champs de l'ophtalmologie, comme dans la gestion des récidives du ptérygion (épaississement de la conjonctive), dans la chirurgie du strabisme et de la cornée. En effet, il offre un avantage sur le temps opératoire, la facilité de la chirurgie, la gestion des complications post opératoires et le nombre de récidives (Panda et al, 2009). A son tour, le domaine de chirurgie cardio-vasculaire est l'objectif de plusieurs applications du PRP dont la mesure de favoriser la cicatrisation lors d'infarctus myocardiques. Le PRP semblait permettre le recrutement des myocytes, la différenciation des cellules souches myocardiques et le remodelage ordonné des fibres musculaires au niveau de sites d'infarctus (Mogan et Larson, 2004). D'autres domaines d'applications du PRP font également l'objet de plusieurs recherches (tableau 6) à savoir la chirurgie vasculaire (Godet et al, 1995), la neurochirurgie (Elgazzar et al, 2008), la chirurgie musculaire (Konstantinidis et al, 2013), la chirurgie de la cavité orale, maxillo-facial et la chirurgie gastro-intestinale (Fresno et al, 2009).

Tableau 6 : Résumé des principales études analysant l'efficacité du PRP sur la reconstitution des différents tissus.

Références	Domaine d'application et model animal	Préparation du PRP	méthodes	Conclusion
Fresno et al, (2009)	Chirurgie gastro-intestinale chez le porc	35 ml de sang total dans 13 tubes de 5 ml de capacité contenant 0,5 ml de citrate de sodium tamponné. Le sang total subit une double centrifugation: 786g pendant minutes puis 527g pendant 10 minutes. La quantité du PRP obtenu est non rapportée. L'activation de ce dernier est à l'aide de chlorure de calcium à 10%	35 porcs ont soumis à deux procédures d'anastomose intestinale. Le PRP a été appliqué sur l'un des sites d'anastomose, tandis que l'autre site a servi de témoin. Après 24, 48, 72 et 96 h puis à 7 jours. une histologie a été réalisée et la résistance à la rupture de la plaie a été mesurée à 72 h et 7 jours	Il en résulte que l'application de PRP a semblé augmenter le tissu de granulation et la fibrose, mais n'a pas influencé la résistance à la rupture de l'anastomose.
Quarteiro et al, (2015)	Chirurgie musculaire chez le rat	8 ml de sang total a été prélevé par ponction cardiaque, subit immédiatement une double centrifugation. Le régime de double centrifugation est nos rapporté ainsi que l'anticoagulant utilisé.	Une lésion a été produite dans le tiers central du muscle gastrocnémien de chaque membre postérieur de 30 rat. 6 rats ont été traités par PRP et 24 rats traités à l'aide de l'eau physiologique. Des échantillons des tissus traités et non traités ont été évalués histologiquement 7 et 21 jours après les procédures.	Au 7 ^{ème} jour, la quantité de collagène dans les lésions traitées avec du PRP était significativement inférieure que dans les autres blessures. Au 21 ^{ème} jour quantité égale du collagène pour toutes les blessures. Le processus inflammatoire est plus intense dans les lésions traitées au PRP en comparaison avec les lésions des autres groupes de traitement. Cependant, les aspects morphologiques de ces lésions étaient similaires à ceux de des blessures non traitées. Le PRP favorise la restitution complète des tissus entre le 7 ^{ème} et le 21 ^{ème} jour de blessures musculaires expérimentales.
Elgazzar et al, (2008)	Régénération nerveuse chez le rat	La préparation du PRP est non rapportée	Des neurotomies bilatérales ont été réalisées sur les nerfs sciatiques de 15 rats. Les abouts nerveux ont été collés immédiatement après section à l'aide d'une colle synthétique de cyanoacrylate, et la moitié des nerfs a reçu un traitement adjuvant par dépôt de PRP à leur surface.	Les analyses histologiques, pratiquées sur des biopsies nerveuses 12 semaines après intervention, montrent un nombre de fibres nerveuses plus important dans le groupe ayant reçu du cPRP. Malgré la faible différence entre les deux groupes, le cPRP semble bien avoir des propriétés neurotrophiques favorisant la repousse nerveuse après neurotomie chez le rat

PARTIE PRATIQUE

Chapitre IV : Matériel et méthodes

MATERIEL ET METHODES

I. Les animaux

Deux lots d'animaux ont été utilisés pour cette étude, un lot d'animaux fourni par l'abattoir communal de Batna, composé de 06 moutons mâles âgés de six mois et pesant 25 kg, a été utilisé comme une source de sang pour la comparaison entre les différentes méthodes de préparation du PRP afin d'apprécier une méthode fiable de production de ce dernier chez les ovins.

Dans la cadre de l'évaluation de l'efficacité thérapeutique du PRP autologue chez les ovins, nous avons utilisé un deuxième lot d'expérimentation, composé de 09 moutons mâles âgés de six mois et avec un poids de 25 kg.

Les animaux du 02^{ème} lot ont été élevés au sein de l'animalerie de l'institut des sciences vétérinaires et des sciences agronomiques de l'université de Batna 1. Ces animaux sont cliniquement sains, ils sont soumis à une période d'adaptation de 15J avec un régime alimentaire ordinaire (paille et orge). Les animaux d'expérimentation sont logés dans une salle adaptée avec accès libre aux aliments et à l'eau. Tous ces animaux ont été déparasités à l'aide d'ivermectine (IVOMEC injectable pour bovins, moutons et porcs, *Merial* à une dose de 01 ml/50 kg de poids vif). Une large antibiothérapie a été réalisée par utilisation d'une dose unique d'oxytétracycline de 01ml/10 kg de poids vif. La litière utilisée au cours de cette expérimentation, a été préparée à l'aide de la paille, et renouvelé quotidiennement pour éviter des éventuelles infections.

II. Matériel et méthodes utilisées

Pour la réalisation de ce travail le matériel suivant a été utilisé :

1. Matériel pour prélèvement de sang

- Seringues stériles de 1 et 2,5 ml.
- Seringues stériles 10 ml.
- Des tubes secs stériles de 5 ml et de 15 ml.

2. Matériel de la centrifugation

Une centrifugeuse réglable (Hettich zentrifugen D-78532 tuttlingen, Model Universal 32, Germany) a été utilisée dans le cadre de préparation du plasma riche en plaquettes permettant ainsi une séparation aisée des éléments figurés de sang (Figure 20).



Figure 20: la centrifugeuse.

3. Matériel utilisé de la petite chirurgie

3.1. Matériel pour la réalisation des plaies cutanées

- Une Tondeuse électrique.
- Pinces et ciseaux droits.
- Bistouris stériles pour incisions.
- Compresses stériles.
- Désinfectant (Bétadine, savon de Marseille).
- Un champ opératoire.
- Fil de suture résorbable (STERIM^{*} R-40mm-4/8).



Figure 21: Matériel de rasage, de la petite chirurgie et de biopsie (punch biopsie). .

3.2. Matériel de l'examen anatomo-pathologique

- Des flacons pour les prélèvements histopathologiques (biopsies) ;
- Des cassettes pour la préparation des blocs ;
- Automate de déshydratation et éclaircissement (histokinette) ;
- Un appareil d'inclusion à la paraffine.

4. Matériel de dénombrement des thrombocytes

- 02 Micropipettes l'une avec une capacité de 10 μ l et l'autre de 250 μ l.
- Hémocytomètre.

Il existe différents hématimètres (cellule de malassez, cellule de Nageotte, cellule de Neubauer....). La cellule utilisée dans le cadre de cette étude est le NEUBAUER improved.



Figure 22: Micropipettes et hémocytomètre (Neubauer improved).

5. Matériel des mesures morphométriques

Un pied à coulisse numérique (Figure 23) pour mesurer et évaluer la longueur de contraction des plaies.



Figure 23: le pied à coulisse numérique.

6. Matériel d'observation

- Un microscope optique (OPTIKA DM-25), a été utilisé pour observer les différentes préparations hématologiques et histologiques.
- Appareil photos pour la prise des photos.

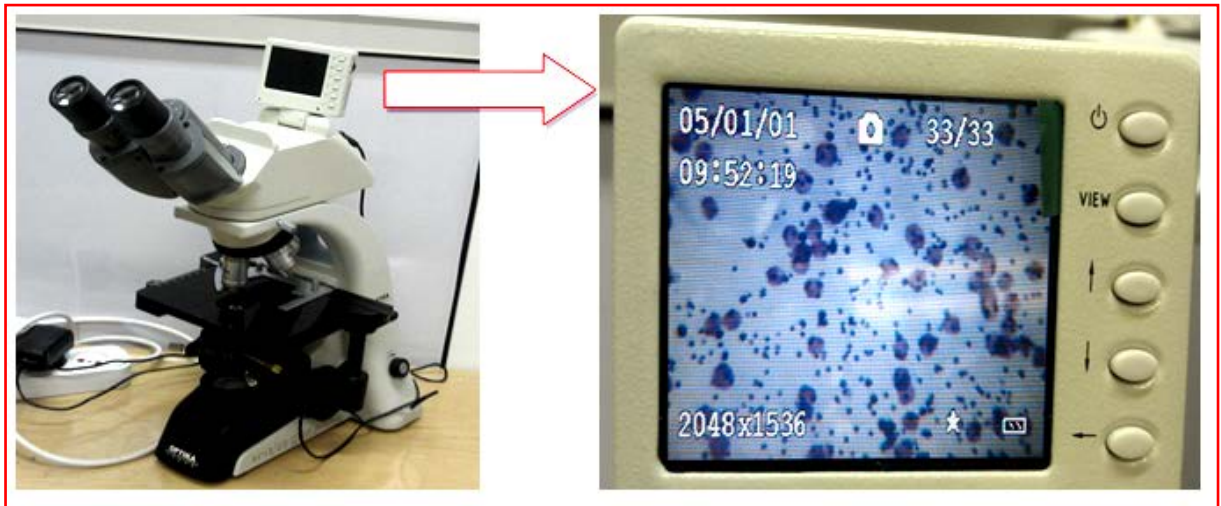


Figure 24 : Microscope optique OPTIKA DM-25 doté d'une caméra.

7. Les produits et réactifs utilisés

Les produits et les réactifs utilisés pour la réalisation de ce travail sont :

- Formaldéhyde à 10% ;
- Anticoagulant ACD (adénosine citrate dextrose) ;
- Acétone ;

- MGG (May Grunwald et Geimsa);
- Hématoxyline ;
- Eosine aqueuse ;
- Eau distillée ;
- Sérum physiologique à 9% ;
- Xylène ;
- Ethanol ;
- Paraffine ;
- Bétadine dermique 10%;
- Ethanol à 70%.

III. Les méthodes utilisées

1. Choix de l'anticoagulant

En hématologie, certains examens spécialisés nécessitent l'utilisation des anticoagulants dont le choix de ces derniers doit être toujours justifié par l'analyse qu'on veut réaliser. L'usage de citrate de sodium est largement utilisé pour la préparation des différents concentrés plaquettaires. D'après Rosslyn (1983), le citrate de calcium est doté d'un pouvoir chélateur remarquable en empêchant l'ionisation du calcium. Pour ceci, un certain nombre de chercheurs préconisent l'utilisation des anticoagulants citratés lors de préparation du PRP Nagata et al., 2010 ; Forriola et al., 2009 ; Milalano et al., 2010 ; Naire et al., 2009 ; Hernandez –Fernandez, 2013). D'autres préfèrent l'utilisation d'ACD (adénosine citrate dextrose) et CPD (Citrate-phosphate-dextrose). Ces produits conservent mieux les thrombocytes et dotés, grâce aux ingrédients qu'ils contiennent, d'un pouvoir de soutien de la viabilité et du métabolisme des plaquettaire en prévenant leurs agglutination (Marx, 2001). Le CPD est également utile pour la préparation de PRP mais 10% moins efficace pour maintenir la viabilité des plaquettes. Dans la présente étude, l'ACD (adénosine citrate dextrose) a été utilisé comme anticoagulant pour toutes les analyses hématologiques réalisées.

2. Les prélèvements

Les prélèvements ont été effectués stérilement au niveau de la veine jugulaire, le site de ponction étant préalablement tondu et nettoyé à l'aide du savon de Marseille, désinfecté

également par une solution de Bétadine. Dans notre expérimentation des aiguilles de gros calibre ont été utilisées pour faciliter l'écoulement de sang et empêcher l'hémolyse. Un volume de 85 ml de sang a été prélevé de chaque animal. Ce prélèvement nécessite l'usage de 6 tubes de 15 ml de capacité contenant 2,25 ml de citrate dextrose (ACD) (Marx, 2001). Immédiatement le sang collecté, distribué dans des tubes secs stériles de 5ml de capacité, au total on obtient 21 tubes contenant 4 ml de sang sont utilisées pour chaque animal. Un seul tube est utilisé pour le dénombrement des plaquettes du sang initial et le reste des tubes (20 tubes) subissent la centrifugation conformément aux différents protocoles présentés dans le (Tableau 7).

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des différents protocoles utilisés lors de la préparation du PRP autologue chez les ovins

Méthode/protocole	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV
	20ml de sang	20 ml de sang	20 ml de sang	20 ml de sang
	total	total	total	total
	Carneiro et al (2013)	Hernandez- Fernandez et al (2013)	Nair et al(2009)	Milano et al (2010)
1^{ère} centrifugation	1800 r.p.m	1800 r.p.m	2500 r.p.m	2400 r.p.m
	pendant 08 min	pendant 08 min	pendant 05 min	pendant 03 min
2^{ème} centrifugation	1000 r.p.m			3000 r.p.m
	pendant 08 min	—	—	pendant 12 min

La vitesse de rotation ainsi que la durée de centrifugation sont strictement respectées pour tous les protocoles utilisés dans le cadre de cette étude. La modification portera uniquement sur le volume de sang total initial, (20 ml de sang total pour chaque protocole).

3. Préparation du PRP par une centrifugation unique (Groupe II et III):

La séparation des éléments cellulaires du sang des groupes II et III a été effectuée en utilisant la simple centrifugation, Les échantillons de sang ont été centrifugés conformément aux protocoles établis par chaque méthode (vitesse et durée appropriée de chaque technique). Le processus se déroule à une température ambiante de 22°C. Il résulte

trois composants de base ; globules rouges (fond du tube), PRP (la fraction intermédiaire) et le plasma pauvre en plaquettes (PPP) (en haut du tube). Ensuite, une marque a été faite sur la ligne séparant le culot globulaire de la partie supérieure du tube. Tout le contenu au dessus de cette marque (environ 08 à 09 ml) a été pipeté et qui correspond au volume total du PRP.

4. Préparation du PRP par la double centrifugation (groupes I et IV)

4.1.La première centrifugation: la séparation des cellules sanguines a été effectuée à l'aide d'une centrifugeuse de laboratoire, les tubes du groupe I ont été centrifugés à 1800 rpm pendant 08 minutes et les tubes du groupe IV centrifugés à 2400 rpm pendant 03 minutes à une température ambiante de 22°C , il résulte deux composants de base: composants des cellules sanguines dans la fraction inférieure et le sérum qui correspond à la fraction supérieure.

4.2.La deuxième centrifugation: tout le contenu au dessus du culot globulaire a été pipeté et transféré dans un autre tube sec de 5 ml sans anticoagulant. Le contenu transféré est à nouveau centrifugé à 1000 rpm pendant 08 minutes pour les tubes du group I et 3000 rpm pendant 03 minutes pour les tubes du groupe IV. Il résulte une petite fraction rouge en bas de chaque tube et un surnageant en haut. La fraction qui sera pipeté est de 0,5 ml de chaque tube au dessus de chaque fraction rouge. La quantité totale du PRP obtenu est de 02,5ml.

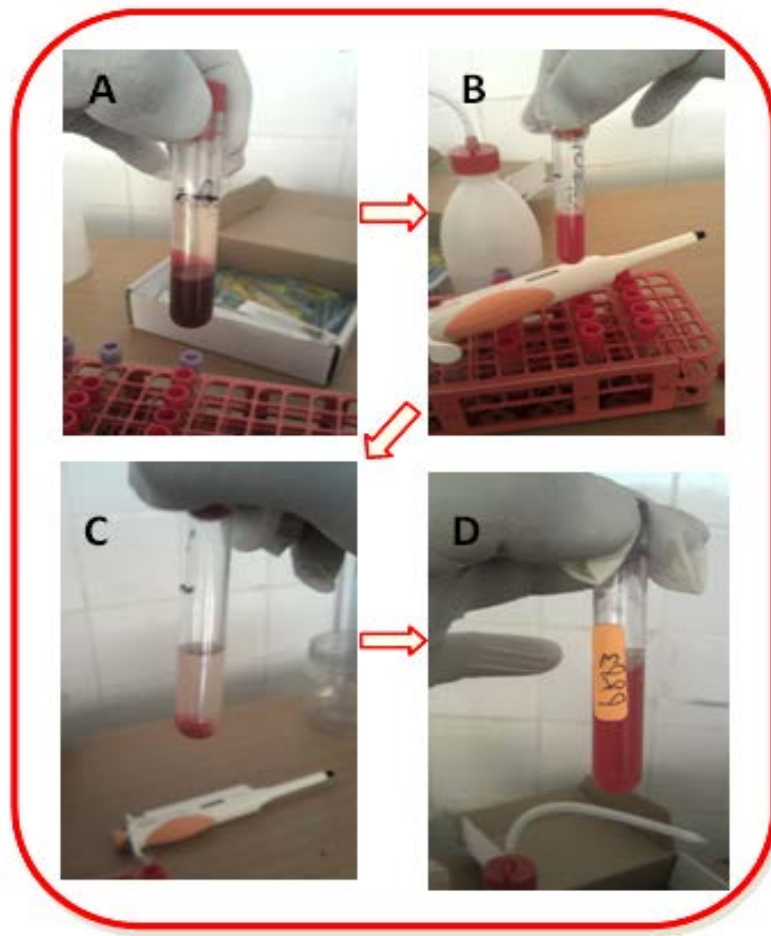


Figure 25 : Diagramme de la préparation du plasma riche en plaquettes (PRP).

A : La 01^{ère} centrifugation **B :** transfert du plasma issu de la 01^{ère} centrifugation dans un autre tube sec. **C :** La 02^{ème} centrifugation **D :** Collecte du volume total du PRP.

5. Le dénombrement des plaquettes

Le dénombrement des plaquettes dans le sang total et dans les échantillons de **PRP** dans les groupes I, II, III et IV a été effectué manuellement à l'aide d'un hémocytomètre (*cellule Neubauer improved*). Cette technique de dénombrement des thrombocytes, nécessite une préparation préalable d'un liquide de dilution, préparée de la manière suivante:

- Formol commercial 0.5ml ;
- Acétone 2,5ml ;
- Sérum physiologique 20ml ;
- Eau distillée (QSP pour 100ml).
- La dilution réalisée est de 1/200.



Figure 26 : Aspect microscopique des plaquettes (flèches rouges).

6. Réalisation des frottis

La réalisation des frottis à partir du sang et des échantillons du PRP, qui s'effectue à l'occasion de chaque numération a pour objectif :

- De préciser tous les changements hématologiques, détectés au sein des différents éléments figurés du sang.
- D'écarter les individus atteints par des maladies sanguines (cas des thrombopénies);
- D'apprécier l'efficacité d'anticoagulant utilisée (Dextrose) comme anticoagulant chez les ovins, par la mise en observation directe de la présence ou l'absence des agrégats.

6.1. Protocole

Le frottis sanguin doit occuper les deux tiers de la lame et aussi le frottis doit avoir trois parties à savoir la tête, le corps et la queue. Cette étape consiste à déposer une goutte de sang ou du PRP près de l'extrémité libre de la lame et à mettre une deuxième lame, de préférence à bords rodés, avec un angle de 45° et avec un geste vif et rapide on essaye d'étaler le sang avant l'arrivée aux bords de la deuxième lame, les frottis sanguins de mauvaise qualité sont

écartés sur place. La lame est ensuite secouée modérément pour assurer un séchage rapide et complet.

6.2. Technique de la coloration

La coloration des différents frottis à partir du sang et du PRP permet l'identification des éléments figurés grâce à leurs caractéristiques propres mises en évidence par un colorant approprié, ainsi que l'observation de la morphologie des érythrocytes et des plaquettes. Dans le cadre de cette étude nous avons utilisé la coloration de May-Grunwald-Giemsa réalisée de la manière suivante :

- 10 à 15 gouttes de liquide de May-Grunwald ont été versées sur le frottis et laisser agir pendant 03 minutes.
- Ajouter des gouttes de tampon phosphate que l'on a mis deux gouttes de May-Grunwald. Puis laisser agir pendant 02 minutes ;
- Rejeter du May-Grunwald, sans laver, et verser du Giemsa dilué dans la proportion de 03 gouttes pour 2cm³ d'eau distillée pendant 15 minutes.
- Lavage rapide sous le jet d'eau ;
- Séchage du frottis par égouttage ou par ventilation.

7. Réalisation des plaies cutanées

7.1. Préparation de la peau

Avant toutes procédures chirurgicales, les animaux ont été d'abord tranquilisés à l'aide de l'acépromazine à une dose de 0,1 mg/kg par voie intramusculaire. En suite, la peau a été préparée pour procédure chirurgicale aseptique par application d'une solution iodée (Bétadine Dermique 10%). A l'aide d'un crayon tous les contours des plaies ont été tracés.

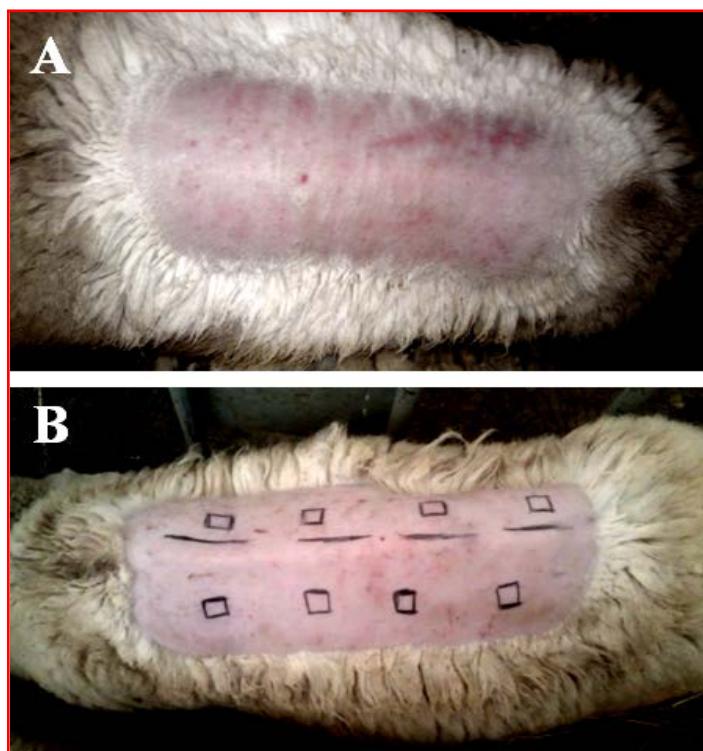


Figure 27 : Les étapes de préparation de la peau

A: rasage de la peau, **B :** traçage des contours des plaies.

7.2. Les différents types de plaies

Des plaies d'excisions et d'incisions ont été créées sur le dos de chaque animal, conformément aux contours des plaies (Figure 28).

7.2.1. Les plaies d'excision

Huit plaies d'excision complète de la peau ont été créées au niveau du dos de chaque animal, d'aspect carré (20x20 mm de chaque côté) et disposées d'une façon symétrique par rapport au plan médio-dorsal. L'excision a été effectuée sous l'effet d'une anesthésie locale (lidocaine hydrochloride 2%), induite par infiltration sous cutanée à un débit de $1\text{ml}/\text{cm}^3$ (AL-Bayati et al, 2013). La peau ensuite a été excisée soigneusement par l'utilisation d'une paire de ciseaux chirurgicaux d'une manière aseptique.). Toutes les règles de l'asepsie ont été rigoureusement respectées et toutes les plaies restent ouvertes et non suturées. De chaque côté latéral de l'animal en aura 4 plaies. Les plaies situées du côté droit ont été utilisées pour une évaluation morphométrique (calcul de la surface de contraction). Les plaies situées à gauche du plan médio-dorsale, ont été utilisées pour réaliser des biopsies cutanées (évaluation histopathologique).



Figure 28: Les différentes plaies d'excisions.

7.2.2. Les plaies d'incision :

Quatre plaies d'incisions de pleine épaisseur de 06 cm de longueur ont été créées sur le dos de chaque animal au voisinage du plan médio-dorsale. Les plaies étaient éloignées de 4 cm l'une de l'autres. Contrairement aux plaies d'excisions, des points de sutures séparés ont été réalisés au niveau de chaque plaie, à l'aide d'un fil de suture à moyenne résorption.



Figure 29: Les différentes plaies d'incision et d'excisions.

8. Traitements des plaies

L'administration des différents traitements a été effectuée localement par voie topique une fois par jour pendant 3 jours d'intervalle. L'application des différents traitements a été réalisée à l'aide d'un écouvillon stérile renouvelé à chaque application. Toutes les plaies ont été couvertes temporairement par un film de polyuréthane pour assurer la bonne diffusion des différents traitements administrés (ostvar et al, 2015). Le PRP a été préparé à l'occasion de

chaque administration, et activé en ajoutant du chlorure de calcium (0,1 ml de CaCl_2 à chaque 1 ml de PRP) immédiatement avant son application (Ibrahim et al, 2015).

- **Groupe I** : Animaux traités par PRP.
- **Groupe II** : Animaux traités par Madécassol à 2%.
- **Groupe III** : Animaux traités par une solution saline (NaCl 09%).

9. Suivi post-opératoire

Durant toute la période de notre protocole expérimental, nous avons contrôlé un certain nombre de paramètres physiques et cliniques :

- État d'embonpoint des animaux ;
- Suivi du comportement des animaux.
- Prise quotidienne de la température centrale ;
- Suivi de l'activité cardio-respiratoire

Au sein des plaies, un suivi macroscopique quotidien durant toute la période d'expérimentation.

10. Suivi de la cicatrisation

10.1. Suivi macroscopique

L'évaluation de la cicatrisation cutanée a été appréciée par mesure du pourcentage de la zone de contraction des plaies (figure 30). Cette méthode est souvent utilisée par les scientifiques comme un paramètre important pour évaluer la cicatrisation de 2^{ème} intention (Singh al. 2014). La zone de contraction de la plaie a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse numérique le 3^{ème}, 7^{ème}, 14^{ème}, 21^{ème} et le 28^{ème} jour postopératoire, jusqu'à ce que les plaies soient guéries. Le pourcentage moyen de contraction de la plaie a été calculé conformément à l'équation établie par Singh et al.,(2014).

$$\% \text{ de la contraction de la plaie} = \frac{\text{surface de la plaie à } J(x) - \text{surface de la plaie à } J(0)}{\text{surface de la plaie à } J(0)} \times 100$$

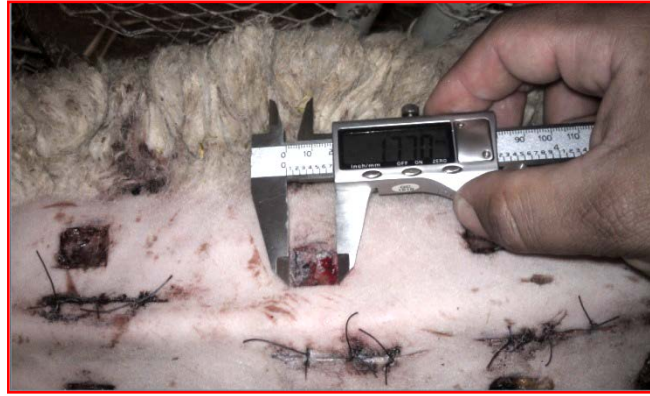


Figure 30: Mesure de la contraction des plaies à l'aide d'un pied à coulisse numérique.

10.2. Suivi microscopique

Cette partie a été réalisée afin de suivre les mécanismes tissulaires de la reconstitution

10.2.1. Prélèvements

Les biopsies de la peau ont été effectuées aux jours (J3, J7, J14, J21 et J28), réalisées à l'aide d'un punch de biopsie cutanée.

Technique : au moment de la biopsie :

- D'abord une prémédication à l'aide de xylazine.
- Des mesures hygiéniques ont été effectuées, de nettoyage et désinfection et parfois même un rasage à nouveau de la région considérée pour la biopsie.
- Une infiltration sous-cutanée par de la lidocaïne ($1\text{cc}/01\text{cm}^3$ de surface de la peau)
- La biopsie est réalisée à l'aide de l'instrument *punch biopsie* (figure 31 A et B).

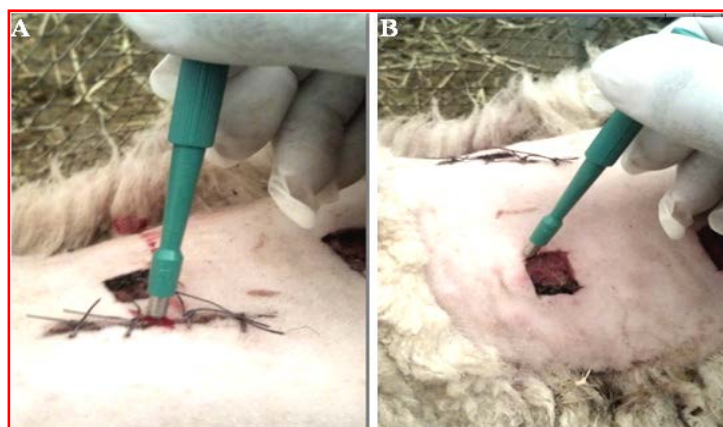


Figure 31: Biopsie cutanée à l'aide d'un punch biopsie (A : plaie d'incision et B : plaie d'excision).

10.2.2. La confection des coupes histologiques

Le diagramme de la figure 32 permet d'éclaircir les différentes étapes de confection d'une coupe histologique. Les principales étapes sont :

- Fixation des prélèvements à l'aide du formol (10%) tamponné ;
- Préparation des prélèvements et mise en cassette;
- La mise en circulation des spécimens : cette étape consiste à faire pénétrer la paraffine au sein du tissu.
 - Déshydratation des tissus : 3 bains d'alcool à concentrations croissantes c'est-à-dire : 70%-85%-90%, pour éviter les distorsions et le durcissement. On termine avec 3 bains d'alcool absolu afin d'enlever complètement l'eau des tissus.
 - L'éclaircissement : 2 bains de xylène à 100% qui servent à remplacer l'alcool dans les tissus afin que celui-ci soit miscible avec la paraffine. Le xylène éclaircira le tissu pour que son indice de réfraction soit plus élevé et augmentera sa transparence.
 - L'imprégnation : bains de paraffine chaude (44°C à 60 °C) pour solidifier le
- Inclusion (enrobage) des tissus : Le tissu est inclus dans un moule rempli de paraffine chauffée. Il est placé dans le moule selon un certain angle ou une certaine position afin de voir toutes les structures désirées lors de l'examen microscopique.
- La microtomie a pour but d'avoir des coupes histologiques avec une épaisseur fixée à 6 µm. Elles sont placées dans un bain d'eau chaude (43-45°C pour de la paraffine dont la T° de fusion est à 55-56°C) et étalées sur une lame.
- Séchage des lames à l'étuve (45°C) pendant une heure.
- Coloration : la coloration utilisée est celle d'hématoxyline et éosine, c'est une coloration largement utilisée dans les laboratoires d'histologie et d'histopathologie
- Le montage est effectué par le baume du Canada en protégeant les coupes par les lamelles.
- L'observation des coupes a été faite avec un microscope optique (Optika DM-25) pour l'évaluation du degré de cicatrisation.



Figure 32: Diagramme de la confection d'une coupe histologique.

A : Des cassettes et des flacons contenant des prélèvements noyés dans le formol et. **B :** Histokinette. **C :** Microtome LEICA RM 2125 RTS. **D:** Station d'enrobage **E :** Etuve **F :** plateau de coloration des lames.

10.3. Evaluation histopathologique de la cicatrisation cutanée

Des scores histopathologiques établis par Vidinsky et al., (2006), ont été utilisés dans cette étude, présentés dans le tableau 8 par des scores de 0 à 3.

Tableau 8 : Description des différents scores histopathologiques de l'évaluation histopathologique semi-quantitative.

Score	Epithélialisation	PMNL *	Macrophages	Fibroblastes	Néo-Angiogenèse	Néo-Collagène
0	Épaisseur des bords coupés	Minimum	Minimum	Minimum	Minimum	Minimum
1	Migration des cellules épithéliales	Léger	Léger	Léger	Léger	Léger
2	Pont de l'excision	Modéré	Modéré	Modéré	Modéré	Modéré
3	Régénération complète	Marquée	Marquée	Marquée	Marquée	Marquée

* PMNL : Les leucocytes polymorphonucléaires

11. Tests statistiques

Une analyse statistique descriptive a été réalisée pour chaque variable de l'étude. Les comparaisons entre les différentes méthodes sont effectuées en utilisant ANOVA. Cette analyse de variance suivi d'une comparaison entre les groupes en utilisant Tukey Test HSD avec une signification statistique fixée à $P < 0,05$.

Pour préciser les variations du pourcentage de contraction, une analyse de variance ANOVA entre les différents groupes suivis par le test LSD ont été utilisés dans cette étude. Le test non paramétrique U de Mann-Whitney a été utilisé pour une analyse statistique des différents scores histopathologiques obtenus. Le logiciel SPSS 23.0 (2015) a été utilisé pour toutes les analyses. Les valeurs de $p < 0,05$ et $p < 0,01$ ont été retenues pour déterminer le niveau de signification des différences enregistrées.

Chapitre V : Résultats et discussion

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Etude comparée des différents protocoles de préparation du plasma riche en plaquettes chez les ovins

Cette étude a pour but de faire une comparaison entre quatre méthodes de préparation du PRP autologue chez les ovins.

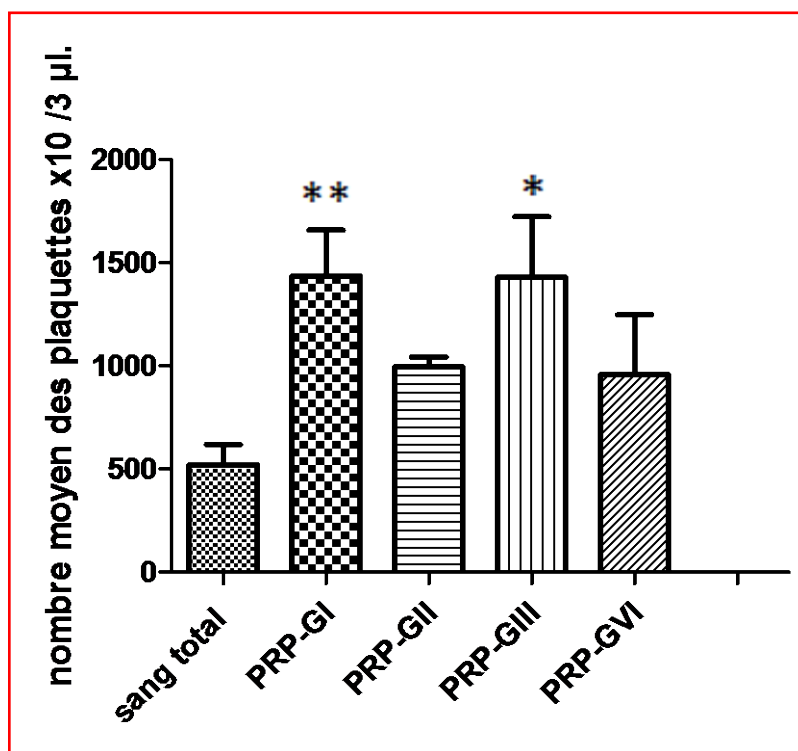
1. Présentation des résultats

Le dénombrement des plaquettes par la méthode manuelle ou automatisée, est largement discuté par la littérature, la majorité des scientifiques recoururent aux automates d'analyse hématologiques modernisés. Plusieurs travaux ont été publiés dans ce contexte, Woodell-may et al., (2005) ; Briggs et al., (2007), confirment que seuls les analyseurs d'hématologie peuvent compter exactement les plaquettes dans le PRP. D'autres, préfèrent la méthode manuelle (Okuda et al., 2003) dont le simple raisonnement est d'éviter tous les individus ayant une thrombocytopénie préalable. En effet, une étude récente publiée, dans la mesure de faire une comparaison entre la méthode manuelle et automatisée. Des numérations plaquettaires ont été réalisées chez 43 chiens de la race *Cavalier King Charles Spaniel* (une race prédisposée aux thrombopénies). L'étude comparée entre les deux méthodes, montre des corrélations significatives et confirme l'importance de la méthode manuelle lors de la numération des thrombocytes (Lisbeth et al., 2004). Notre étude a permis d'enregistrer les résultats suivants, représentés dans le Tableau 9 de la manière suivante.

Tableau 9: Résultats des moyennes de dénombrement des plaquettes des quarts groupes étudiés

Groupes	Nombre moyen des plaquettes $\pm$ SD ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	N	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		F	Valeur de P
			Borne inférieure	Borne supérieure		
Sang total	521,56 $\pm$ 97,01	6	419,75	623,37	17,24	p < 0,001 0,000 (***)
Groupe I	1438,25 $\pm$ 221,72 ^c	4	1085,43	1791,06		
Groupe II	995,33 $\pm$ 48,95 ^{bc}	3	873,72	1116,93		
Groupe III	1430,75 $\pm$ 293,63 ^c	4	963,51	1897,98		
Groupe IV	958,66 $\pm$ 289,75 ^{ab}	3	238,86	1678,46		

Les moyennes suivies par lettres différentes sont significativement différentes (ANOVA : test Tukey HSD) au seuil de signification $\alpha = 5\%$, *: $p < 0,01$; la différence est hautement significative, *** : $p < 0,01$; la différence est hautement significative

**Figure 33:** Taux moyen des plaquettes dans le sang total et dans le PRP des différents groupes.

A partir des résultats obtenus, il est clair que le nombre moyen des plaquettes dans le sang total de tous les sujets considéré à étudier, corrobore avec celui fournis par la littérature (Feldman et al., 2000) avec une variation de $521,56 \pm 97,01 \times 10^3$ plaquettes/ μl . Concernant le nombre moyen des plaquettes du PRP de chaque groupe, obtenu par les différents protocoles utilisés, nos résultats sont similaires à ceux rapportées par les auteurs. Les méthodes proposées par Carneiro et al., (2013); Nair et al, (2009) permettent d'avoir un taux plaquettaire plus élevé avec une variation de $1438,25 \pm 221,72 \times 10^3$ plaquettes/ μl et $1430,75 \pm 293,63 \times 10^3$ plaquettes/ μl respectivement. Les méthodes proposées par Hernandez-Fernandez et al.; (2013) et Milano et al.; (2010) révèlent les taux les plus bas en thrombocytes ($995,33 \pm 48,95 \times 10^3$ plaquettes/ μl et $958,66 \pm 289,75 \times 10^3$ plaquettes/ μl respectivement).

2. Examen des frottis

L'examen attentif des frottis réalisés à partir d'une goutte de PRP (figure 34), confirme l'ensemble de nos constatations, la figure (34 : B et D), illustre la richesse de nos frottis en thrombocytes. Nous observons également l'absence de phénomènes d'agrégation pour la totalité des frottis.

Concernant les anticoagulants employés, il ressort que l'usage de dextrose lors de préparation du PRP autologues chez les ovins est incontournable, car l'usage des autres anticoagulants est le plus souvent confronté par le phénomène d'agrégation.

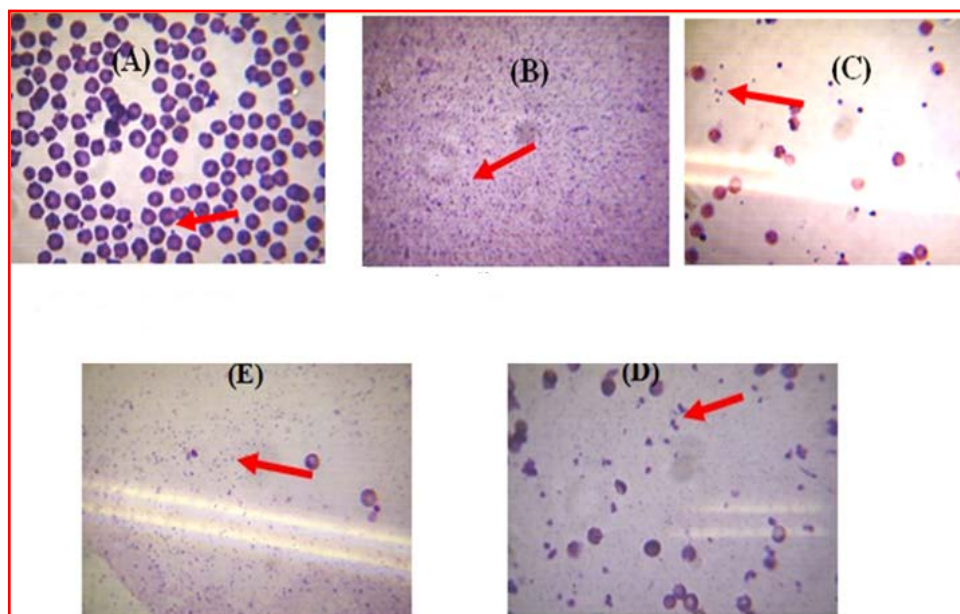


Figure 34: Les frottis réalisés à partir du sang total et des échantillons de PRP (MGx100).

(A) : Frottis montrant des plaquettes du sang total, (B) : Frottis montrant des plaquettes du groupe I, (C) : du groupe II, (D) : du groupe III et (E) : du groupe IV.

L'analyse de variance ANOVA (tableau 01), a révélé une différence significative nette au seuil de signification $\alpha = 5\%$ entre les différents groupes par rapport au sang total. Egalement, la comparaison entre les différentes méthodes (comparaison intergroupe) à l'aide de *test Tukey HSD* confirme ce résultat avec des différences significatives enregistrées en faveur de méthode du groupes I et III : hautement significative pour le groupe I et significative pour le groupe III. Nos résultats, sont confrontés par certains auteurs qui rapportent que l'efficacité clinique de chacune de ces méthodes demeure incertaine et optimiser en rapport aux différentes variables du processus de préparation de PRP ainsi que à la dose utilisée. D'après Dugrillon et al., (2002) ; Nagat et al., (2010) ; Weibrich et al., (2004) ; et Marx et al., (1989), le volume de sang total initial, le nombre de tours, le temps de la centrifugation, et la vitesse de rotation de la centrifugeuse, tous ces paramètres concourent pour contrôler la qualité du PRP. Concernant la dose thérapeutique, des lacunes analytiques des travaux publiés sur les PRP mènent parfois même à des contradictions et confortent ainsi les doutes sur l'identité biologique de ces préparations.

Certains auteurs ont également signalés que des régimes de centrifugation modérés favorisent une séparation aisée des plaquettes, tandis qu'une centrifugation supérieure et étalée dans le temps est non souhaitée. Sabarish et al., (2015) ont suggérés que lors de la préparation d'un PRP dans des conditions pareilles, s'accompagne le plus souvent, d'une agglutination ou désintégration des plaquettes avec libération prématurée du contenu des granules.

En conclusion, et en faveur des résultats obtenus, il s'avère que tous les protocoles utilisés permettant d'avoir des concentrés plaquettaires avec des teneurs en plaquettes très variées. Les résultats de la présente étude révèlent que les protocoles proposés par Carneiro et al., (2013) ; Nair et al., (2009) permettant d'avoir le taux plaquettaire le plus élevé. Du fait qu'il n'y a pas d'un consensus officiel pour optimiser et normaliser une méthode bien précise, les principaux paramètres à contrôler lors de la préparation du PRP sont, le volume initial de sang prélevé, la nature de l'anticoagulant utilisé, la vitesse et la durée de centrifugation.

II. Evaluation de l'effet biologique du PRP autologue chez les ovins

1. Choix du protocole de préparation de PRP

D'après certains auteurs, le recours à un protocole de double centrifugation lors de la préparation du PRP est incontournable. Ceci est justifié d'après Marx et al., (1989) par l'absence quasi totale de différentes cellules de la lignée blanche. Marx (2001), rapporte que l'ensemble de ces cellules pourraient avoir un effet néfaste sur l'épithélialisation suite à une libération prématurée de facteurs pro-inflammatoires responsable d'une dégradation de la matrice extracellulaire. Nos résultats, confirment que le PRP obtenu au moyen de ce protocole modifié, permet d'avoir un taux élevé en plaquettes (PRP : $1374,8 \pm 164,89 \times 10^3 / \mu\text{l}$, en comparaison avec le sang total : $425,26 \pm 75,23 \times 10^3 / \mu\text{l}$) et d'écarter en effet toutes les cellules de la lignée blanche (figure 36).

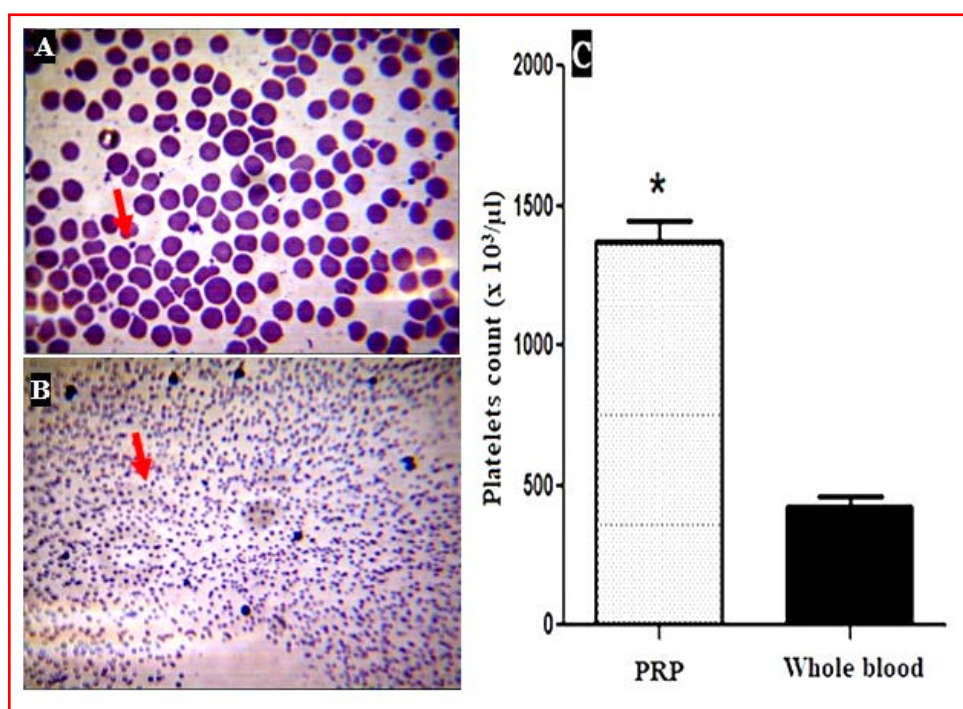


Figure 35: Proportion des plaquettes.

(A) Frottis montrant des plaquettes (flèches) de sang total. (B) frottis montrant les plaquettes (flèches) du PRP (MGX100). (C) Nombre moyen de plaquettes dans le sang total et dans le PRP. * : Différence significative ($p = 0,05$).

Dans cette étude deuxième partie de notre étude, la première étape consiste à préparer d'abord un PRP autologue chez les ovins, conformément au protocole établis par Carneiro et al., (2013), dont la modification portera seulement sur le volume de sang initial (20ml de sang

total) puis nous sommes intéressés de voir son effet biologique *in vivo* (étude de son activité cicatrisante sur des plaies cutanées).

2. Suivi clinique : Les observations cliniques

Durant cette étude expérimentale de 4 semaines, nous pouvons constater que :

D'abord concernant le comportement des animaux, nous n'avons observé aucun changement avec un appétit, une miction et défécation normale. Les animaux ne semblent pas affectés par la présence des plaies sur leurs dos, ainsi qu'au cours de l'application du traitement les animaux n'ont montré aucun symptôme d'agressivité ou d'hypersensibilité. Tous les animaux ont bien toléré cette procédure.

Durant les premières 24 heures qui suivent la réalisation des plaies, les animaux reflètent une légère hyperthermie (39,8°C), et nous n'avons enregistré aucun changement au sein des autres paramètres vitaux, le rythme cardio-respiratoire semble très normal. Après le 01^{er} jour post-opératoire, la température corporelle des animaux, revient à sa valeur normale.

Au sein des plaies, aucune complication n'a été observée, dans les sites des plaies telle que :

- les infections purulentes des plaies.
- la formation de tissu de granulation exubérant dans les sites des plaies.

3. Etude des plaies d'incision

3.1. Evaluation des aspects macroscopiques des plaies

L'examen attentif des différents aspects macroscopiques des plaies cutanées (plaies traitées par PRP, plaies traitées par asiaticoside et plaies témoins traitées à l'aide d'une solution saline). , nous a permis de constater ce qui suit :

- Durant les 06 à 07 heures post chirurgicales, toutes les plaies sont caractérisées par une fermeture primaire par formation d'un caillot sanguin.
- Durant le 03^{ème} jour post-chirurgical, nous observons que les différentes plaies étudiées présentent le même aspect témoignant la réaction inflammatoire, à savoir la rougeur et la tuméfaction.
- Vers le 5^{ème} jour, nous constatons que toutes les plaies subissent une contraction avec un changement considérable de taille et apparition des croûtes. Nous notons que

l'apparition de cette croute est précoce au niveau des plaies traitées par le PRP (4^{ème} jour pour la totalité des plaies traitées par le PRP et asiaticoside et chez un certain sujet commencent d'apparaître vers le 3^{ème} jour pour les plaies traitées par le PRP). Pour les autres plaies témoins nous constatons que le début d'apparition des croutes est enregistré vers le 6^{ème} jour.

- Durant le 7^{ème} jour, nos observations indiquent et révèlent que toutes les plaies présentent un tissu de granulation habituel qui comble les différentes plaies. A ce jour de l'évolution de la cicatrisation macroscopique rien n'est particulier entre les différents groupes des plaies.
- Les observations des plaies vers le 14^{ème} jour révèlent que les plaies traitées par le PRP subissent une épithélialisation recorde avec une couverture complète par une fine cicatrice.
- En ce qui concerne le 21^{ème} et le 28^{ème} jour, nous observons d'abords que toutes les plaies guéries avec une épithélialisation correcte surtout les plaies traitées par le PRP et l'asiaticoside.

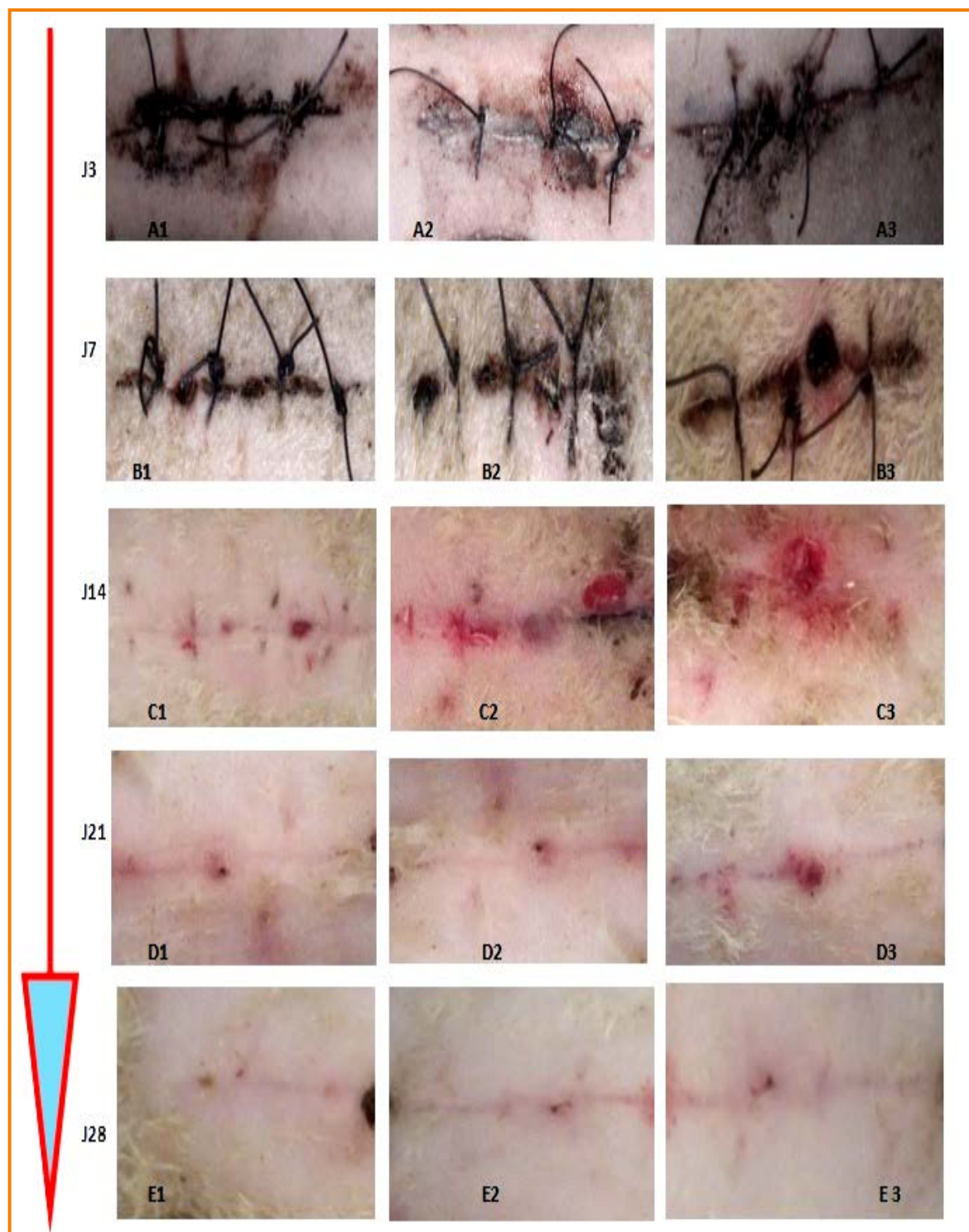


Figure 36: Evolution de la cicatrisation et aspect macroscopique des plaies d'incision.

(A : 1, 2,3) plaies au 03^{ème} j de cicatrisation. (B:1, 2,3) plaies au 07^{ème} j de cicatrisation. (C : 1,2,3) plaies au 14^{ème} j de cicatrisation. (D : 1, 2,3) plaies au 21^{ème} j de cicatrisation. (E : 1, 2,3) plaies au 21^{ème} j de cicatrisation. (A, B, C, D, E : 1) : plaies traitées par le PRP. (A, B, C, D, E :2) : Plaies traitées par Madécassol. (A, B, C, D, E : 3) : Plaies témoins, traitées par solution saline.

3.2. Etude histopathologique

3.2.1. Evaluation histologique de la cicatrisation des plaies

L'examen histologique revêt un intérêt capital dans l'évaluation de la cicatrisation à l'échelle microscopique.

3.2.1.1. Biopsie d'une peau saine chez les ovins

La figure ci-dessous montre les différentes couches d'une peau saine chez le mouton.

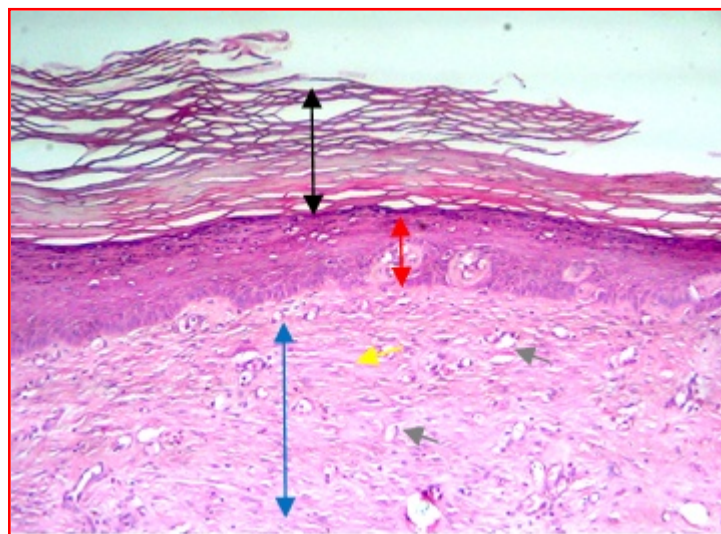


Figure 37: Aspect histologique de la peau chez le mouton (H&E, X40).

Flèche noire : couche cornée, Flèche rouge : épiderme, Flèche bleue : derme, flèche jaune : fibres de collagène, flèches grises : follicule pileux.

3.2.1.2. Biopsies réalisées au 3^{ème} jour

Nous notons d'abords, que l'aspect des biopsies des 9 moutons utilisés dans le cadre de cette étude, présente à chaque stade, un aspect global similaire.

L'étude minutieuse des coupes histologiques révèle plusieurs constatations

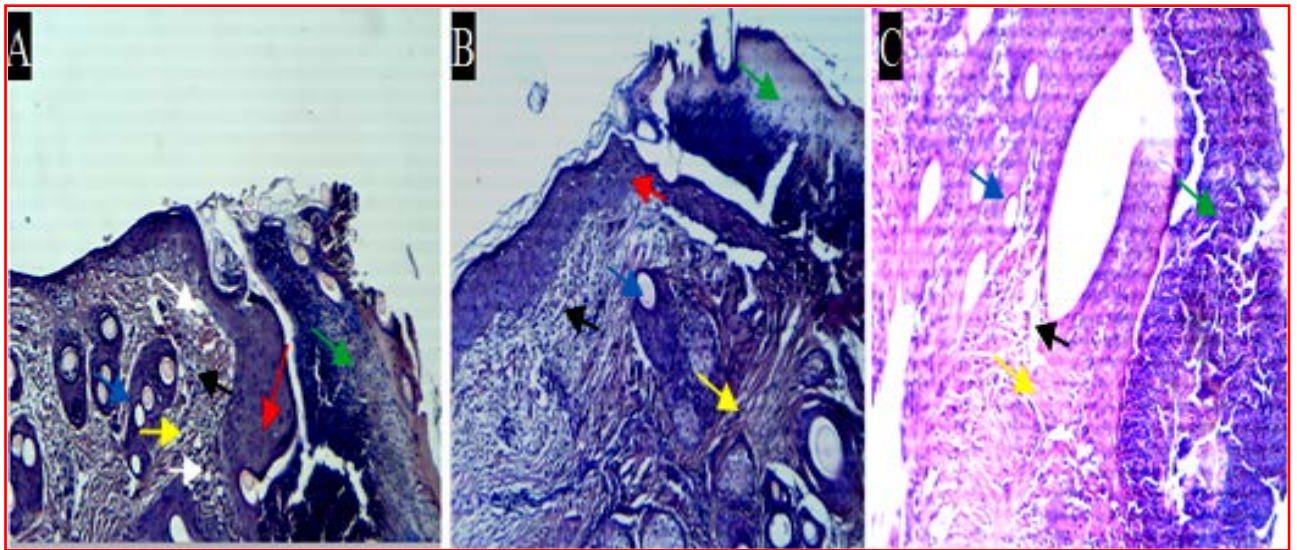


Figure 38: Aspect histologique à J3 (H&E, X40).

A : A partir d'un site testé par PRP, **B :** d'un site traité par Madécassol, **C :** A partir d'un site témoin (solution saline). Flèche noire : cellules inflammatoires, Flèche rouge : épiderme, Flèche bleu : vaisseaux sanguins nouvellement formés, flèche jaune : fibres de collagène, flèches blanche : follicule pileux.

Au 03^{ème} jour de l'évolution de la cicatrisation, les différentes biopsies effectuées à partir des différents sites de plaies présentent un aspect similaire, avec formation de la croûte (figure 38), et présences d'un infiltrat inflammatoire très abondant et d'intensité variable, riche en macrophages, et en polymo-nucléaires neutrophiles. Il est sous épidermique, péri vasculaire, il s'étend parfois même jusqu'au glandes sébacées. Cependant, l'épiderme présente, dans son ensemble, un épaississement, avec un aspect d'acanthose beaucoup plus prononcé chez les animaux du groupe I, et aucune épithélialisation n'a été observée chez les animaux traités par la solution saline. Concernant le derme, il est fortement congestionné avec des vaisseaux dilatés qui se traduit par des œdèmes. Nous avons remarqué également la présence d'un nombre important de fibroblastes en proportion variable éparpillées entre des fibres de collagène nouvellement formées, qui restent espacés les uns des autres et non organisés dans tous les groupes. En résumé, les principaux changements histopathologiques observés à ce stade de l'évolution de la cicatrisation, témoignant surtout la réaction inflammatoire.

3.2.1.3. Biopsies réalisées au 7^{ème} jour

Les plaies étaient remplies de tissu de granulation riche en fibroblastes, en granulocytes et en une matrice extracellulaire sans organisation claire. On observe des bourgeonnements

remarquables de l'épiderme au niveau des crêtes épidermiques témoignant l'épithélialisation. Elle est beaucoup plus marquée chez les animaux du groupe I. La couche cornée est pratiquement absente, elle est remplacée par une fine couche de kératine. Concernant l'intensité de l'infiltrat inflammatoire, nous constatons qu'il y a une certaine atténuation de ce dernier avec un nombre modéré des neutrophiles, observées au sein des plaies traitées par le PRP, alors qu'il reste important dans les plaies du groupe III. Des foyers nécrotiques ont été également isolés témoignant la détersion des débris cellulaires. Concernant les fibroblastes, de nombreuses cellules de ces dernières observées aux pourtours des capillaires vasculaires dermiques nouvellement formés dans les plaies traitées par le PRP. Cependant, les fibres de collagène nouvellement formées présentent une mauvaise architecture au niveau de toutes les plaies. A cet égard de l'évolution de la cicatrisation, nous pouvons constater, que les coupes histologiques examinées avaient montré un tissu de granulation plus élaborés chez les animaux du groupe I (plaies traitées par le PRP) en comparaison avec les autres animaux (plaies traitées par madécassol et de la solution saline).

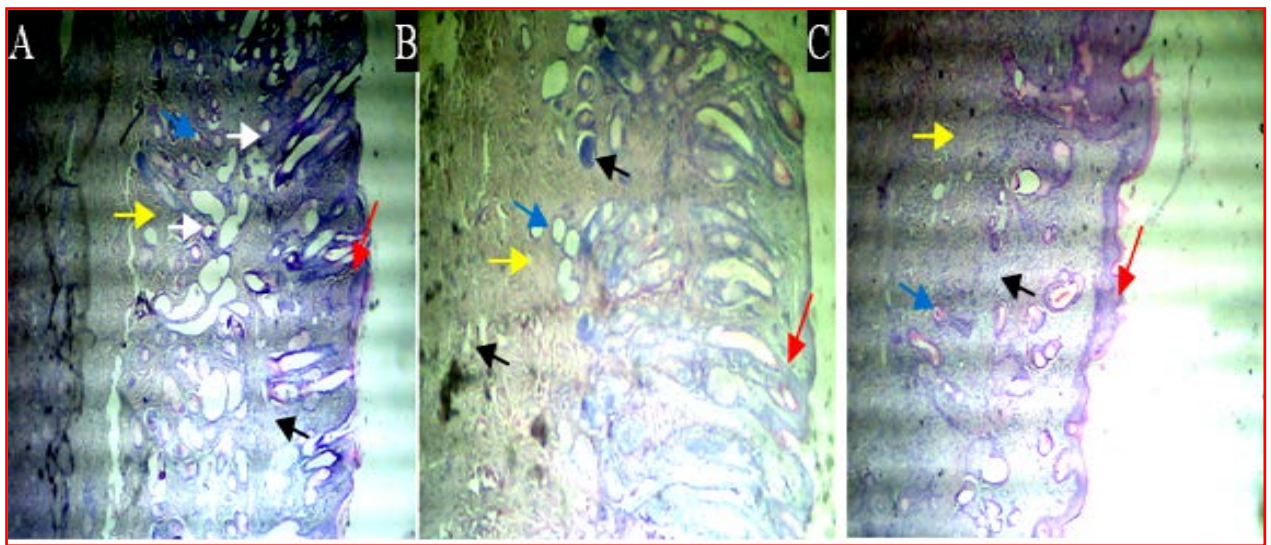


Figure 39: Aspect histologique à J7 (H&E, X40).

A : A partir d'un site lésionnel d'une plaie du groupe I, **B :** groupe II, **C :** groupe III. Flèche noire : cellules inflammatoires, Flèche rouge : épiderme, Flèche bleu : vaisseaux sanguins nouvellement formés, flèche jaune : fibres de collagène, flèches blanche : follicule pileux.

3.2.1.4. Biopsies réalisées au 14^{ème} jour

L'infiltrat inflammatoire sous épidermique était toujours présent, bien qu'il ait été réduit d'une manière importante dans le derme des plaies traitées par le PRP (animaux du groupe I). Nous notons toujours la prolifération des fibroblastes surtout au niveau des sites des plaies

traités par PRP. Cependant, les fibres de collagènes sont mal organisées et on note le début de la condensation de ces derniers.

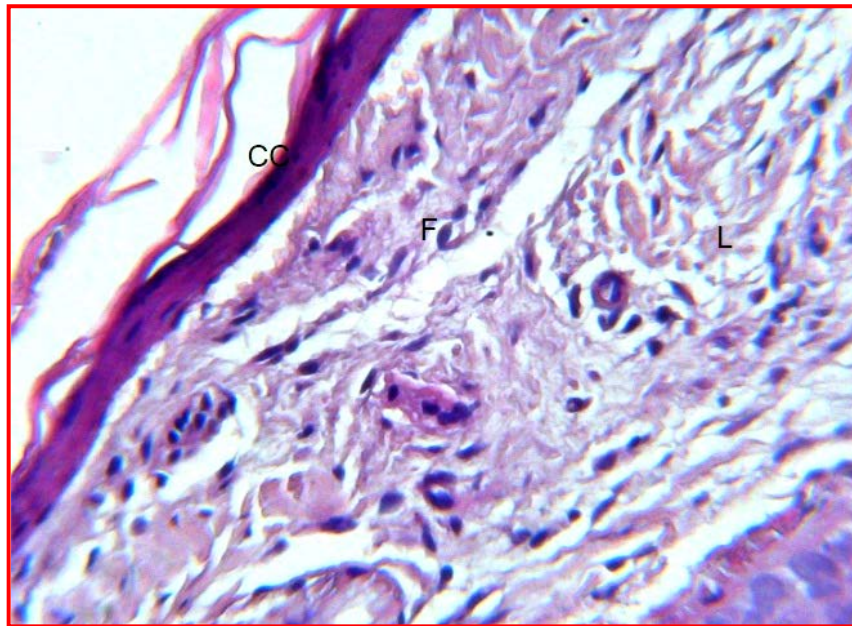


Figure 40: Coupe transversale de la plaie traitée par le PRP à J14 (H&E, X100).

CC : couche cornée, F : fibroblastes, L : Fibres de collagène nouvellement formées.

3.2.1.5. Biopsies réalisées au 21^{ème} jour

Au 21^{ème} jour de l'évolution de la cicatrisation, les repères de guérisons sont flagrants et nets dans les plaies traitées par le PRP. L'épithélialisation est complète, avec réorganisation des fibres de collagène.

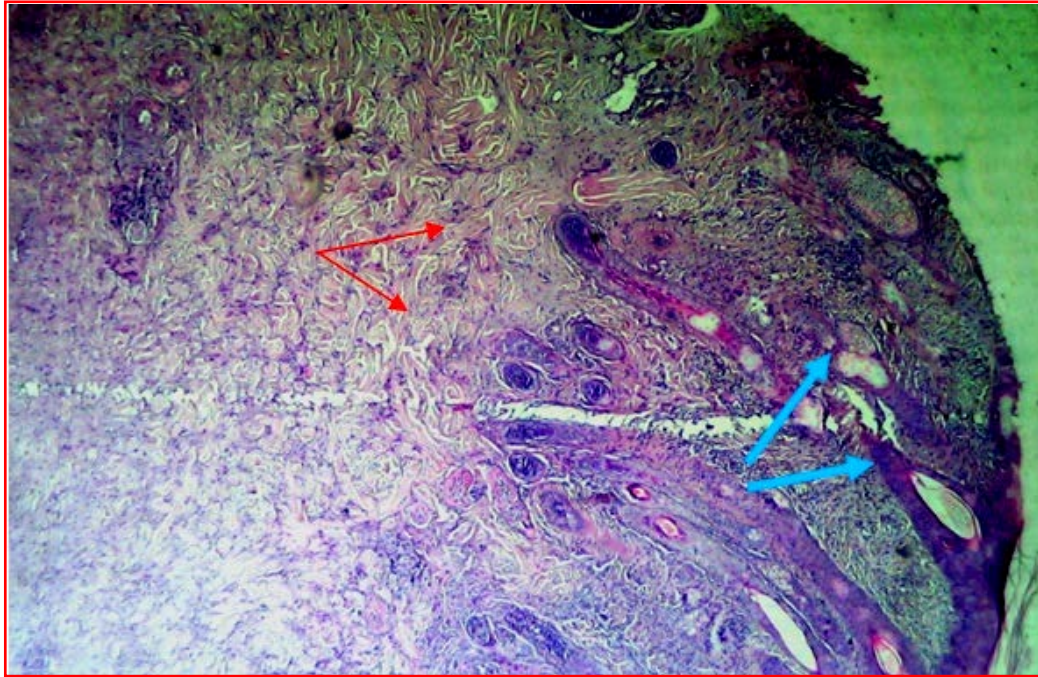


Figure 41 : Aspect histologique de la plaie traitée par le PRP à J21 (H&E, X40).

Flèche rouges : collagène nouvellement formé, Flèches bleu : crêtes épidermiques.

3.2.1.6. Biopsies réalisées au 28^{ème} jour

Ce stade de l'évolution, a été caractérisé par la guérison chez tous les sujets. Cependant, il nous semble que l'examen histopathologique des différentes biopsies a révélé des changements qui méritent d'être discutés. Nous observons que les plaies traitées par le PRP, ont montrées une parfaite cicatrisation, avec réépithélialisation complète, kératinisation bien marquée (compacte à sa base et aérée en surface) et atténuation du nombre des crêtes épidermiques. Pour le derme, le collagène semble mieux organisé, et comble d'une manière dense le site de lésion en comparaison avec les autres plaies. En fin, un point intéressant qui attire notre attention, concerne la réapparition des follicules pileux dans la ligne d'incision d'un certain nombre de plaies traitées par le PRP.

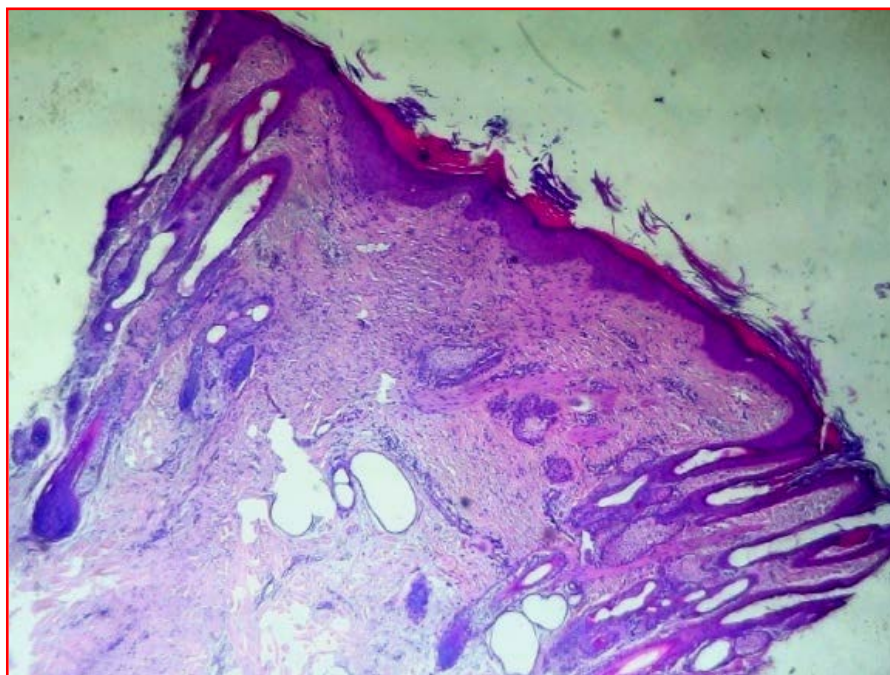


Figure 42: Coupe transversale de la peau traitée par le PRP à J28 (H&E, X40).

Flèche rouges : collagène nouvellement forme, Flèches bleu : crêtes épidermiques.

Aujourd'hui, l'utilisation du plasma riche en plaquette PRP offre, une nouvelle approche contemporaine multidisciplinaire en pleine évolution que ce soit en médecine humaine ou vétérinaire (Dohan et al., 2005). Dans ce contexte, plusieurs études largement controversées ont été publiées dans un cadre qui tend à prouvé leur aptitude à promouvoir les phénomènes de régénération tissulaire par l'intermédiaire des plaquettes et des facteurs de croissance qu'ils libèrent au niveau du site lésionnel (Anitua et al., 1999 ; Marx et al., 2004). Leur caractère autologue lui conférant, de plus, une biocompatibilité et une biodégradabilité excellentes, tout en écartant le risque de transmission d'agents pathogènes. Chez l'homme et chez les animaux de nombreuses publications ont été rapportées, sur son utilisation dans des domaines médicaux très variés (ostéo-articulaire, maxillo-facial, neurochirurgie, cicatrisation cutanée, chirurgie plastique...) (Chicharro-Alcántara et al., 2018 ; Abrams et al., 2013). Cependant, chez les ovins, il y a peu de recherches portant sur l'évaluation de son effet sur la cicatrisation tissulaire en particulier cutanée où la plupart des chercheurs se sont concentrés sur un domaine d'investigation ostéo-articulaire (Chicharro-Alcántara et al., 2018). En outre, certains auteurs, ont rapporté que la prévalence des complications des lésions cutanées chez les ruminants, ont une tendance d'augmenté d'une façon spectaculaire (infections tel que les mammites et le panaris, infestations parasitaires cutanées avec différentes formes de gales, brûlures en cas d'incendie, ...) (Sardari et al., 2007). D'après Chicharro-Alcántara et al.,

(2018), la cicatrisation peut présenter un impact biomédical et économique parfois redouté. Donc, la nécessité d'établir de nouvelles stratégies, tels que les thérapies régénératrices demeure un déficit incontournable.

L'inspection des différentes biopsies réalisée au 3^{ème} jour après incision, a révélé la présence de l'infiltrat inflammatoire dans le derme de toutes les plaies. Mais il est d'intensité variable, avec recrutement massif des PMN dans les plaies du groupe I. En outre, l'observation de l'évolution microscopique a montré que le PRP peut promettre l'épithélialisation. Ces résultats sont en parfaite corrélation avec les travaux de Molina et al., (2009) ; Ostvar et al., (2015) qui ont rapportés dans des études similaires réalisées sur un modèle de lapin, que l'administration topique du PRP peut atténuer le processus inflammatoire par un recrutement massif des PMN, durant les premiers jours qui suivent la blessure. Ceci, et dans la plus part des références, est dû aux effets des facteurs de croissance qui s'accumulent dans les granules β des plaquettes. Il est généralement admis qu'ils jouent un rôle essentiel dans la cicatrisation (Jornet et al., 2009). Ces facteurs de croissance peuvent accélérer la cicatrisation en stimulant l'angiogenèse, la maturation tissulaire et l'épithélialisation (Dohan et al., 2005 ; Smets et al., 2012 ; sadari et al., : 2007ostvar et al ,2015).

Au 7^{ème} j, il y a une certaine atténuation du processus inflammatoire et l'ensemble des remaniements observés à ce jour de l'évolution, consacrés principalement dans l'élaboration d'un tissu de granulation. Darré et al., (2014) ont suggéré que la mise en place d'un tissu de granulation mieux élaboré dans le site des lésions cutanées peut améliorer la qualité de la cicatrisation.

Au 14^{ème} jour, notre examen histopathologique a révélé une synthèse accrue du collagène et un début de condensation de ce dernier dans les sites des plaies traitées par PRP. Également, un nombre important de fibroblastes a été observé.

Les résultats de l'examen histopathologique réalisé le 21^{ème} et le 28^{ème} jour ont révélés des repères de guérison beaucoup plus marqués dans les plaies traitées par le PRP en comparaison avec les autres groupes. Concernant la réapparition des follicules pileux, nos résultats sont en concordance avec ceux établis par Ferdousy et al., (2013), qui ont déclaré dans une étude similaire réalisée chez la chèvre, l'importance du PRP comme un traitement des plaies cutanées, ainsi qu'il peut stimuler la réapparition des follicules pileux. L'équipe de Miao et al., (2013), ont suggéré que les facteurs de croissance déjà évoqués pouvant induire la

reconstitution des follicules pileux, mais les épreuves exactes sur son efficacité sont très limitées.

4. Etude des plaies d'excision

4.1.Aspects macroscopiques

L'examen macroscopique des différentes plaies d'excision de la figure 45 permet d'évoquer les constatations suivantes (figure 43)

- Trois jours après la réalisation des plaies, la totalité des plaies révèlent une coloration rouge avec une tuméfaction importante et aucun changement n'a été observé suite à l'administration du PRP durant cette étape. Nous pouvons dire que cette phase, est marquée par un processus inflammatoire assez prononcé.
- l'évaluation macroscopique du 07^{ème} jour post-chirurgicale révèle qu'un tissu de granulation est mis en place au sein des plaies traitée par le PRP avec contraction remarquable des berges des plaies, marquant ainsi une épithélialisation partielle.
- Au 014^{ème} jour, le processus inflammatoire est atténué pour la totalité des plaies avec chute spontanée de la croûte surtout pour les plaies traitées par PRP et asiaticoside.
- Au 21^{ème} jour, accentuation de la contraction, et raccourcissement considérable de la majorité des plaies surtout celles traitées par le PRP. Nous notons également au sein des ces plaies que l'apparition de fibres de laine est très importante parfois même elle cache totalement le lit de la plaie.
- Au 28^{ème}, nous observons un tissu cicatriciel bien organisé avec épithélialisation correcte et fermeture complète pour les plaies traitées par PRP. Nous observons également la réapparition de la laine au niveau des sites traités par le PRP. En outre, à ce stade de l'évolution de guérison, aucune complication ou apparition d'un tissu exubérant n'a été observée.

Le suivi macroscopique comparé de nos plaies traitées par les divers traitements, a révélé que l'administration insitu du PRP est dotée d'un certain pouvoir biologique sur l'évolution globale du processus de cicatrisation.

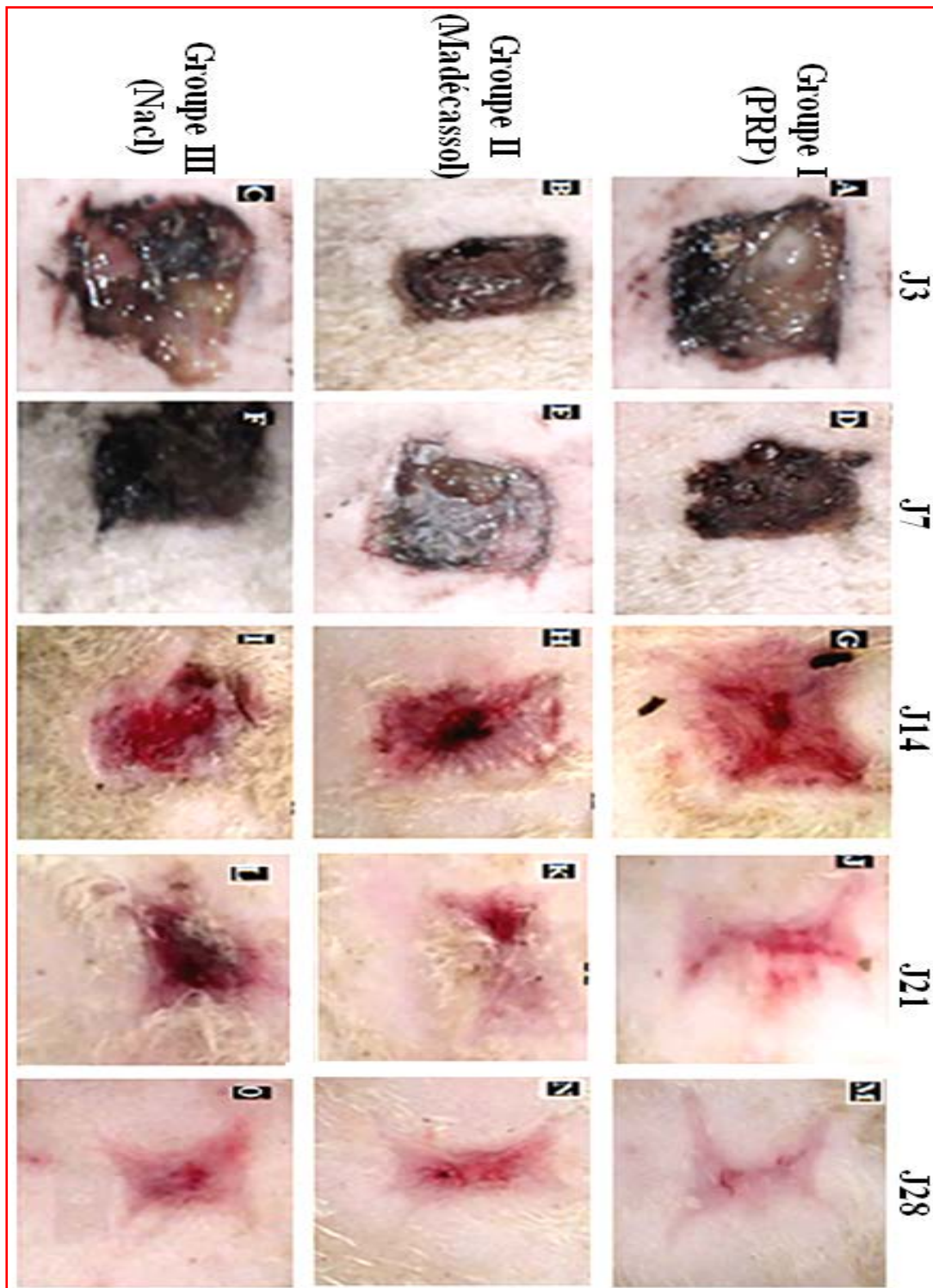


Figure 43 : Aspect macroscopiques de la cicatrisation.

(A-C) : plaies au 03^{ème} jour de cicatrisation, (D-F) : plaies au 07^{ème} j de cicatrisation, (G-I) : plaies au 14^{ème} j de cicatrisation, (J-L) plaies au 21^{ème} j de cicatrisation, (M-O) plaies au 28^{ème} jour de cicatrisation, (A-M) : plaies traitées par le PRP, (B-N) : Plaies traitées par Madécassol, (C-O) : Plaies témoins, traitées par la solution saline.

Dans notre étude, l'inspection des sites d'excision de la peau pendant les premiers jours n'a révélée aucune complication ou signes apparents d'infection. Ceci pourrait être dû à la bonne conduite des plaies, ainsi au nombre réduit des animaux utilisés. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés de nombreuses études. Smets *et al*, (2012) ont suggérés que la nature biologique du PRP pourrait affecter considérablement le processus de cicatrisation surtout lorsque il s'agit d'un PRP préparé par un régime unique de centrifugation. Ce dernier peut contenir des quantités variables des cellules de la lignée blanche, responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire par libération des facteurs pro-inflammatoires (Kaux et al., 2010). En effet, les résultats obtenus à partir de cette étude, confirment que notre PRP était pratiquement exempt de toutes cellules de la lignée blanche. D'après Kaux et al., (2014), le recours à un régime de double centrifugation est incontournable, car cette méthode permet d'éviter également les radicaux libres issus des globules rouges résiduels, pouvant ainsi créer des foyers infectieux nuisibles pour les structures tissulaires. En outre, concernant le nombre des plaquettes obtenus au moyen de ce protocole modifié, notre résultat se situe dans de très bonnes limites de concentration établies par Whitman et al., (1997) et par Arora et al., (2009).

Ces auteurs, ont déclaré que la concentration idéale en plaquettes pour qu'un PRP présente des propriétés de stimulation, serait de 2 à 3 fois plus élevée. Concernant le choix de l'anticoagulant, les observations répétées des différents frottis réalisés, ont confirmées l'efficacité de dextrose lors de la préparation du PRP chez les ovins. Lei et al., (2009) ont rapporté que le dextrose était l'anticoagulant approprié pour la production de PRP, et la qualité de ce dernier était étroitement liée au type d'anticoagulants utilisé.

4.2.Suivi morphométrique : Etude de variation du pourcentage moyen de contraction des plaies

4.2.1. Présentation des données

Les différents résultats obtenus, concernant les variations de pourcentage moyen de la réduction des surfaces des plaies sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 10 : Variation du pourcentage moyen de la réduction de la surface des plaies.

Jour d'observation	Groupe	Moyenne $\pm$ SD(%)	N	Intervalle de confiance à		F	Valeur de
				95 % pour la moyenne			P
				Borne inferieure	Borne supérieure		p < 0,05(*) p < 0,01(**)
J3	I	21,86 $\pm$ 3,70	12	12,65	31,06	0,764	0,506
	II	17,95 $\pm$ 4,19	12	7,52	28,38		
	III	20,78 $\pm$ 4,07	10	10,66	30,90		
J7	I	34,93 $\pm$ 6.11*	12	25,20	44,.65	4,001	0,057
	II	24,43 $\pm$ 2.96 *	12	20,14	28,71		
	III	23,64 $\pm$ 8,63*	10	9,90	37,37		
J14	I	68,80 $\pm$ 4.64**	12	57,26	80,33	13,73	0,004
	II	47,66 $\pm$ 5,09**	12	39,55	55,77		
	III	42,90 $\pm$ 9.38**	10	19,58	66,22		
J21	I	79.83 $\pm$ 1,45	12	76,22	83,43	2,935	0,119
	II	78,55 $\pm$ 3,78	12	75,53	84,57		
	III	73,71 $\pm$ 3,80	10	94,25	83,16		
J28	I	91,90 $\pm$ 1.63	12	87,85	95,95	0,345	0,718
	II	87,55 $\pm$ 9,78	12	71,97	103,12		
	III	87,17 $\pm$ 8,79	10	73,18	101,16		

Groupe I : plaies traitées à l'aide du PRP, **Groupe II** : plaies traitées par Madécassol, **Groupe III**: plaies traitées par une solution saline. Les moyennes suivies par étoiles sont significativement différentes (ANOVA : test LSD) au seuil de signification $\alpha = 5\%$. (* : p < 0,05 ; différence significative, ** : p < 0,01 ; différence hautement significative).

Les résultats, représentés par la figure 44, ont montrés un progrès de contraction des plaies au fil de temps, chez tous les animaux. Ce progrès, est surtout remarquable au niveau des plaies d'animaux du groupe I. A rang égal, l'examen attentif des résultats répertoriés dans le tableau-9 a révélé des différences significatives entre les différents groupes d'animaux de l'étude. Après une semaine post-chirurgicale, le taux moyen de contraction des plaies du

groupe (I) était statistiquement significatif ($p < 0,05$) en comparaison avec ceux des groupes (II) et (III). Nous notons que le pourcentage moyen de contraction dans le groupe des animaux traité par PRP était de $(34,93 \pm 6,11)$, alors qu'il est de $(24,43 \pm 2,96)$ et $(23,64 \pm 8,63)$ dans le groupe des animaux traitées par madécassol et de la solution saline respectivement. Deux semaines après la réalisation des plaies, la différence est hautement significative ($p < 0,01$) entre les différents groupes. Le pourcentage moyen de contraction des plaies chez les animaux du groupe I traités par le PRP était de $(68,80 \pm 4,64)$ contre $(47,66 \pm 5,09)$ et $(42,90 \pm 9,38)$ dans les groupes II et III, traitées par madécassol et de la solution saline respectivement.

Au-delà du 21^{ème} et jusqu'au 28^{ème} jour, aucune différence significative n'a été enregistrée entre les différents groupes. Cependant, toutes les plaies se contractent à des vitesses légèrement différentes, un peu plus rapide pour les plaies traitées par le PRP. A la fin de notre expérimentation (J28), la majorité des plaies se ferment quasi totalement et guéries complètement.

L'analyse et l'interprétation des courbes de la figure 44 permettent de constater que l'effet du PRP sur la cicatrisation présente des variations différentes d'une période à une autre et même au sein des groupes. Néanmoins, l'examen global de l'ensemble de ces courbes ascendantes, permet de supposer que le processus de cicatrisation chez les ovins se déroule en trois phases. Ce processus permet d'abord de remplir immédiatement la plaie suivi d'une réépithélialisation et d'un rétablissement de la barrière cutanée (Yamaguchi et Yoshikawa, 2001).

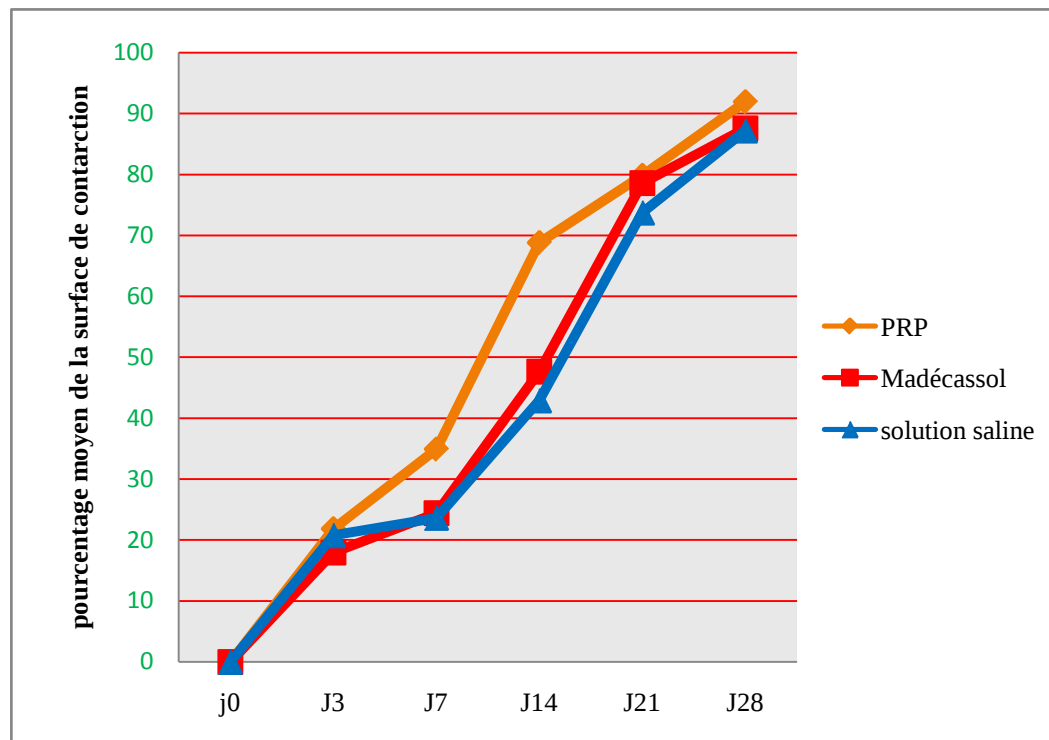


Figure 44 : Variations du pourcentage de contraction de la surface des plaies en fonction des différents traitements administrés.

- Une première phase qui est marquée par un processus inflammatoire étalée entre J0 – J7 qui montre des courbes de contraction identiques pour tous les groupes surtout durant les trois premiers jours, nous notons également qu'un léger accroissement de la courbe enregistré en faveur des plaies traitées par le PRP durant une période étalée entre le 03^{ème} et le 07^{ème} jour. Ceci pourrait être dû d'après Alishahi et al., (2014) aux facteurs de croissance présente dans cette préparation (PRP).
- Une phase de réparation entre J7 – J14, cette étape de l'évolution du processus cicatriciel est préoccupée par l'élaboration d'un tissu de granulation, future maquette de tissu fibrineux. Notre expérimentation montre que cette phase présente la pente la plus important en faveur des plaies traitées par le PRP.
- Une phase de maturation à partir du 21^{ème} jour jusqu'à la fin de notre protocole expérimentale. Au cours de cette phase, nous notons que les différentes courbes sont parallèles et presque identiques. Une atténuation remarquable de la pente de la courbe de contraction est enregistrée en faveur des plaies traitées par le madécassol, et le PRP.

4.2.2. Discussion

L'étude morphométrique de variation de la contraction des plaies a montré qu'il y a un progrès remarquable du processus de cicatrisation cutanée chez les animaux du groupe I traité par le PRP en comparaison avec les autres traitements. Au 07^{ème} jour de l'évolution, une différence significative nette a été observée entre les plaies du groupe I et les plaies des groupes II et III. Cette différence devient flagrante et hautement significative au bout du 14^{ème} jour de l'évolution de cicatrisation. Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par certains auteurs. En effet, Al-bayati et al., (2013) confirment que l'infiltration sous cutanée du PRP accélère la contraction des plaies chez la chèvre à partir de la 01^{ère} semaine post chirurgicale. Et du même, Ostvar et al., (2015) ont rapportés que l'utilisation du PRP lors du traitement des plaies cutanées chez le lapin, accélère la vitesse de contraction de ces dernières, durant une période de deux semaines. Certains auteurs (Anitua et al., 1999; Swaim et al., 2001) ont déclarés que cette accélération de contraction, est liée directement aux effets potentiels des agents thérapeutiques présentés par des facteurs de croissances accumulés dans les granules- α plaquettaires. Parmi ces facteurs, le facteur endothelial vasculaire (VEGF) qui favorise l'angiogenèse, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance transformant β (TGF- β). Ces facteurs contribuent notamment dans la migration des leucocytes au site de la plaie (Golebiewska et al., 2015; Jae-Min et al., 2015), ainsi que à la prolifération des fibroblastes en myofibroblastes et à la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire. D'autres auteurs rapportent que le progrès de contraction est lié à la fois aux myofibroblastes et aux fibroblastes qui peuvent organiser le tissu conjonctif avec consolidation précoce du collagène en tirant la peau vers l'intérieur (Swaim et al., 2001 ; Darré et al., 2014).

4.3.Suivi histopathologique

4.3.1. Présentation des données et discussion

L'examen histopathologique et l'évaluation semi-quantitative (tableau 11) ont montré des différences dans la progression de la cicatrisation dans les trois groupes de l'étude.

Tableau 11 : Résultats de l'évaluation histopathologique semi-quantitative.

Jour	Groupe	Épithélialisation	PMNL	Macrophages	Fibroblastes	Neo-angiogenèse	Neo-collagène
J3	I	0,9±0,73	2,4±0,48*	1,3±0,48	1,6±0,51	1,4±0,51	0,7±0,48
	II	0,5±0,52	1,9±0,73	1,4±0,51	1,6±0,51	1,4±0,51	0,4±0,51
	III	0,3±0,48	1,5±0,7	1,5±0,48	1,4±0,51	1,2±0,42	0,3±0,48
J7	I	2,2±0,78	0,9±0,73	1,2±0,42*	2,1±0,73*	1,63±0,5	1,6±0,51
	II	2,1±0,73	0,8±0,63	1,5±0,51	1,7±0,48	1,5±0,52	1,4±0,51
	III	1,8±0,91	0,7±0,67	1,6±0,91	1,6±0,51	1,3±0,48	1,3±0,48
J14	I	2,8±0,42	0,6±0,52	1,0±0,52	2,7±0,48*	2,6±0,51	2,7±0,48
	II	2,6±0,51	0,5±0,52	1,2±0,51	2,5±0,52	2,3±0,48	2,5±0,52
	III	2,4±0,51	0,3±0,48	1,3±0,61	2,4±0,51	2,1±0,73	2,4±0,51
J21	I	3,0±0*	0,5±0,52	0,5±0,52	3,0±0	3,0±0	2,9±0,31
	II	2,8±0,31	0,3±0,48	0,8±0,73	2,8±0,42	2,8±0,31	2,9±0,31
	III	2,4±0,52	0,1±0,31	1,0±0,73	2,5±0,52	2,4±0,52	2,6±0,53
J 28	I	3±0	0,0±0	0,0±0	1,9±0,73	1,8±0,91	3,0±0
	II	2,9±0,31	0,0±0	0,3±0,94	1,8±0,91	2,0±1,15	3,0±0
	III	2,7±0,48	0,1±0,31	0,6±0,52	1,9±0,73	2,2±0,78	2,8±0,31

Groupe I = Animaux traités avec PRP, Groupe II = Animaux traités avec Madécassol à 2%, Groupe III = Animaux traités avec une solution saline (NaCl 9%), PMNL = polymorphe nucléaire leucocytes.* = indique une différence significative (p <0,05).

Au 3^{ème} jour de l'évolution de la cicatrisation, l'épithélialisation a été observée sur la paroi interne du bord libre des plaies traitées par le PRP (Figure 45A), alors que dans les plaies du groupe traitées par le madécassol, elle est moins importante (Figure 45B). Aucune épithélialisation n'a été observée au sein des plaies traitées par la solution saline, avec des plaies semblaient couvertes de coagulum sanguin (Figure. 45C).

Concernant l'évaluation histopathologique semi-quantitative de l'épithélialisation, nos résultats ont révélés une différence significative (p <0,05) enregistrée au 21^{ème} jour de cicatrisation entre le groupe des plaies traités par le PRP et le groupe des plaies témoins : (3,0±0) contre (2,4±0,52) respectivement. En ce qui concerne les cellules inflammatoires (PMNL), notre examen histopathologique a révélé un infiltrat important au niveau des bords des plaies traités par PRP en comparaison avec les plaies des autres groupes (figure 45A). Egalement, l'évaluation semi-quantitative a révélé une différence significative nette (p

<0,05), observée en faveur des PMNL (plaies du groupe I : $2,4 \pm 0,48$, contre les plaies des groupes II et III : $1,9 \pm 0,73$ et $1,5 \pm 0,7$ respectivement). Pour les autres paramètres, aucun changement histopathologique n'était observé, et aucune organisation du collagène nouvellement formé n'était évidente au sein des différents groupes.

Au 7^{ème} jour, l'examen histopathologique révèle une certaine accentuation de l'épithélialisation au niveau des différentes plaies. Les surfaces des plaies traitées par le PRP (Figure 45D), sont totalement recouvertes par un tissu épithélial en comparaison avec les autres plaies témoins (Figures 45E et F).

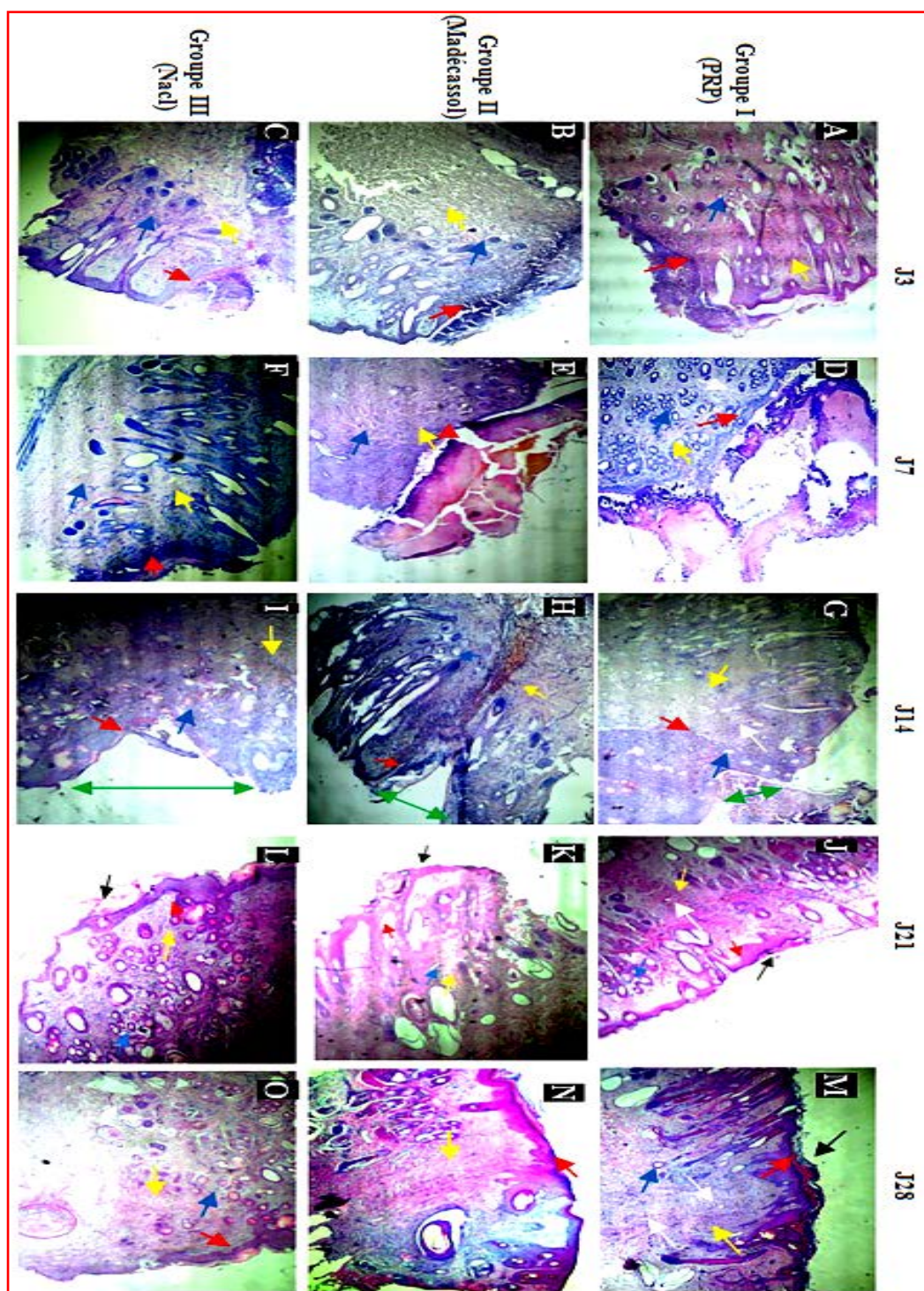


Figure 45 : Aspects histopathologiques des biopsies réalisées à partir des plaies d'excision (H&E, X40).

(Flèche rouge) ré-épithélialisation, (Flèche bleu) néovascularisation, Flèche jaune (réseau de fibrine nouvellement formé), Flèche noir (kératinisation), Flèche verte (site de lésion) et Flèche blanche (follicule pileux).

Aucun contact des bords de la plaie n'étaient observées dans les différents groupes. L'évaluation histopathologique semi-quantitative de l'épithélialisation n'a révélée aucune différence significative. Concernant le collagène, son organisation semblait beaucoup plus dense et organisée au niveau de plaies traitées par le PRP (Figure 45D) en comparaison avec les autres plaies. Pour les autres paramètres, l'examen histopathologique a révélé des variations importantes des fibroblastes, des neutrophiles et des macrophages (Figure 45). A rang égal, nous enregistrerons une différence significative en faveur des fibroblastes (plaies des animaux du groupe I : $2,1 \pm 0,73$ contre les plaies des animaux des groupe II et III : $1,7 \pm 0,48$ et $1,6 \pm 0,51$ respectivement). Une autre différence significative en faveur des macrophages a été également enregistrées (plaies du groupe I : $1,2 \pm 0,42$ en comparaison avec les plaies du groupe III : $1,6 \pm 0,91$).

Au 14^{ème} jour, l'examen histopathologique a montré un changement cardinal de cicatrisation, caractérisé par l'union des berges de plaie dans les différents groupes (figure 45: G-I), elle est presque achevée avec un tissu de granulation mieux élaboré dans les plaies traitées par le PRP (figure 47G). En effet, l'étude de la variation des fibroblastes a révélée une différence significative nette ($p < 0,05$) en faveur des plaies du groupe I : $2,7 \pm 0,48$ contre les plaies des animaux du groupe III : $2,4 \pm 0,51$.

Au 21^{ème} jour, une épithélialisation complète a été observée dans les plaies traitées par le PRP, avec des tissus totalement réunis. Les nouveaux faisceaux de collagène remplis d'une manière dense la jonction de la plaie dans les plaies traité par le PRP (figure 47J). Continuité des remaniements de l'épithélialisation et de la réorganisation du collagène dans les autres groupes (Figure 45K et L). L'évaluation semi quantitative des scores histopathologiques a révélée une différence hautement significative en faveur des fibroblastes des plaies traitées par PRP : $3,0 \pm 0$ en comparaison avec les plaies du groupe III : $2,4 \pm 0,52$).

Au 28^{ème} jour, l'examen histopathologique a montré, la guérison des plaies dans les différents groupes. Une parfaite cicatrisation a été observée dans les plaies du groupe I, caractérisée par une réorganisation du collagène avec kératinisation de la peau et réapparition des follicules pileux dans la ligne de la plaie (Figure 45M). Une mauvaise cicatrisation a été observée dans les autres groupes (aspect d'une fibrose dans les plaies traitées par madécassol, une mauvaise cicatrisation retardée dans les plaies témoins). Pour les autres paramètres, notre étude a

montrée que le nombre des capillaires nouvellement formés, augmente considérablement durant les deux premières semaines qui suivent la réalisation des plaies, et qu'il ne cesse à abaisser qu'après la 03^{ème} semaine de l'évolution. A contrario, concernant le collagène nouvellement formé, sa proportion était en perpétuel croissance.

L'évaluation semi-quantitative, des scores histopathologiques obtenus, a révélée des différences significatives pour un certains nombre de paramètre de cicatrisation. En effet, cette étude confirme que l'administration locale du PRP permettait une bonne réépithélialisation (figure 45M), avec une néovascularisation plus précoce, suivi d'une réorganisation collagénique plus élaborée. Alishahi et al., (2014) ont rapportés que l'infiltration cutanée du PRP, accélère la guérison de plaies chez le chien et permet ainsi d'avoir un tissu de granulation plus élaboré.

Au 03^{ème} jour de cicatrisation, nos résultats sont encourageants, témoignant l'efficacité biologique du PRP. Ce dernier est capable d'accélérer potentiellement la cicatrisation par un recrutement massif des polymorpho-nucléaires (figure 46A). En outre, cette nouvelle technique pourrait également augmenter le taux de l'angiogenèse. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans de nombreuses études, Ostvar et al.,(2015) rapporte que l'usage du PRP accroît le taux de nouvelles boucles des capillaires observées dans les plaies cutanées chez le lapin. Darré et al., (2014) ont suggérés que cette néovascularisation lors des plaies cutanées favorise l'arrivée des cellules inflammatoires ayant un rôle de détersion du foyer lésionnel en association avec les macrophages (leal et al., 2015). Cependant, les observations histopathologiques répétées des biopsies effectuées à partir des sites des plaies traitées par le PRP, ont révélé que le nombre des macrophages était moins important en comparaison avec les plaies des autres groupes (figure 46C). Ceci, confirme le constat déjà établi par Kaux et al, (2014) qui ont suggéré que l'utilisation du PRP par infiltration tendineuse délimite l'inflammation chronique, par une réduction du nombre des macrophages.

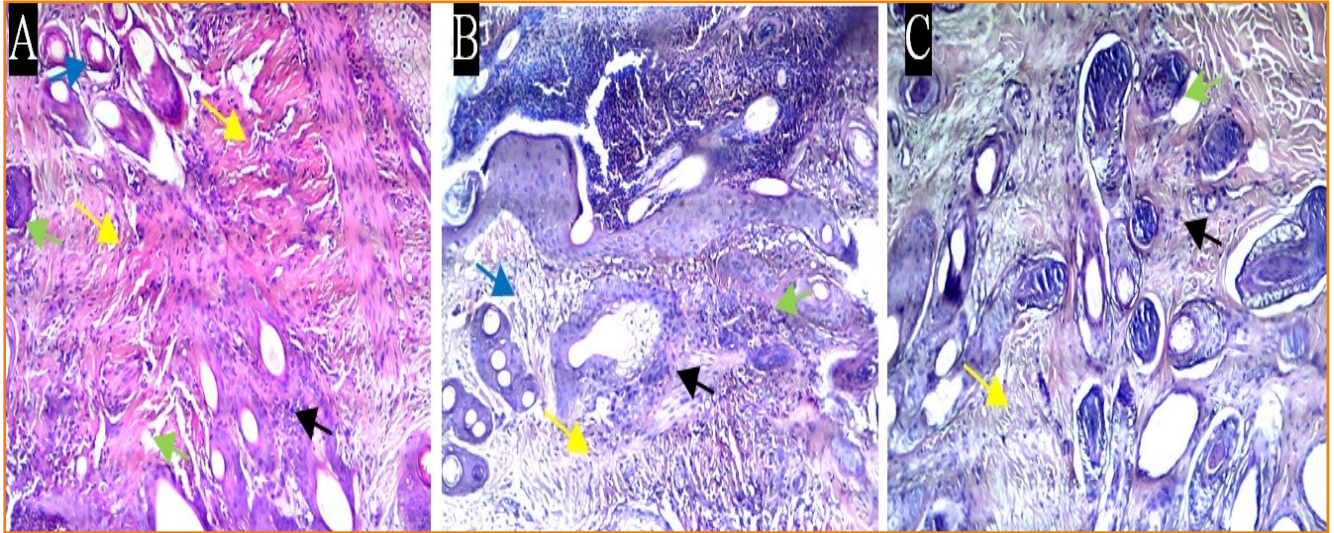


Figure 46: Coupes histologiques au niveau des plaies au 3^{ème} jour de cicatrisation (H&E, X100).

(Flèche bleu) néovascularisation, Flèche jaune (réseau de fibrine nouvellement formé), Flèche noire (polymorphe nucléaire leucocytes) et Flèche verte (macrophage). (A) : Section d'une plaie traitée par le PRP. (B) tissu représentatif des plaies traitées par madécassol, infiltra inflammatoire modéré, un réseau lâche de collagène moins abondant avec un nombre peu important des macrophages. (C) Tissu provenant des plaies traitées par la solution saline, présente un nombre très réduit en cellules inflammatoires et nombre important en macrophages.

Concernant l'étude de variation des fibroblastes, nos résultats ont révélé des différences significatives enregistrés au 07^{ème} et 14^{ème} jour de cicatrisation, en faveur de plaies des animaux du groupe I.

Au 7^{ème} jour de l'évolution de la cicatrisation, un nombre important de fibroblastes, et des paquets du collagène nouvellement formées sont observés dans les plaies traitées par le PRP (Figure 47-A). Cependant les faisceaux de collagène montrent des fibres qui restent clairsemées, et qu'ils ne semblent pas remplir le site de la plaie. Dans les autres groupes, le collagène est moins abondant d'aspect irrégulier avec persistance des macrophages.

Au 14^{ème} jour, de nombreux fibroblastes observés dans les plaies traitées par le PRP (Figure 47-D), qui s'entassent entre des faisceaux condensés de collagène. La néovascularisation est importante avec réapparition des follicules pileux. Dans les autres groupes, un réseau lâche de collagène non organisé a été observé (Figure 47 : E-F).

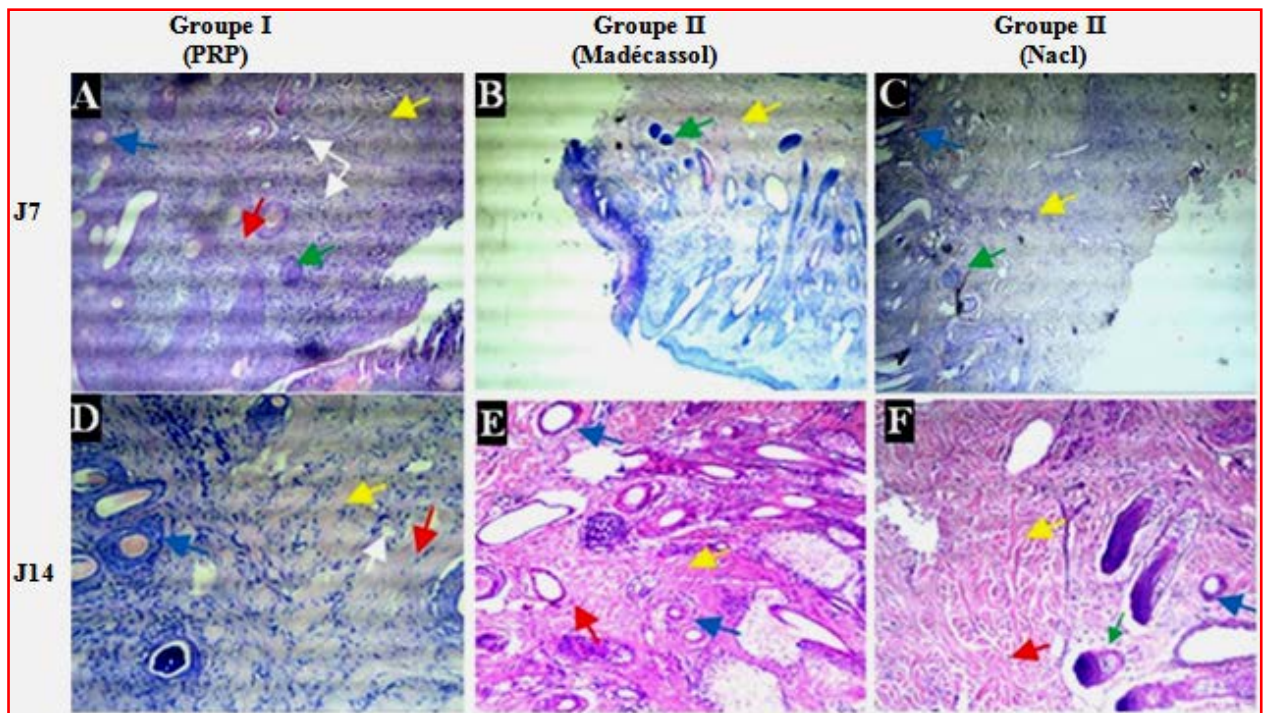


Figure 47: Coupes histologiques au niveau des plaies au 7^{ème} et 14^{ème} jour (H&E, X100).

(A-C) : 7 jours après réalisation des plaies, (D-F) : 14 jours après réalisation des plaies. Flèche jaune (Réseau de fibrine nouvellement formé), Flèche rouge (Fibroblastes), Flèche bleu (Néovascularisation), Flèche blanche (Follicule pileux), Flèche noire (PMNL) et Flèche verte (macrophage).

Le résultat de la présente étude, pourrait être expliqué d'après certains auteurs (Arora et al., 2009 ; Whitman et al., 1997), aux effets associés de certains facteurs de croissance du PRP pouvant favoriser la différenciation des fibroblastes et par conséquent la formation du collagène. En outre, l'observation minutieuse des différents aspects histopathologiques de la figure 47, nous a permis de penser que cette préparation (PRP) pourra contribuer d'une manière efficace dans le processus de remodelage et de remaniement de collage. En effet Kaux et al., (2014) ont rapporté dans une autre étude similaire réalisée chez l'homme, que le taux de collagène dans le groupe traité par infiltration tendineuse de PRP, augmente considérablement vers le 05^{ème} jour de cicatrisation. Cependant, le mécanisme exact de l'action du PRP dans le remodelage du collagène est encore mal élucidé. Ibrahim et al., (2015) ont suggéré que le remodelage de collagène est susceptible d'être affecté par des métalloprotéinases, principalement MMP-1 et MMP-3 protéine pouvant digérer les divers composants structurels de la matrice extracellulaire. En outre, l'induction de MMP-1 dans la peau peut faciliter l'élimination des fragments de collagène endommagés dans le tissu de la

matrice dermique, ainsi fournir une meilleure base pour le dépôt de nouveaux collagène nécessaire pour l'amélioration de plaies.

Enfin, concernant la reconstruction des follicules pileux, nos résultats, ont montré qu'il y a une certaine reconstitution des cellules de la papille dermiques, observées dans la ligne de cicatrisation des plaies traitées par le PRP. Nos résultats sont en concordance avec ceux établis par Ferdousy et al.,(2013). Ces auteurs ont rapporté dans une étude similaire réalisée chez la chèvre, que l'injection intradermique du PRP dans des plaies cutanées a amélioré considérablement l'aspect des plaies avec réapparition des follicules pileux. Ceci, pourrait être expliqué d'après Wang et al., (2017) par les effets potentiels des facteurs de croissance du PRP, qui augmente considérablement le taux de PAL (phosphatase alcaline) et versican (protéoglycane sulfate de chondroïtine). Ces derniers pouvant promouvoir la prolifération de HHDPCs (Papilles dermiques de cheveux humains.). En outre, l'équipe de Miao et al., (2013), ont suggéré que les facteurs de croissances déjà évoqué pouvant induire la reconstitution des follicules pileux, mais les preuves exactes sur son efficacité sont limitées.

RÉFÉRENCES

1. Abrams G.D., Frank R.M., Fortier L.A., Cole B.J. (2013). Platelet-rich Plasma for Articular Cartilage Repair. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Tech.*, 21(4) :213-219.
2. Aghaloo, T.L., Moy, P.K. et Freymiller, (2002). Investigations of platelet rich plasma in rabbit cranial defects. A pilot study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 60(10):1176–1181.
3. Alaaeddine N, Di Battista JA, Pelletier JP, Kiansa K, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. 1999. Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced prostaglandin E2 production by the anti-inflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signalling pathways. *Arthritis Rheum* 42:710-718.
4. AL-Bayati, A.H., Al-Asadi R.N., Mahdi A.K., Al-Falahi, N.H. (2013). Effects of Autologous Platelets Rich Plasma on Full-thickness Cutaneous Wounds Healing in Goats. *Int J Anim Vet Adv.*, 5(6): 233-239.
5. Alishahi, K.M., Mofidpoor, h. , Alishahi, M.A.K. (2014). Histopathological evaluation of the effect of platelet-rich fibrin on canine cutaneous incisional wound healing. *IJAVMS.* , 8(5): 134-141.
6. Alves, R., Grimalt M.D., Ramon, M.D. (2018). Platelet-Rich Plasma in Combination With 5% Minoxidil Topical Solution and 1 mg Oral Finasteride for the Treatment of Androgenetic Alopecia: A Randomized Placebo-Controlled, Double-Blind, Half-Head Study. *Dermatologic Surgery*. 44(1) : 126-130.
7. Alzhaxina, N., Begembekov, K. et Kulmanova, G. (2014). Thickness of the skin and its layers at Degeress sheep of variuos stripes *Research for Rural Development*. (1):118-123.
8. Amanda, G.M.P., José F.S.D., Rodrigues A.A., Luzo, A.C.M., Belangero, W.D. et Santana, M.H.A. (2014). Relevant Aspects of Centrifugation Step in the Preparation of Platelet-Rich Plasma. *Hindawi Publishing Corporation ISRN Hematology*. 8
9. Anderson, D. (1996). Wound management in small animal practice. In *practice*, 115-128.
10. Anitua, E. (1999). Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 14:529-535.

11. Arnold, M. et Barbul, A. (2006). Nutrition and wound healing. *Plast Reconstr Surg* 117(7):42-58.
12. Arora, N.S., Ramanayake, T., Ren, Y.F. and Romanos, G.E. (2009). Platelet-rich plasma: a literature review. *Implant Dent.*, 18 : 303 – 310
13. Atiyeh, B.S., Ioannich, J., Al-Amm, C.A. et El-Musa, K.A.(2002). Management of acute and chronic open wounds: the importance of moist environment in optimal wound healing. *Current Pharm Biotechnol* (3):179-95.
14. Bambace, N.M., et Holmes, C.E. (2011). The platelet contribution to cancer progression. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 9(2):237–249.
15. Belloc, C., Lu, H., Soria, C., Fridman, R., Legrand, Y. et Menashi, S. (1995). The effects of platelets on invasiveness and protease production of human mammary tumor cells. *International Journal of Cancer*. 60(3): 413–417.
16. BERTHE, T. (1983).Contribution à l'étude du traitement des plaies à l'aide d'un hydrogel d'amidon Th. Doct. Vet. Toulouse.
17. Bevelander. G (1973). *Eléments d'Histologie*. 6^{ème} édition. Maloine. 145-153.
18. Bishop, A. (2008). Role of oxygen in wound healing. *J Wound Care* 17:399-402.
19. Bjarnsholt, T., Kirketerp-Moller, K., Jensen, P., Kit, M., Krogfelt, K., Phipps, R, et al. (2008). Why chronic wounds won't heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen* 1:2-10.
20. Blache,D., (1992). Structure and function of blood platelets. *Arch Int Biochim Biophys*.100 (A):17-24
21. Blair, P., laumenhaft, R. F. (2009). Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews*.23 :177– 189.
22. Boneu,B., Cazenave J.P. (1997). introduction à l'étude de l'hémostase et de la Thrombose. 2^{ème} édition. Alinéa.
23. Brass, L. F., Hoxie, J. A., Manning, D. R. (1993). Signaling through G proteins and G protein-coupled receptors during platelet activation. *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 70(1): 217– 223.
24. Brem, H., Tomic-Canic, M. (2007). Cellular and molecular basis of woundhealing in diabetes. *J Clin Invest* 117:1219-1222.
25. Briggs, C., Harrison, P., Machin, S. J. (2007). Continuing developments with the automated platelet count. *International Journal of Laboratory Hematology*, 29(2): 77–91.

26. Brown, G.L. (1988). Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF. *Annals of Surgery*; 208: 788-794.
27. Caerter, C.A., Jolly, D.G., Worden S.C., Hendren, D. et Kane, C. (2003). Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Experimental and Molecular Pathology*. 74: 244-25.
28. Campos, A.C., Groth, A.K. et Branco, A.B.s (2008). Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11:281-288.
29. Carlotti, D., Mathet, J. (1994). Anatomie de la peau. *Pratique Médicale et Chirurgicale des Animaux de Compagnie*.
30. Carneiro, M.O., C. H. Barbieri¹and J. B. Neto. (2013). Platelet-Rich Plasma Gel promotes regeneration of articular cartilage in knees of sheeps. *Acta Ortop Bras*, 2013; 21(2): 80-6.
31. Chevrement, M (1975). Notions de cytologie et histologie, tome II, édition DESOER.
32. Chicharro-Alcántara D., Rubio-Zaragoza M., Damiá-Giménez E., Carrillo-Poveda J.M., Cuervo-Serrato B., Peláez-Gorrea P., Sopena-Juncosa J.J. (2018). Platelet Rich Plasma: New Insights for Cutaneous Wound Healing Management. *J. Funct. Biomater.*, 9(10) :1-20.I
33. Coujard. R, J. Poirier, J. Racadot (1980). *Précis d’Histologie Humaine*. Masson. P : 668-691.
34. Dadoune J.P, Hajiisky P, Siffroi J.P etVebdrely, E. (2000). *Histologie. Médecine-science Flammarion*. 2^{ème} édition. P : 267-277.
35. Darby, I., Skalli, O., Gabbiani, G.,Alpha-smooth. (1990). muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest*. 63:21 - 9.
36. Darré, T., Metowogo, K., Lawson-Evi, P., Eklu-Gadegbeku ,K., Kodjo, A. A., Napo-Koura, G., Gbeassor, M. (2014). Effet topique de l’extrait topique de l’extrait hydro éthanolique de l’acacia nilotica sur la cictrisation cutanées des brulures de second degré *Eur Sci*. 10(30): 212-221.
37. Deborah, Z., Vimla, B., Pauzie, N., Tager, A., Stampfer, M., Sager, R. (2018) Expression of Growth Factors and Oncogenes in Normal and Tumor-derived Human Mammary Epithelial Cells. *Cancer research*. 48(24): 7041-7047.
38. Delverdier, M. (2002). Aspects morphologiques et chronologiques de la reaction inflammatoire.Cours d’anatomie pathologie générale. ENVT

39. Diegelmann, R.F. et Evans, M.C. (2004). Wound Healing: An Overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*. 9: 283-289.
40. Dohan, S., Dohan, A., Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M.O. et Dohan, D. (2005). Autologous platelet concentrates for topical use. *EMCODO*. , 1: 141-180.
41. Dugrillon, A., H. Eichler, Kern, S. Klüter, H. (2002). Autologous concentrated platelet rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 31(6):615-619.
42. Ehrenfest, D.M.D., Rasmusson, L. et Albrektsson, T. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*. 27(3): 158–167.
43. Elgazzar, R.F., Mutabgani M.A., Abdalaal S. et Sadakah A.A. (2008). Platelet-Rich Plasma may enhance peripheral nerve regeneration after cyanoacrylate reanastomosis: a randomized blind study on rats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 37, (8):748-755
44. Eppley, B.L., Woodell, J.E., Higgins, J. (2004). Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implication for wound healing. *Plast Reconstr Surg*; 114: 1502-1508.
45. Everts, P.A., Overdevest, E. P., Jakimowicz, J. J. et al., (2007). The use of autologous platelet-leukocyte gels to enhance the healing process in surgery, a review. *Surgical Endoscopy and Other Interventional Techniques* 21(11):2063–2068.
46. Everts, P.A.M., Knape, J.T.A., Weibrich, G., Schönberger, J.P.A. Hoffmann, J., Overdevest, E. P., Henk, B., Van, A. (2006). Platelet-Rich Plasma and Platelet Gel: A Review. *The Journal of The American Society of Extra-Corporeal Technology*. 38:174–187
47. Fawcett, W.F., (2002). *Histologie*. Maloine. P :261-277.
48. Feldman, B.F., J.G. Zinkl, Jain, N.C. (2000). *Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins. P: 1076.
49. Ferdousy, N.F., Rahman, M.M., Sattwikesh, P. and Khan M.A.H.N.A. (2013). Role of platelet rich plasma gel in the wound healing of black Bengal goat. *IOSR-JAVS*., 6(5):14-21.
50. Ferguson, M.W.J., O’Kane, S. (2004). Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B: Biological Sciences*, 359, 839–850.

51. Flanagan, M., BSc M.A., , Dip, N., Cert, E.d., ONC, RGN, (2000). The physiology of wound healing JOURNAL OF WOUND CARE JUNE, VOL 9, NO 6,
52. Forriol, F., Longo, U.G., Concejo, C., Ripalda, P., Maffulli, N., Denaro, V. (2009). Platelet-rich plasma, rhOP-1® (rhBMP-7) and frozen rib allograft for the reconstruction of bony mandibular defects in sheep. A pilot experimental study / Injury, Int. J. Care Injured 40: 44–49
53. Fowler, D. (1993) Principales of Wound healing. In Harrari J. Surgical complication and Wound healing in the small animal practice. Wb Saundres p:1-32.
54. Francis, B., Quinn, J.R., McIntire, J. B., Pine, H. et Quinn, M. S.t. (2014). Wound Healing – Scar Minimization. Didactic Day Presentation, Department of Otolaryngology The University of Texas Medical Branch (UTMB Health).
55. Fresno, L., Fondevila, D., Bambo, O., Chacaltana,A., Félix, G., Andaluz, A.(2009). Effects of platelet-rich plasma on intestinal wound healing in pigs. The Veterinary Journal. 185: 322–327.
56. Garrett, B. (1998). Re-epithelialisation. J Wound Care; 7:(7): 358-359.
57. Gartner L.P., Hiatt J.L. (2015). Cell biology and Histology. Board review series. (Seventh edition). 243: 14.
58. Gawkrödger, D.J. (2002). Dermatology, An Illustrated Colour Text. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone.
59. Gehring S, Hoerauf H, Laqua H, Kirchner H, Kluter H. Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. (1999).Transfusion.39:144–8
60. Geoffrey, D., Abrams, M.D., Rachel M.F., Lisa, A., Fortier, D.V.M., Brian, J., Cole, (2000). Platelet-rich Plasma for articular cartilage repair. Sports Med Arthrosc Rev 21(4).
61. George Broughton, Rod J Rohrich (2005) : Wounds and scars. SRPS 10, (7):9.
62. George, J.N., (2000). Platelets .Lancet. 355: 1531-1539.
63. Ghoshal, K., Bhattacharyya, M. (2014). Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. Hindawi Publishing Corporation the Scientific World Journal (16).
64. Gillitzer, R. et Goebeler, M. (2001). Chemokines in cutaneous wound healing. J Leukoc Biol., 69(4):513–521.
65. Gilliver, S.C., Ashworth, J.J., Ashcroft, G.S. (2007). The hormonal regulation of cutaneous wound healing. Clin Dermatol 25:56-62.

66. Giuseppe, F., Kon, E. , Tampieri, A., Cabezas-Rodríguez, R., Di Martino,A., Fini, m., Giavaresi, G., Lelli, M., Martínez-Fernández, J., Martini,L., Ramírez-Rico, J., Salamanna, F., Sandri, M., Sprio, M., Marcacci, M. (2014). New Bio-Ceramization Processes Applied to Vegetable Hierarchical Structures for Bone Regeneration: An Experimental Model in Sheep, tissue engineering. Mary Ann Liebert.20: 3-4.
67. Godet G., Canessa R., Arock, M., Baron, J.F., Kieffer, E. , Viars, p. (1995) platelet rich plasma on haemostasis and transfusion requirement in vascular surgery. *Ann Fr Anesth Reanim.* 14 : 265-270
68. Golebiewska, E.M. et Poole A.W. (2015). Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.*29: 153–162.
69. Gosain, A., DiPietro, L.A. (2004). Aging and wound healing. *World J Surg* 28:321-326.
70. Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, Redmer DA, Reynolds LP, Abdullah A, Abdullah K.M. (2003). Wound Healing: the role of growth factors *Drugs Today* 39 (10): 787–800
71. Gregory, C.R. (1999). Wound healing and influencing factors. In Fowler D, Williams J.M Manual of canine and feline wound management. British Small Animal Veterinary Association (Ed.):13-23.
72. Grimalt, R.A.R. (2018). A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification *Skin Appendage Disord.* 4:18–24.
73. Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., et Longaker, M.T. (2008). Wound Repair and Regeneration. *Nature*, 453 : 314-321.
74. Haguenau, F.,Hollmann, K.H., levy, J.P. et Boiron, M.(1963).Etude au microscope électronique des plaquettes sanguines dans les leucémies humaines. *Journal microbiologie.* 2 :529.
75. Harding, K., Cutting, K. (1994). Criteria for identifying wound infection. *J Wound Care;* 3: 4, 198-201. 15.
76. Hardman, M.J. et Ashcroft, G.S. (2008). Estrogen, not intrinsic aging, is the major regulator of delayed human wound healing in the elderly. *Genome Biol* 9:R80.
77. He, D. (2006) Bilan des connaissances actuelles sur la cicatrisation des plaies cutanées chez le chien et le chat. Thèse de doctorat vétérinaire, université Paul Sabatier, Toulouse. P : 230.
78. Heat. J.W, Low J.S, Stevens A, Young B. (2008). Atlas d’Histologie fonctionnelle de Wheater. 2^{ème} édition. De boeck. P : 167-185.

79. Heemskerk, J.W., Bevers, E. M., Lindhout, T. (2002). Platelet activation and blood coagulation. *Thrombosis and Haemostasis*. 88: 186–193.
80. Hernandez-Fernandez, A., R. Vélez, F. Soldado, J.C. Saenz- Rios, I. Barber and M. Aguirre-Canyadell. (2013).Effect of administration of platelet-rich plasma in early phases of distraction osteogenesis: An experimental study in an ovine femur model. *Injury, Int. J. Care Injured* 44: 901–907.
81. Hinz, B. (2007): Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*; 127: 526–537.
82. Hosgood, G. (2003). Wound repair and specific tissue response to injury. In Slatter D textbook of small animal surgery, third edition. Saunders (Ed):66-68.
83. Hunt T.K., Pai, M.P. (1972) .The effect of variant ambient oxygen tensions on wound metabolism and collagen synthesis. *Surg Gynecol Obstet* 135:561.
84. Hunt, T.K. (1980). Disorders of wound healing. *World J Surg* 4:271. 1980.
85. Ibrahim Z.A. I. S., El-Tatawy R.A., El-Samongy M.A., Mohammed Ali D.A. (2015). Comparison between the efficacy and safety of platelet-rich plasma vs. microdermabrasion in the treatment of striae distensae: clinical and histopathological study. *J Cosmet Dermatol.*, 14:336—346.
86. Jacinto, A., Martinez-Arias, A., Martin, P. (2001). Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat Cell Biol*; 3:E117–E123.
87. Jain, S., Harris, J. et Ware, J.(2010). Platelets: linking hemostasis and cancer. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 30:2362–2367,
88. Jie L., Juan, C., Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing *Clinics in Dermatology* 25: 9-18.
89. Johnson D.W, Van, E.P.S., Mudge,C. Wiggins, D.W., Armstrong, K.J.,Hawley, C.M. et al (2005) Randomized, controlled trial of topical exite-site application of honey (medhoney) versus mupirocin for the prevention of catheter-associated infection in hemodialysis patients. *J am Soc Nephrol*.16(5): 1456-1462.
90. Johnston, D.E. (1992): cicatrization des plaies cutanées. *Point vétérinaire*. 24:21-34.
91. Kaufman et al. (1984 the effect of topical hyperalimentation on wound healing rate and granulation tissue formation of experimental deep second degree burns in guinea-pigs burns 10(4): 252-256.
92. Kaux J.F., Drion P., Croisier J.L., Colige, A., Libertiaux, V., Gothot, A., Crielaard, J.M. (2014). Plasma rich in platelets and tendonous lesions. *Rev Med Liege.* , 69: 72-77.

93. Kaux, J.F., Le Goff, C., Renouf, J., Peters, P., Lutteri, L., Gothot, A., Albert, A., Crielaard, J.M. (2010) Comparison of the platelet concentrations obtained in platelet rich plasma (PRP) between the GPS II and GPS III systems. *Pathol Biol.*, 59:275-277
94. Kayser, C., (1970). *Physiologie*. Editions médicales flammarion p 177-200
95. Keylock, K.T., Vieira, V.J., Wallig, M.A., DiPietro, L.A, Schrementi, M., Woods, J.A. (2008). Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R179-R184.
96. Kon, E., G. Filardo, M. Delcogliano, M. Fini, F. Salamanna, G. Giavaresi, I. Martin, Marcacci, M. (2010). Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 11:220.
97. Konstantinidis, A., Mark, H., Panagiotis, N., Georgios, D. P. (2013). Efficacy of autologous platelets in macular hole surgery. *Clinical Ophthalmology*. 7: 745–750
98. Laato, M., Niinikoski, J., Lundberg, C., Gerdin, B. (1988). Inflammatory reaction and blood flow in experimental wounds inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Eur Surg Res* 20:33.
99. Landesberg, R., Roy, M. and Gickman, R.S. (2000). Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 58:297-300.
100. Lawrence, J.C. (1983). *Bacteriology and Wound Healing* In: Fox JA, Fischer J (eds), *Cadexomer Iodine*. Stuttgart, Schattauer Verlag, pp 19-31.
101. Lawrence, J.C. (1987). The aetiology of scars. *Burns* 13:S3.
102. Leal, E.C., Carvalho, E., Tellechea, A., Kafanas, A., Tecilazich, F., Kearney, C., Kuchibhotla, S., Auster, M.E., Kokkotou, E., Mooney, D.J., LoGerfo, F.W., Pradhan-Nabzdyk, L. and Veves, A. (2015). Substance P Promotes Wound Healing in Diabetes by Modulating Inflammation and Macrophage Phenotype. *Am J Pathol.* 185(6):1638-1648.
103. Lei, H., Gui, L. Xiao, R. (2009). The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin Biochem.* 42(13-14): 1452-1460.

- 104.Li, Z.J., Choi, H.I., Choi, D.K., Sohn, K.C., Im, M., Seo, YJ., Lee, Y.H., et al.(2012). Autologous platelet-rich plasma: a potential therapeutic tool for promoting hair growth. *Dermatol Surg*; 38: 1040–1046.
- 105.Lieu Y., kalen A., Risto O., Wahlstrom O. (2002). Fibroblastes proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound repair Regen*. 10(5):336-340.
- 106.Lisbeth,H. ,Olsen, A.T., Qvortrup, K.K., Pedersen H.D. (2004). Comparison of manual and automated methods for determining platelet counts in dogs with macrothrombocytopenia. *Investigation journal of veterinary diagnostic* 16:167–170.
- 107.Lock, P. (1979). The Effects of Temperature on Mitotic Activity at the Edge of Experimental Wounds. Lock Research Laboratories Paper. Kent: Lock Laboratories,
- 108.Loots, M.A., Lamme, E.N., Zeegelaar, J., Mekkes, J.R., Bos, J.D., Middelkoop, E. (1998). Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol* 111:850-857.
- 109.Lord-Dubé,H., l'Italien,R. (1983). Décarie éditeur. Maloine éditeur Paris. P 101-116.
- 110.Marieb, E.N(2010). Anatomie et physiologie humaines.- Ch. 5 Le système tégumentaire figure 5.2 8ème édition © Editions du Renouveau pédagogique Inc.,- p 174
- 111.Marx, R,E. (2004). Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 62:489-496.
- 112.Marx, R.E. (2001). Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP? *Implant Dentistry*, 10(4):225-228.
- 113.Marx, R.E., Carlson, E.R., Eichstaedt, R.M., Schimmele, S.R., Strauss, J.E., Georgeff, K.R. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med*. 85:638-646.
- 114.McCallion, R.L., Ferguson, M.W.J. (1996). Fetal wound healing and the development of anti-scarring therapies for adult wound healing. In *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, 2nd ed. (ed. Clarke RAF), pp. 561–600, New York: Plenum.
- 115.Mialot, M. (1993). Histologie de la peau normale. *Encyclopédie Vétérinaire*, Paris. Dermatologie 0100, 8p.

- 116.Miao, Y.M.D., Sun, Y.B., Sun, X.N., Du, B.J., Jiang, J.D., Hu, Z.Q. (2013). Promotional Effect of Platelet-Rich Plasma on Hair Follicle Reconstitution in vivo. *Dermatol Surg.* 39:1868–1876.
- 117.Michelson, A. D. (1992). Thrombin-induced down-regulation of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*.18(1):18–27.
- 118.Milano, G., E. S. Passino, L. Deriu, Careddu G, L. Manunta, A. Manunta, MF Saccomanno, Fabbriani, C. (2010). The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18: 971 – 980.
- 119.Miller, M.C., Nanchahal, J. (2005). Advances in the modulation of cutaneous wound healing and scarring. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*. 19(6): 363-81.
- 120.Milne, D.W. (1979). Wound healing and management. *Proceedings of the 24th annual convention of the Am. Ass. of equine practitioners Missouri*. P: 343-349.
- 121.Misirlioglu, A., Eroglu, S., Karacaoglan, N., Akan, M., Akozt, T., Ildirim, S. (2003): Use of honey as an adjunct in the healing of split-thickness skin graft donor site. *Dermatol Surg.*29 (2): 168-172.
- 122.Mogan, C., Larson, D.F. (2004) "Rationale of platelet gel to augment adaptive remodeling of the injured heart." *Journal of the American Society of Extra-Corporeal Technology*. 36: 191-196
- 123.Molina-Miñano, F., López-Jornet, P., Camacho-Alonso, F., Vicente-Ortega, V. (2009). The use of plasma rich in growth factors on wound healing in the skin: experimental study in rabbits. *International Wound Journal*, 6(2), 145–148.
- 124.Moore, O.A., Smith, L., Campbell, F., Seers, K., McQuay, H.J., Moore, R.A. (2001): systematic review of the use of honey as a wound dressing *BMC complement alert med.*
- 125.Morain, W.D., Colen, L.B. (1990). Wound healing in diabetes mellitus. *Clin Plast Surg* 17(3):493.
- 126.Muller, G.H., Kiriak, R.W., Scott, D.W. (1989). Structure and function of the skin. In: *Small animal dermatology*. 4th ed., Philadelphia, W.B. Saunders. 1-48
- 127.Myers, J.A. (1982). Wound healing and the use of a modern surgical dressing. *Pharmaceutical J*; 2(19): 103-104.

128. Nagata, M.J. H., M.R. Messori, Flávia A. C. Furlaneto, Stephen E. Fucini, Alvaro F. Bosco, Valdir G. Garcia, Tatiana M. Deliberador, and Luiz G. N. de Melod (2010). Effectiveness of Two Methods for Preparation of Autologous Platelet-Rich Plasma: An Experimental Study in Rabbits. *European Journal of Dentistry*. 4 : 395-402.
129. Nair, M. B., H.K. Varma, K.V. Menon, S.J. Shenoy, John, A. (2009). Reconstruction of goat femur segmental defects using triphasic ceramic-coated hydroxyapatite in combination with autologous cells and platelet-rich plasma. *Acta Biomaterialia*, 5:1742–1755.
130. Nathan, C.F. (1987). Secretory products of macrophages. *J Clin Investigation* 1(79): 319-326.
131. Ocleston, N. L., Metcalfe, A. D., Boanas, A., Burgoyne, N. J., Nield, K., O’Kane, S., et al. (2010). Therapeutic improvement of scarring: mechanisms of scarless and scar-forming healing and approaches to the discovery of new treatments. *Dermatology Research and Practice*,
132. Offermanns, S. (2006). Activation of platelet functions through G protein-coupled receptors. *Circulation Research*, 99(12): 1293–1304.
133. Okuda, K., Kawase, T., Momose, M., Murata, M., Saito, Y., Suzuki, H., Wolff, L.F. et Yoshie, H. (2003). Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol*. 74(6):849-57.
134. Olivry, T., Muller, R.S., Walder, E.J. et Atlee, B.A. (1993). Anatomie et physiologie microscopiques de la peau. *Encyclopédie Vétérinaire*, Paris. Dermatologie. P :13.
135. Ostvar, O., Shadvar, S., Yahaghi, E., Azma, k., Fayyaz, F.A., Koorosh, A., et Nowrouzian, I. (2015). Effect of platelet-rich plasma on the healing of cutaneous defects exposed to acute to chronic wounds: a clinico-histopathologic study in rabbits. *Diagn Pathol.* , 10:85
136. Panda, A., Sandeep, K., Abhiyan, K. (2009) Fibrin glue in ophthalmology *Indian Journal of Ophthalmology*. 57(5): 371-379
137. Peter A.M. Everts, EKP, Johannes T.A. Knape, Gernot Weibrich, Jacques P.A.M. Schönberger, Johannes Hoffmann, Eddy P. Overdevest, Henk A.M. André van Zundert (2006). Platelet-Rich Plasma and Platelet Gel: A Review *The Journal of The American Society of Extra-Corporeal Technology* 38:174–187

138. Pollack, S.V. (1979). Wound healing: A review. III. Nutritional factors affecting wound healing. *J Dermatol Surg Oncol.* 5:615.
139. Powanda, M.C., Moyer, E.D. (1981). Plasma proteins and wound healing. *Surg Gynecol Obstet* 153:749.
140. Pruijm, M.T., Cherpillod, A., Vogt, B., Burnier, M. (2008). La plasmaphérèse : technique, complications et indications *Rev Med Suisse.* 4 : 581-581.
141. Quarteiro, M. L., Tognini, J. R. Filgueiras, De Oliveira, E. L.F.I, Silveira, I. (2015). The effect of platelet-rich plasma on the repair of muscle injuries in rats rev bras or top. 50(5):586–595
142. Quirinia, A., Viidik, A. (1991). The influence of age on the healing of normal and ischemic incisional skin wounds. *Mech Ageing Dev.* 58:221.
143. Reinke, J.M. et Sorg, H. (2012). Wound Repair and Regeneration. *Eur Surg Res* .49:35–43
144. Robson, M.C. (1997). Wound infection. A failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. *Surg Clin North Am*, 77:637.
145. Robson, M.C., Stenberg, B.D, Heggers, J.P. (1990). Wound healing alterations caused by infection. *Clin Plast Surg.* 17(3):485.
146. Rodriguez, P.G., Felix, F.N., Woodley, D.T., Shim, E.K. (2008). The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatol Surg.* 34:1159-1169.
147. Roskame J. (1922) Contribution à l'étude de la physiologie normale et pathologique du globulin. Laboratoire de Recherches de la Clinique médicale- Université de Liège. 2241-330.
148. Rosslyne, I., Hélène L.D. (1983). *Hématologie*, maloine éditeur (paris). 109-162.
149. Sabarish, R., Vamsi, L., Suresh, R. (2015). A Comparison of Platelet Count and Enrichment Percentages in the Platelet Rich Plasma, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(2): 10-12.
150. Sardari K., Galedar Kakhki E. et Mohri M. (2007). Evaluation of wound contraction and epithelialization after subcutaneous administration of Theranekron® in cows. *Comp Clin Pathol.*, 16:197–200.
151. Schultz G.S., Sibbald, R.G, Falanga, V., Ayello, E.A., Dowsett, C., Harding, K., Romanelli, M., Stacey, M., Teot, L., Vanscheidt, W. (2003). Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Rep* .11(1): 1-28

- 152.Schwartz, S.I., Shires, T.G., Spencer, F.C., Daly, J.M., Fischer, J.E., Galloway, A.C. (1999). Principles of Surgery, 7th edition; McGraw-Hill Publication.
- 153.Sclafani, A.P., McCormick, S.A. (2012). Induction of dermal collagenesis, angiogenesis, and adipogenesis in human skin by injection of platelet- rich fibrin matrix. Arch Facial Plast Surg.14: 132–136.
- 154.Scott D.W., Miller W.H (2003). Structure and function of the skin. In equine dermatology. Sanders (Ed): 1 – 58 in: utilisation du miel dans le traitement dans le traitement des plaies (revue bibliographique), thèse, ENVL (2010)
- 155.Shaw, T., Martin, P. (2009). Wound Repair at a Glance, Journal of Cell Science (122): 3209- 3213.
- 156.Shin, J.M., Park J.H., Park I.H, (2015). Pirfenidone inhibits transforming growth factor β 1-induced extracellular matrix production in nasal polyp-derived fibroblasts. Am J Rhinol Allergy Journal .29(6): 408-413.
- 157.Sibbald, R.G., Woo, K.Y. (2008). The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. Diabetes Metab Res Rev. 24(1):25-30.
- 158.Singer, A.J., Clark, R.A., (1999). Cutaneous wound healing. New England Journal of Medicine. 341: 738–746.
- 159.Singer, II., Kawka, D.W., Kazazis, D.M., Clark, R.A. (1984). In vivo co-distribution of fibronectin and actin fibers in granulation tissue: immunofluorescence and electron microscope studies of the fibronexus at the myofibroblast surface. J Cell Biol. 98:2091- 2106.
- 160.Singh, S., Sharma, N. (2014). Evaluation of wound healing activity of acacia auriculiformisA.cunn.stem. Asian J Pharmaceut Clin Res., 7(2): 204-207.
- 161.Skobe, M., Detmar, M. (2000). Structure, Function, and Molecular Control of the Skin Lymphatic System. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings 5:14-19
- 162.Smets, F., Croisier, J.L., Forthomme, B., Crielaard, J.M. et Kaux, J.F. (2012). Clinical applications of platelet-rich plasma (PRP) in tendon lesions: A literatur Review. Sci Sports., 153(27): 141-153.
- 163.Stevens.A, Low J.S, Wheater P.R., Burkitt, H.G. (1993). Histologie. Edition prade. P: 348-362.
- 164.Stocum, D.L. (1995). Molecular Biology Intelligence Unit: Wound Repair, Regeneration and Artificial Tissues, Austin TX: R.G. Landes Company

- 165.Sun, T.T., Cotsarelis, G. et Lavker, R.M. (1991). Hair follicular stem cells: the bulge activation hypothesis. *J Invest Dermatol.* 96:77- 8.
- 166.Swaim, S.F, Hinkle, S.H, Bradley, D.M. (2001). Wound contraction: basic and clinical factors. *Compend Contin Educ Small Anim Parct.*23 (1): 20-33.
- 167.Swaim, S.F., Hinkle, S.H., Bradley, D.M. (2001) Wound contraction: basic and clinical factors. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 23:20–24.
- 168.Swift, M.E., Burns, A.L., Gray, K.L, DiPietro, L.A. (2001). Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *J Invest Dermatol.* 117:1027-1035.
- 169.Swift, M.E., Kleinman, H.K., DiPietro, L.A. (1999). Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest* 79:1479-1487.
- 170.Temple, W.J. et al., (1975). Effect of nutrition and suture material on long-term wound healing. *Ann Surg* 182:93.
- 171.Vidinsk, B., Gal, P., Toporcer, T., Longauer, F., Lenhardt, A.,Bobrov, N. et Sabo, J. (2006). Histological Study of the First Seven Days of Skin Wound Healing in Rats. *Acta Vet. Brno* 75: 197–202
- 172.Viguier. E., Degorce. F (1992). Eléments anatomiques fondamentaux en chirurgie plastique et reconstructrice chez les carnivores. *Point vétérinaire.* 24: 5-19.
- 173.Wang, Y., Tang, L., Zhu, F. and Jia, M. (2017). Platelet-rich plasma promotes cell viability of human hair dermal papilla cells (HHDPCs) in vitro. *Int J Clin Exp Pathol.*, 10(12):11703-11709.
- 174.Weibrich, G., Hansen, T., Kleis, W., Buch, R., Hitzler, W.E. (2004). Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 34: 665– 671.
- 175.Weibrich, G., Kleis, W.K., Hafner, G., Hitzler, W.E., Wagner, W. (2003). Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res.* 14: 357–62.
- 176.Werner S., Grose R. (2002). Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol Rev.* 83: 835–870.
- 177.Wheater, P.R, Burkitt H.G, Daniels V.G. (1979). Histologie fonctionnelle. *Médecine et sciences international.* P: 116-127.
- 178.White, J. G. (1972). Interaction of membrane systems in blood platelets. *American Journal of Pathology.* 66(2):295– 312.

179. Whitman, D.H., Berry, R.L, Green, D.M. (1997). Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 55(11):1294-9.
180. Woodell-May, J. E., Ridderman N. D., Swift M. J., Higgins, B.S. Joel. (2005). Producing Accurate Platelet Counts for Platelet Rich Plasma: Validation of a Hematology Analyzer and Preparation Techniques for Counting. *Journal of Craniofacial Surgery.* 16 (5):749-756.
181. Woodell-May, J., Matuska, A., Oyster, M., Welch, Z., O'Shaughnessy, K., Hoepfner, J. (2011). Une solution protéique autologue inhibe la production de MMP-13 par des chondrocytes articulaires humains stimulés par IL-1beta et TNFalpha. *J Orthop Res.* 29: 1320-1326. .
182. Xie, X., Wang, Y., Zhao, C., Guo, S., Liu, S., Jia, W., Tuan, R.S., Zhang, C. (2012).évaluation comparative des CSM de la moelle osseuse et du tissu adipeux ensemencé dans l'échafaudage dérivé PRP pour la régénération du cartilage. *Biomatériaux* 2012, 33: 7008-7018.
183. Young, A., McNaught, C.E. (2001): The physiology of wound healing. *Surgery* 29(10): 475-479

PUBLICATIONS

- Daikh Badis, Bennoune Omar (2016). Comparative Study of Four Methods of Preparation of Autologous Plasma-Rich Platelet in Sheep. Global Veterinaria 17 (6): 559-563. [https://www.idosi.org/gv/gv17\(6\)16/10.pdf](https://www.idosi.org/gv/gv17(6)16/10.pdf).
- Daikh Badis, Bennoune Omar (2018). Effectiveness of platelet-rich plasma on the skin wound healing process: a comparative experimental study in sheep. Veterinary world 11(6): 800-809. www.veterinaryworld.org/Vol.11/June-2018/11.pdf.

Comparative Study of Four Methods of Preparation of Autologous Plasma-Rich Platelet in Sheep

^{1,2}B. Daikh and ³O. Bennoune

¹Department of Biology of Organisms, University of Batna 2, Algeria

²Biotechnology's Laboratory of the Bioactive Molecules and the Cellular Physiopathology, University of Batna2, Algeria

³Department of Veterinary Medicine, Institute of Veterinary Sciences and Agricultural Sciences, University of Batna 1, Algeria

Abstract: The therapeutic evaluation of the biological effect of platelet-rich plasma (PRP) is the subject of several studies in regenerative medicine. The aim of this study was to compare four different methods of preparation of autologous platelet concentrates in sheep. Various specimens were collected from six adult healthy male sheep of the local breed. Blood smears were also carried out on all the samples, in order to see the morphology of the platelets. The data obtained in the manual platelet count were submitted to statistical analysis (repeated measures ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0.05$). The result was that the total mean number of platelets in whole blood was $521.56 \pm 97.01 \times 10^3/\mu\text{l}$. The PRP samples in Groups I and III showed significantly higher mean platelet counts than Group II and IV ($1438.25 \pm 221.72 \times 10^3/\mu\text{l}$ and $1430.75 \pm 293.63 \times 10^3/\mu\text{l}$, respectively). In conclusion, within the limit of this study, it can be concluded that the best technique of platelet harvesting in sheep is obtained with the double centrifugation protocol used for animals of group I.

Key words: Platelet Counts • Platelet-Rich Plasma • Centrifugation • Blood • Sheep

INTRODUCTION

The search for protocols favoring haemostasis and healing is a recurring problem in all surgical disciplines. Platelet-rich plasma (PRP), as a biological adjuvant, offers innovative new pathways [1]. It is defined according to Marx [2] as a restricted plasma volume containing a high platelet contingent rich with growth factors. Therapeutic administration of PRP as a treatment decreases regenerative disorders and accelerates the healing of a wide range of tissues. However, there are controversies in the literature regarding the potential benefits of using this procedure and also controversies regarding the protocols of its preparation. Anitua [3] and Aghaloo *et al.* [4] reported that these controversies are probably related to the lack of appropriate standardization of different preparations and a formal definition of PRP. Several simplified protocols for the preparation of PRP have been developed to facilitate its clinical application.

Basically, centrifugation is considered as a basic process of preparing different PRP. Various methods for

the preparation of PRP have been reported in the literature. These include commercial systems such as Curasan®, Plateltex® and manual methods using the laboratory centrifuge reported by Marx [2], Landesberg *et al.* [5] and Okuda *et al.* [6]. The clinical efficacy of each of these methods remains uncertain and depends on several variables. The role of centrifugation's speed and time on the platelet concentration achieved in each of the methods is fully evaluated [7]. According to Marx [8] and Carneiro *et al.* [9] the PRP obtained by double centrifugation must have a platelet concentration of 300 to 400%, higher than that of whole blood, in order to consider it as a "therapeutic PRP". However, Anitua [3] uses only one centrifugation although the platelet concentrations obtained by this procedure have not been reported.

The aim of this study was to determine the effects of the regime presented by the speed and the time of centrifugation on the number of platelets in platelet concentrates obtained using four different methods of preparing PRP in sheep.

MATERIAL AND METHODS

Experimental Model: Six clinically healthy adult male sheep weighing 25-30 kg were used in this study. The experimental protocol was carried out at the Biotechnology Laboratory of the Bioactive Molecules and the Cellular Physiopathology, Department of Biology, University of Batna 2, Algeria.

PRP Preparation: A volume of 85 ml of blood was drawn from each animal by jugular puncture. This sample requires the use of 06 tubes of 15 ml of capacity containing 02.25 ml of citrate dextrose (ACD) [8]. As soon as the blood was collected, it was immediately distributed in sterile dry tubes of 05ml of capacity; in total we obtained 21 tubes containing 04 ml of blood for each one. A single tube used for the count of platelets in the initial blood whereas the rest of the tubes (20 tubes) underwent centrifugation at different rates established as presented in table 01.

Table 1: Summary table of the various protocols used for the preparation of platelet concentrates.

Method	Group I	Group II	Group III	Group IV
1st centrifugation	1800 r.p.m for 08 min	1800 r.p.m for 08 min	2500 r.p.m for 05 min	2400 r.p.m for 03 min
2nd centrifugation	1000 r.p.m for 08 min	—	—	3000 r.p.m for 12 min

•GGroup I: Method proposed by Carneiro *et al.* [9].

•GGroup II: Method proposed by Hernandez-Fernandez *et al.* [10].

•GGroup III: Method proposed by Nair *et al.* [11].

•GGroup IV: Method proposed by Milano *et al.* [12].

All these protocols were carried out with respect to the various centrifuging regimes established by the authors. The modification concerns only the initial blood volume (85ml of blood for each method).

Protocol for the Preparation of PRP by Single Centrifugation (Group II and III): Separation of the cellular elements from Group II and III blood was carried out using simple centrifugation (Laboratory centrifuge; Hettich zentrifugen D-78532 tuttlingen) The blood samples were centrifuged at the rates established by each method (Speed and appropriate duration of each technique). The process took place at an ambient temperature of 22 ° C. accordingly, we obtained three basic components; Red blood cells (Tube bottom), PRP (Middle of the tube) and platelet-poor plasma (PPP) (At the top of the tube). A mark was made on the line separating the globular pellet from the supernatant. All the content above this mark (About 08 to 09 ml) was pipetted which corresponds to the volume of PRP.

Protocol for the Preparation of PRP by Double Centrifugation (Groups I and IV): The first centrifugation: the blood cell separation was carried out using a laboratory centrifuge, the Group I tubes were centrifuged at 1800 r.p.m for 08 minutes and the Group IV tubes centrifuged at 2400 r.p.m for 3 minutes in an ambient temperature of 22 °c. we obtained two basic components: blood cell components in the lower fraction and serum which corresponds to the upper fraction.

The second centrifugation: all the contents above the globular pellet were pipetted and transferred to another 5 ml dry tube without anticoagulant. The sample was then centrifuged again at 1000 r.p.m for 08 minutes for group I tubes and 3000 r.p.m for 03 minutes for group IV tubes. There resulted a small red fraction at the bottom of each tube and a supernatant at the top. The fraction that will be pipetted is 0.5 ml of each tube above each red fraction. The total amount of PRP collected for each samples is 02.5ml.

The Number of Platelets: The number of platelets was determined on whole blood and on PRP samples under a microscope with a haemocytometer (Neubauer improved chamber) after 1/200 dilution with a Formol 0.5 ml, acetone 2.5 ml, physiological saline 20 ml and distilled water (QSP per 100 ml).

Realization of Smears: The realization of the whole-blood and PRP smears (The staining with the May-Grünwald Geimsa: M.G.G) aims to analyze the platelet richness and the presence or absence of the aggregates. This is done on the basis of each count.

Statistical Analysis: Statistical analysis was performed; the results of counts obtained in each of the methods used were expressed as mean plus standard deviations and medians. The comparisons between the different methods are carried out using ANOVA with the statistical software SPSS version 23. This analysis of variance followed by a comparison between groups using Tukey HSD test with a statistical significance fixed at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSIONS

From the results presented in table 2, we note that the number of platelets in the whole blood of all individuals considered in this study corroborates with that provided by the literature [13] with a variation of $521.56 \pm 97.01 \times 10^3/\mu\text{l}$. Concerning the number of PRP platelets of each protocol (FIG. 01), our results are similar to those

Table 2: Results of platelet count averages of the four groups according to each established rate (ANOVA).

Groups	Mean platelet concentration $\pm$ SD (X 10 ³ /μl)	N	95 % Confidence Interval		F	SignificanceP-value
			Lower Limit	Upper Limit		
Whole blood	521.56 $\pm$ 97.01	6	419.75	623.37	17.24	p < 0,0010.000 (***)
Group I	1438.25 $\pm$ 221.72 c	4	1085.43	1791.06		
Group II	995.33 $\pm$ 48.95 bc	3	873.72	1116.93		
Group III	1430.75 $\pm$ 293.63 c	4	963.51	1897.98		
Group IV	958.66 $\pm$ 289.75 ab	3	238.86	1678.46		

The presented means which are followed by different letters are significantly different (ANOVA: Tukey HSD test, P < 0.05 was considered statistically significant).

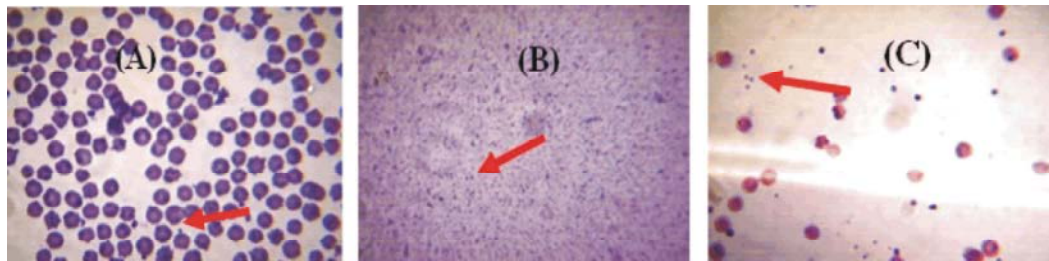


Fig. 1: Smears showing platelets (Arrows) of whole blood (A). PRP smears showing platelets (Arrows) of group I: (B) and group II: (C) (Staining with M.G.Gx100).

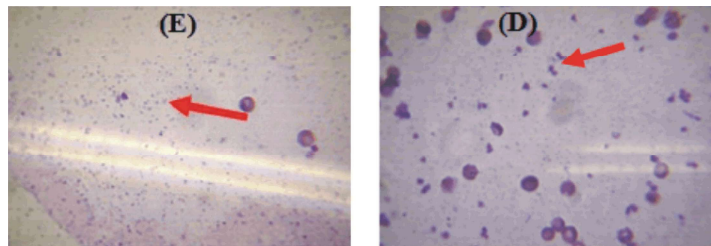


Fig. 2: PRP smears showing platelets (Arrows) of group III: (D) and group IV: (E) (Staining with M.G.Gx100).

reported by the authors. The methods proposed by Carneiro *et al.* [9] and Nair *et al.* [11] have a higher platelet count with a variation of $1438.25 \pm 221.72 \times 10^3/\mu\text{l}$ and $1430.75 \pm 293.63 \times 10^3/\mu\text{l}$ respectively. The methods proposed by Hernandez-Fernandez *et al.* [10] and Milano *et al.* [12] reveal lower levels of thrombocytes ($995.33 \pm 48.95 \times 10^3/\mu\text{l}$ and $958.66 \pm 289.75 \times 10^3/\mu\text{l}$).

Platelet counting by the manual or automated method is widely discussed in the literature; the majority prefers the use of automated methods. Several works which have been published in this context, Woodell-may *et al.* [14] and Briggs *et al.* [15] confirm that only automated hematology analyzers can accurately count the platelets in the PRP. Some others advocate the manual method [16-18] whose simple reason is to avoid all individuals with prior thrombocytopenia.

Careful examination of PRP smears confirms all of our results, Figure (B):1 and (D):2 show enormous

thrombocytes. We also note the absence of aggregation phenomena for all smears. It appears that dextrose is the best anticoagulant for different preparations of autologous PRP in sheep.

Analysis of variance ANOVA (Table.1), revealed a significant difference at the threshold of significance $\alpha = 5\%$ of thrombocytes count between the different methods used compared to whole blood. Likewise, the comparison between the different methods (Intergroup comparison) using the Tukey HSD test confirm this hypothesis with a highly significant difference between groups I and III (***) and significant for groups II and VI (*). Our results are supported by some authors who reported that the clinical effectiveness of each of these methods remains uncertain and optimized in relation to the different variables of the PRP preparation process as well as the dose used. According to Marx [8], Nagat *et al.* [18], Dugrillon *et al.* [19] and Weibrich *et al.* [20] total treated blood volume,

sampling, number of turns, time of centrifugation and centrifuge rotational speed, all of these parameters concur and control the quality of PRP. Concerning the therapeutic dose, analytical gaps in published PRP works sometimes lead to contradictions and confirm our doubts about the biological identity of these preparations.

Some authors have also reported that moderate centrifugation regimes favor separation of platelets while superior speed and longer time centrifugations are not desired. This fact may be due to agglutination or disintegration of platelets with premature release of the contents of the platelets granules. This hypothesis was also confirmed by Sabarish *et al.* [21] who reported that several variables affect the quantity and quality of PRP. Furthermore, concerning the fraction of white blood cells, Marx [8] confirmed that the use of the double centrifugation process is essential wherein the PRP obtained is practically free from all cells of the white line. These may have a detrimental effect on epithelialization following premature release of pro-inflammatory factors potentially responsible for the degradation of the extracellular matrix.

CONCLUSION

Methods and protocols for the preparation of platelet-rich plasma in sheep are very diverse and widely controversial in the literature including their associated biological effects. On the basis of the results obtained, it appears that all the protocols used enable us to have platelet concentrates with very varied platelet contents. The ANOVA statistical study reveals that the protocols proposed for the animals of group I and III collect the highest platelet concentration. Because there is no official consensus to optimize and standardize a specific method, the main relevant aspects to be controlled during the preparation of PRP for specific *in vivo* applications are the initial volume of blood taken, the nature of the anticoagulant used, the speed and time of centrifugation.

At the limit of this study and due to the small number of animals used, it can be concluded that the best technique of platelet harvesting in sheep is obtained with the protocol used for animals of group I.

REFERENCES

1. Dohan, S., A. Dohan, J. Choukroun, A. Diss, A. Simonpieri, M.O. Girard and D. Dohan, 2005. Autologous platelet concentrates for topical use. *EMC-Ondontologie*, 1: 141-180.
2. Marx, R.E., E.R. Carlson, R.M. Eichstaedt, S.R. Schimmele, J.E. Strauss and K.R. Georgeff, 1998. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 85(6): 638-646.
3. Anitua, E., 1999. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of sites for implants. *Oral Maxillofacial Implants*, 14: 529-535.
4. Aghaloo, T.L., P.K. Moy and E.G. Freymiller, 2002. Investigations of platelet rich plasma in rabbit cranial defects. A pilot study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 60(10): 1176-1181.
5. Landesberg, R., M. Roy and R.S. Gickman, 2000. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 58: 297-300.
6. Okuda, K., T. Kawase, M. Momose, M. Murata, Y. Saito, H. Suzuki, L.F. Wolff and H. Yoshie, 2003. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells *in vitro*. *J Periodontol.*, 74(6): 849-57.
7. Marx, R.E., 2004. Platelet rich-plasma: evidence to support its use. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 62(4): 489-496.
8. Marx, R.E., 2001. Platelet-Rich Plasma (PRP): What is PRP and What Is Not PRP?. *Implant Dentistry*, 10(4): 225-228.
9. Carneiro, M.O., C.H. Barbieri I and J.B. Neto, 2013. Platelet-Rich Plasma Gel promotes regeneration of articular cartilage in knees of sheep. *Acta Ortop Bras*, 2013, 21(2): 80-6.
10. Hernandez-Fernandez, A., R. Vélez, F. Soldado, J.C. Saenz-Ríos, I. Barber and M. Aguirre-Canyadell, 2013. Effect of administration of platelet-rich plasma in early phases of distraction osteogenesis: An experimental study in an ovine femur model. *Injury, Int. J. Care Injured*, 44: 901-907.
11. Nair, M.B., H.K. Varma, K.V. Menon, S.J. Shenoy and A. John, 2009. Reconstruction of goat femur segmental defects using triphasic ceramic-coated hydroxyapatite in combination with autologous cells and platelet-rich plasma. *Acta Biomaterialia*, 5: 1742-1755.

12. Milano, G., E.S. Passino, L. Deriu, G. Careddu, L. Manunta, A. Manunta, MF Saccomanno and C. Fabbriani, 2010. The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18: 971-980.
13. Feldman, B.F., J.G. Zinkl and N.C. Jain, 2000. *Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, pp: 1076.
14. Woodell-May, J.E., N.D. Ridderman, M.J. Swift, Higgins and B.S. Joel, 2005. Producing Accurate Platelet Counts for Platelet Rich Plasma: Validation of a Hematology Analyzer and Preparation Techniques for Counting. *Journal of Craniofacial Surgery*, 16(5): 749-756.
15. Briggs, C., P. Harrison and S.J. Machin, 2007. Continuing developments with the automated platelet count. *International Journal of Laboratory Hematology*, 29(2): 77-91.
16. Messoria, M.R., M.J.H. Nagata, F.A.C. Furlaneto, R.C.M. Dornelles, S.R.M. Bomfim, T.M. Deliberador, V.G. Garcia and A.F. Bosco, 2011. A standardized research protocol for platelet-rich plasma (PRP) preparation in rats. *RSBO*, 8(3): 299-304.
17. Kon, E., G. Filardo, M. Delcogliano, M. Fini, F. Salamanna, G. Giavaresi, I. Martin and M. Marcacci, 2010. Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 11: 220.
18. Nagata, M.J. H., M.R. Messoria, Flávia A.C. Furlaneto, Stephen E. Fucini, Alvaro F. Bosco, Valdir G. Garcia, Tatiana M. Deliberador and Luiz G. N. de Melod, 2010. Effectiveness of Two Methods for Preparation of Autologous Platelet-Rich Plasma: An Experimental Study in Rabbits. *European Journal of Dentistry*, 4: 395-402.
19. Dugrillon, A., H. Eichler, S. Kern and H. Klüter, 2002. Autologous concentrated platelet rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 31(6): 615-619.
20. Weibrich, G., T. Hansen, W. Kleis, R. Buch and W.E. Hitzler, 2004. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*, 34: 665-671.
21. Sabarish, R., L. Vamsi and R.R. Suresh, 2015. A Comparison of Platelet Count and Enrichment Percentages in the Platelet Rich Plasma, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(2): 10-12.

The effectiveness of platelet-rich plasma on the skin wound healing process: A comparative experimental study in sheep

Daikh Badis^{1,2} and Bennoune Omar³

1. Department of Biology of Organisms, University of Batna 2, Batna, Algeria; 2. Biotechnology's Laboratory of the Bioactive Molecules and the Cellular Physiopathology, University of Batna 2, Batna, Algeria; 3. Department of Veterinary Science, Institute of Agronomic and Veterinary Sciences, University of Batna 1, Batna, Algeria.

Corresponding author: Daikh Badis, e-mail: badis.daikh@gmail.com

Co-author: BO: bennouneo@yahoo.fr

Received: 24-03-2018, **Accepted:** 22-05-2018, **Published online:** 14-06-2018

doi: 10.14202/vetworld.2018.800-808 **How to cite this article:** Badis D, Omar B (2018) The effectiveness of platelet-rich plasma on the skin wound healing process: A comparative experimental study in sheep, *Veterinary World*, 11(6): 800-808.

Abstract

Aim: The therapeutic evaluation of the biological effect of platelet-rich plasma (PRP) used as a surgical adjunct to maintain the inflammatory process and to potentiate tissue healing, make the subject of recent research in regenerative medicine. This study was designed to evaluate the healing activity of PRP by its topical application on the skin experimentally injured in a sheep model.

Materials and Methods: The study was conducted on 9 adult and clinically healthy males sheep. PRP was obtained by a protocol of double centrifugation of whole blood from each animal. After sterile skin preparation, full-thickness excisional wounds (20 mm x 20 mm) were created on the back of each animal. The animals were randomly divided into three equal groups of three sheep for each. In Group I, the wounds were treated with PRP, in Group II; wounds were treated with Asiaticoside; in Group III, wounds were treated with saline solution. The different treatments were administered topically every 3 days. Morphometric measurements of the contraction surface of the wounds and histopathological biopsies were carried out at the 3rd, 7th, 14th, 21st, and 28th days of healing.

Results: The results of the morphometric data obtained revealed that it was significant differences recorded at the 7th and 14th day of healing in favor for animals of Group I. Semi-quantitative histopathological evaluation showed that PRP reduces inflammation during 3 first days post-surgical and promotes epithelialization in 3 weeks of healing.

Conclusion: We concluded that topical administration of PRP obtained by double centrifugation protocol could potentially improve the skin healing process in sheep.

Keywords: healing, platelet-rich plasma, sheep, skin.

Introduction

The development of bioactive surgical adjuvant capable of maintaining the inflammatory process and potentiating healing is one of the great challenges of regenerative medicine. Indeed, all medical disciplines calling for tissue self-repair techniques remain a recurring problem and object of discussion of innovative research [1]. The autologous platelet concentrate from the fibrin glue technology of the 1990s offers a new therapeutic strategy and a challenge of hope at the center of attention of clinicians, especially against refractory pathologies and rebels to conventional treatments, as well as it can be expensive, easy, and quick to manufacture. Moreover, since January 2011, it is no longer included on the list of doping products [2]. In this research perspective, several studies have been conducted but widely controversial, the main divergence of which is the absence of a consensus that

normalizes a standard protocol for the preparation of platelet-rich plasma (PRP), with evaluation of the biological effects associated with its administration [3,4].

Wound healing is one of the most complex biological events after delivery [5]. It is a physiological process that enables tissue restoration through an organized cascade of complex cellular and molecular events. Classically, there are two ways of the healing skin wounds following the conditions of trauma and treatment. Healing by primary intention, wounds heal quickly and without contraction, and wounds with loss of substance heals less quickly or by the second intention. Among the biological events that generate healing, the inflammatory step, sometimes called even crucial, often initiated by a mechanism of hemostasis which aims to prevent the accidental loss of blood. Ostvar *et al.* [6] reported that platelets play a vital role in the healing process of cutaneous wounds, and their activations are accompanied by the secretory production of the various growth factors that act either directly or indirectly on all aspects of the healing cascade.

Healing by second intention is prone to skin complications in sheep. In veterinary practice, the increased demand for products that accelerate healing and improve the esthetic appearance is the subject of several medical and economic researches. The objective of this study

Copyright: Badis and Omar. Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

was to evaluate the healing activity of PRP by its topical application to experimentally injured skin in sheep.

Masterials and Methods

Ethical approval

All maneuvers and surgical procedures were performed in accordance with the conditions established by the Ethics Committee of the Institute of Agronomic and Veterinary Sciences of the University of Batna 1 - Algeria.

Experimental animals

A total of nine clinically healthy male sheep, weighing 20-25 kg and aged 6 months were used in this study, raised in the animal facility of the Institute of Veterinary and Agricultural Sciences - Batna 1 - during an adaptation period of 15 days and a trial period of 28 days. All these animals had free access to water and the regular diet (straw and barley). 1 month prior to injury, all sheep were dewormed with ivermectin at a dose of 0.2 ml/kg administered subcutaneously.

Preparation of PRP

A volume of 20 ml of whole blood was collected from each sheep by septic puncture of the jugular vein. This sampling requires the use of two tubes of 15 ml capacity containing 2.25 ml of citrate acid dextrose (ACD) for each tube, filled with blood up to graduation 10. The blood collected was transferred to empty tubes of 5 ml capacity using a 1 ml pipette. A total of 5 tubes containing 4 ml of blood for each, which have undergone centrifugation. A modified double centrifugation protocol proposed by Carneiro *et al.* [7] was used in this study, performed by a laboratory centrifuge (Hettichzentrifugen D-78532 Tuttlingen). The speed of the 1st centrifugation was set at 1800 r.p.m for 8 min resulting in two basic components: Components of the blood cells in the lower fraction and the serum which corresponds to the upper fraction. All contents above the red blood cells were pipetted and transferred to another empty tube of 5 ml capacity without anticoagulant. These samples were again centrifuged at 1000 r.p.m for 8 min. It results a small red fraction at the bottom of each tube and a clear supernatant at the top. A volume of 0.5 ml of the clear supernatant above the red fraction which was pipetted corresponds to the PRP. The total amount of PRP collected is 2.5 ml. All these steps of preparing the PRP were carried out at room temperature (22°C).

Platelets count

The count of platelets was manually performed using a hemocytometer (Neubauer cell improved).

Realization of smears

The purpose of performing whole blood smears and PRP (MGG staining) is to analyze platelet richness and to assess the efficacy of dextrose (ACD) as an anticoagulant in sheep. All smears were performed at each count.

Technical of the injury

Before all surgical procedures, the animals were first tranquilized with acepromazine at a dose of 0.1 mg/kg intramuscularly. After then, the skin was prepared for aseptic surgical procedure by application of an iodine solution of povidone (10% dermal betadine). On the back of each animal, four complete excision wounds of the skin (20×20 mm) were performed on each lateral side and in the vicinity of the vertebral line. Excision was performed under local anesthesia (lidocaine hydrochloride 2%), induced by subcutaneous infiltration at a flow rate of 1 ml/1 cm³ [8]. All the rules of asepsis were respected, and all the wounds remain open and not sutured. The animals were randomly divided into three equal groups of three sheep for each. The administration of the various treatments was performed topically once every 3 days, and the PRP was prepared for each application and activated in addition of chlorure of calcium (0,1 ml of CaCl₂ to each 1 ml of PRP) immediately before its administration [9].

- Group I: Animals treated with PRP.
- Group II: Animals treated with asiaticoside at 2%.
- Group III: Animals treated with saline solution (NaCl 9%).

Post-operative follow-up

A general clinical examination was performed in all animals (animal behavior, body temperature, and cardiorespiratory activity). Within the wounds, a daily macroscopic follow-up was carried out during the whole period of experimentation.

Healing follow-up

Percentage of contraction of the wound

The contraction surface of the wound was measured using a digital caliper on the 3rd, 7th, 14th, 21st, and 28th postoperative days until the wounds were healed. The average percentage of contraction of the wound was calculated according to the equation established by Singh and Sharma [10].

The percentage of wound contraction = $100 \times (\text{wound surface on } 0^{\text{th}} \text{ day} - \text{wound surface on } n^{\text{th}} \text{ day}) / \text{Wound surface on day } 0$; where n = number of days 3rd, 7th, 14th, 21th, and 28th day.

Semi-quantitative histopathological evaluation

Samples of the skin using a biopsy punch from lesion sites of excisions were performed on the 3rd, 7th, 14th, 21st, and 28th postoperative days. The samples were processed by routine histological procedures, first fixed with buffered formaldehyde, then embedded in a paraffin solution, and cut transversely by a microtome into 4 µm thin sections. Tissue sections were stained with hematoxylin-eosin and examined for possible histopathological changes. The histopathological scores established by Vidinsky *et al.* [11], were used in this study, presented as codes from 0 to 3 (Table-1).

Statistical analysis

Descriptive statistical analysis was performed for each variable in this study. The analysis of variance ANOVA between the different groups followed by the least significant difference test, allows specifying the variations of the percentage of contraction. The nonparametric U-test of Mann-Whitney was used for a statistical analysis of the different histopathological scores obtained. SPSS software 23.0 (2015) was used for all analyzes. The values of $p < 0.05$ and $p < 0.01$ were used to determine the level of significance of the differences recorded.

Results

Plasma rich in platelets

The results of the manual counting of thrombocytes using a hemocytometer revealed that the average number of platelets obtained is much higher in the PRP ($1374.8 \pm 164.892 \times 10^3/\mu\text{l}$) in comparison with whole blood ($425.26 \pm 75.23 \times 10^3/\mu\text{l}$). It is approximately thrice higher than that of whole blood (Figure-1c). Repeated observations of the different smears performed, revealed the complete absence of the platelet aggregation phenomenon (Figure-1b), and thus confirmed the importance of the use of dextrose (ACD), as an anticoagulant of choice during the preparation of PRP in the sheep.

Clinical follow-up

No changes were observed in the behavior of the animals. All animals well tolerated this procedure,

and all sheep do not seem affected by the presence of wounds on their backs. No symptoms of aggression or hypersensitivity were observed during the application of the different treatments.

Macroscopic follow-up of wounds

Within different wounds (Figure-2), no complication was observed in lesional sites, such as purulent infections or exuberant granulation tissue formation. However, careful macroscopic observation of different excision wounds has shown progress in contraction of wounds over time. At the end of the 14th day, the reduction of the surface of wounds was observed remarkably (Figure-2g) in wounds for animals of Group I (wounds treated by topical application of PRP) in comparison with animals of Groups II and III (wounds treated with Asiaticoside (Figure-2h) and saline solution (Figure-2i), respectively).

The parameters of healing

Contraction surface of the wound

The results represented by curves in Figure-3 showed the progress of wound contraction in all animals. This progress is particularly remarked in wounds of animals of Group I. At equal rank, careful examination of the results listed in Table-2 revealed significant differences between the different groups of animals in this study. After 1 week postsurgical, the average rate of contraction of wounds in Group (I) was statistically significant ($p < 0.05$) compared with those in Groups (II) and (III). We note that the mean percentage of contraction in

Table-1: Description of the different histopathological scores of the semi-quantitative evaluation.

Score	Epithelialization	PMNL	Macrophages	Fibroblasts	Neo-angiogenesis	Neo-collagen
0	Thickness of cut edges	Minimum	Minimum	Minimum	Minimum	Minimum
1	Migration of epithelial cells	mild	mild	mild	mild	mild
2	Bridging of the excision	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate
3	complete regeneration	Marked	Marked	Marked	Marked	Marked

PMNL=Polymorphonuclear leukocyte

Table-2: Variations of the percentage of contraction of the wound in the different groups.

Day of observation	Groups	Mean±SD	n	95% CI		F	p
				Lower limit	Upper limit		
Day 3	I	21.86±3.70	12	12.65	31.06	0.764	0,506
	II	17.95±4.19	12	7.52	28.38		
	III	20.78±4.07	12	10.66	30.90		
Day 7	I	34.93±6.11*	12	25.20	44.65	4.001	0.057*
	II	24.43±2.96*	12	20.14	28.71		
	III	23.64±8.63*	12	9.90	37.37		
Day 14	I	68.80±4.64**	12	57.26	80.33	13.737	0.004**
	II	47.66±5.09**	12	39.55	55.77		
	III	42.90±9.38**	12	19.58	66.22		
Day 21	I	79.83±1.45	12	76.22	83.43	2.935	0.119
	II	78.55±3.78	12	75.53	84.57		
	III	73.71±3.80	12	94.25	83.16		
Day 28	I	91.90±1.63	12	87.85	95.95	0.345	0.718
	II	87.55±9.78	12	71.97	103.12		
	III	87.17±8.79	12	73.18	101.16		

Group I=Animals treated with PRP; Group II=Animals treated with asiaticoside at 2% and Group III=Animals treated with saline solution (NaCl 9%). M=Mean, SD=Standard-deviation, CI=Confidence interval, *Denote a significant difference ($p < 0.05$), **Denote a highly significant difference ($p < 0.01$)

the group of animals treated with PRP was (34.93 ± 6.11) whereas it was (24.43 ± 2.96) and (23.64 ± 8.63) in the

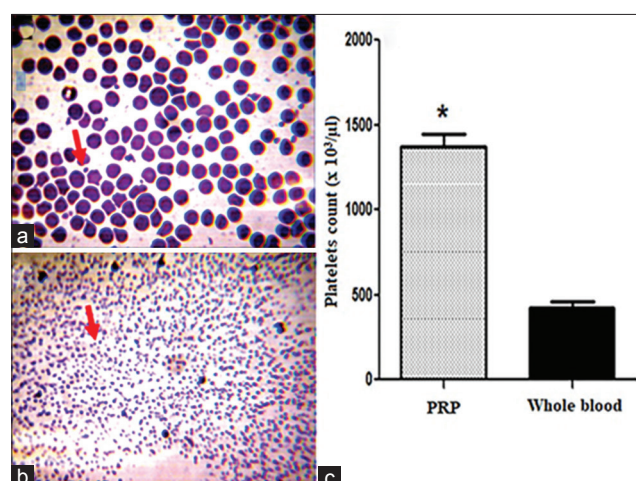


Figure-1: (a) Smear showing platelets (arrows) of whole blood. (b) Smear showing platelets (arrows) of platelet-rich plasma (PRP) (M.G. Gx100 stain). (c) Average number of platelets in whole blood and in PRP. *Denotes statistically different significance compared with whole blood ($p < 0.05$)

group of animals treated with asiaticoside and the saline solution, respectively. After 2 weeks of injury, the difference is highly significant ($p < 0.01$) between the different groups. The mean percentage of wound contraction for animals of Group I treated with PRP was (68.80 ± 4.64) compared with (47.66 ± 5.09) and (42.90 ± 9.38) in Groups II and III, treated with asiaticoside and saline solution, respectively.

Semi-quantitative histopathological evaluation

Histopathological examination (Figures 4-6) and semi-quantitative evaluation (Table-3) showed differences in the progression of healing in the different groups.

At the 3rd day of the healing evolution, epithelialization was observed on the inner wall of the free edge of wounds treated with PRP (Figure-4a), whereas in the wounds of the group treated with asiaticoside, it was less important (Figure-4b). No epithelialization was observed in the saline-treated wounds, with wounds appearing covered with blood coagulum (Figure-4c).

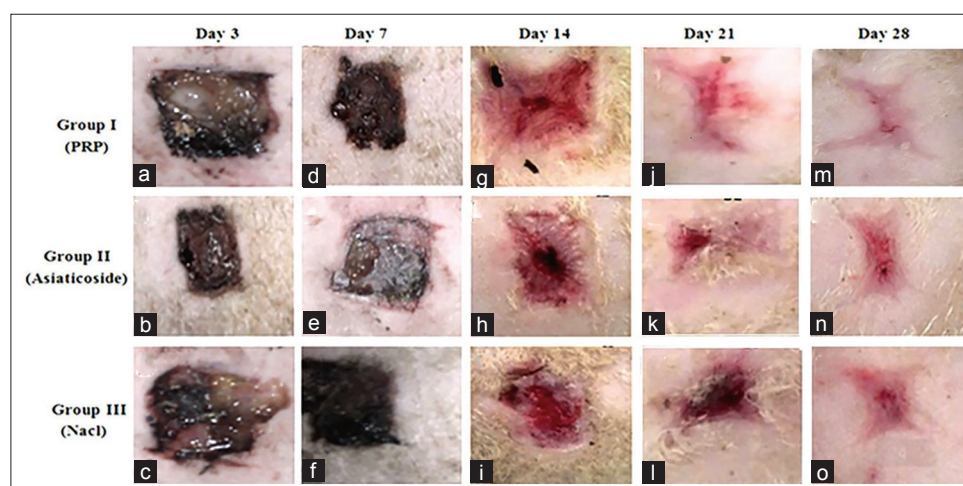


Figure-2: (a-o) Macroscopic observations of healing at different periods of time.

Table-3: Results of the semi-quantitative histopathological evaluation. Each calculated parameter was presented by its mean and standard deviation (mean $\pm$ SD).

Jour	Group	Epithelization	PMNL	Macrophages	Fibroblasts	Neo-angiogenesis	Neo-collagen
Day 3	I	0.9 ± 0.73	$2.4 \pm 0.48^*$	1.3 ± 0.48	1.6 ± 0.51	1.4 ± 0.51	0.7 ± 0.48
	II	0.5 ± 0.52	1.9 ± 0.73	1.4 ± 0.51	1.6 ± 0.51	1.4 ± 0.51	0.4 ± 0.51
	III	0.3 ± 0.48	1.5 ± 0.7	1.5 ± 0.48	1.4 ± 0.51	1.2 ± 0.42	0.3 ± 0.48
Day 7	I	2.2 ± 0.78	0.9 ± 0.73	$1.2 \pm 0.42^*$	$2.1 \pm 0.73^*$	1.63 ± 0.5	1.6 ± 0.51
	II	2.1 ± 0.73	0.8 ± 0.63	1.5 ± 0.51	1.7 ± 0.48	1.5 ± 0.52	1.4 ± 0.51
	III	1.8 ± 0.91	0.7 ± 0.67	1.6 ± 0.91	1.6 ± 0.51	1.3 ± 0.48	1.3 ± 0.48
Day 14	I	2.8 ± 0.42	0.6 ± 0.52	1.0 ± 0.52	$2.7 \pm 0.48^*$	2.6 ± 0.51	2.7 ± 0.48
	II	2.6 ± 0.51	0.5 ± 0.52	1.2 ± 0.51	2.5 ± 0.52	2.3 ± 0.48	2.5 ± 0.52
	III	2.4 ± 0.51	0.3 ± 0.48	1.3 ± 0.61	2.4 ± 0.51	2.1 ± 0.73	2.4 ± 0.51
Day 21	I	$3.0 \pm 0^*$	0.5 ± 0.52	0.5 ± 0.52	3.0 ± 0	3.0 ± 0	2.9 ± 0.31
	II	2.8 ± 0.31	0.3 ± 0.48	0.8 ± 0.73	2.8 ± 0.42	2.8 ± 0.31	2.9 ± 0.31
	III	2.4 ± 0.52	0.1 ± 0.31	1.0 ± 0.73	2.5 ± 0.52	2.4 ± 0.52	2.6 ± 0.53
Day 28	I	3 ± 0	0.0 ± 0	0.0 ± 0	1.9 ± 0.73	1.8 ± 0.91	3.0 ± 0
	II	2.9 ± 0.31	0.0 ± 0	0.3 ± 0.94	1.8 ± 0.91	2.0 ± 1.15	3.0 ± 0
	III	2.7 ± 0.48	0.1 ± 0.31	0.6 ± 0.52	1.9 ± 0.73	2.2 ± 0.78	2.8 ± 0.31

Group I=Animals treated with PRP, Group II=Animals treated with asiaticoside at 2%, Group III=Animals treated with saline solution (NaCl 9%), *Denote a significant difference ($p < 0.05$). PMNL=Polymorphonuclear leukocyte, SD=Standard-deviation, PRP=Platelet-rich plasma

Regarding the semi-quantitative evaluation of epithelialization, our results revealed that a significant difference ($p < 0.05$) recorded at the 21st day of healing between the group of wounds treated with PRP and the group of control wounds: (3.0 ± 0) against (2.4 ± 0.52), respectively. Concerning inflammatory cells (polymorphonuclear leukocyte [PMNL]), our histopathological examination revealed a massive infiltrate at the edges of the PRP-treated wounds compared with the wounds of the other groups (Figure-5a). In addition,

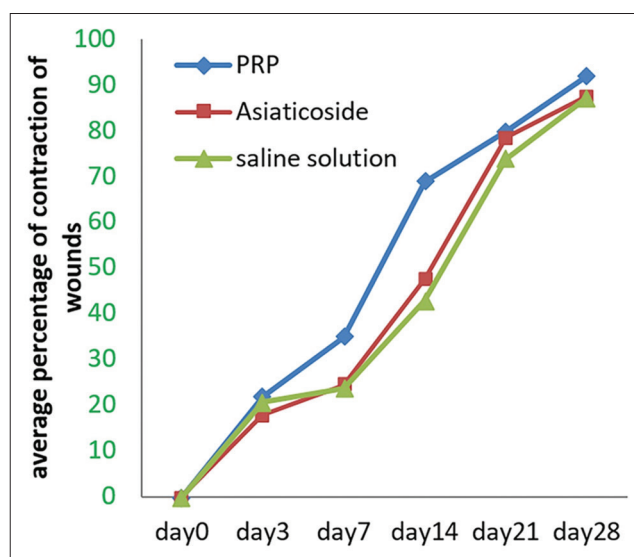


Figure-3: Variations in the percentage of contraction of the wound according to the different treatments administered.

the semi-quantitative evaluation revealed a significant difference ($p < 0.05$), observed in favor of PMNL (wounds of Group I: 2.4 ± 0.48 , compared with wounds of Groups II and III: 1.9 ± 0.73 and 1.5 ± 0.7 , respectively). For the other parameters, no histopathological changes were observed, and no organization of newly formed collagen was evident in the different groups.

At day 7, the histopathological examination revealed a certain accentuation of the degree of epithelialization observed in different wounds. PRP-treated wound edge surfaces appeared (Figure-4d), entirely covered by epithelial tissue compared to other control wounds (Figure-4e and f). However, no connection of the edges of wounds was observed in the different groups. In addition, the semi-quantitative evaluation of epithelialization revealed no significant difference. Concerning the collagen, its organization seemed much denser and organized at the level of wounds treated with PRP (Figure-4d) in comparison with other wounds. For other parameters, semi-quantitative evaluation revealed significant variations in fibroblasts and macrophages (Table-3). Regarding fibroblasts (wounds of animals of Group I: 2.1 ± 0.73 against the wounds of animals of Groups II and III: 1.7 ± 0.48 and 1.6 ± 0.51 respectively), for macrophages (Group I wounds: 1.2 ± 0.42 compared to Group III wounds: 1.6 ± 0.91 , respectively).

At day 14, histopathological examination showed a cardinal change in wound healing, characterized by the union of wound margins in the different groups (Figure-4), almost complete with better granulation

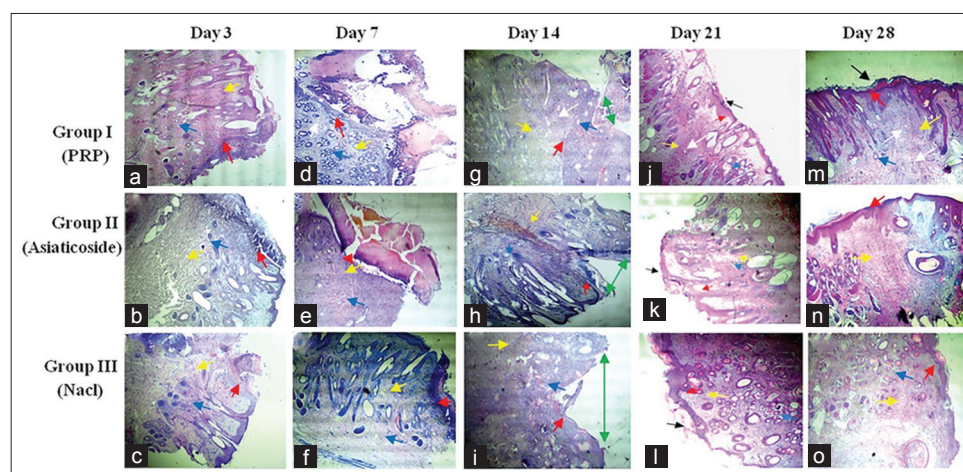


Figure-4: Micrograph of various histological aspects (transverse section) from cutaneous biopsies performed in the 3rd (a-c), 7th (d-f), 14th (g-i), 21st (j-l) and 28th (m-o) day after injury (The magnification is 40 $\times$). Red arrow (re-epithelialization), blue arrow (neovascularization), yellow arrow (newly formed fibrin network), black arrow (keratinization), green arrow (injury site) and white arrow (newly formed hair follicle). At day 3, epithelialization was observed on the upper part of the inner wall of the wound margins in the different groups, well marked in wounds treated with platelet-rich plasma (PRP) and asiaticoside (a and b). The edges of the wound were covered by blood coagulum and inflammatory cells in the control wounds (c). Nothing is particular about the other parameters. At day 7, accentuation of epithelialization in wounds treated with PRP, the epithelium appears to cover all the free wound edge (d). No connection of the wound margins in the different groups. A large unorganized collagen deposit was observed in wounds treated with PRP (d), random loose collagen bundles observed in the other groups (e and f). For other parameters, neovascularization is important in the group treated with PRP (d) and appearance of hair follicles. Persistence of inflammatory infiltrate in control wounds (f). At day 14, union of the wound margins in the different groups (g-i), almost complete with a better developed granulation tissue in wounds treated with PRP (g). At day 21, the new collagen bundles densely filled the junction of the wound into the PRP (j) treated group. At day 28, complete healing in different groups (m-o) with different aspects, complete keratinization of the skin, perfect reorganization of collagen and reappearance of hair follicles in wounds treated with PRP (m), advanced fibrosis in treated group by asiaticoside (n) and poor delayed healing in the control group (o).

tissue in wounds treated with PRP (Figure-4g). In addition, the fibroblast variation study revealed a significant difference ($p < 0.05$) in favor of wounds of Group I: 2.7 ± 0.48 against wounds of Group III: 2.4 ± 0.51 .

At day 21, complete epithelialization was observed in wounds treated with PRP, with fully joined tissues. The new collagen bundles were densely filled the site of the wound treated with PRP (Figure-4j). In the other groups, we noted the continuation of the rehandling of the epithelialization and the reorganization of the collagen (Figure 4k and l). The semi-quantitative evaluation revealed a highly significant difference in favor of PRP-treated wounds fibroblasts: (3.0 ± 0 compared with wounds of Group III: 2.4 ± 0.52).

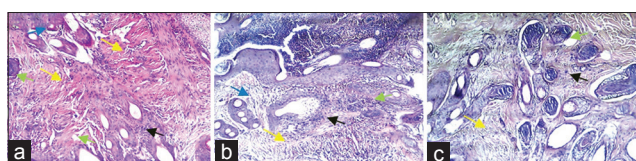


Figure-5: Hematoxylin and eosin stains of wound tissue at day 3 (a-c) after injury. (The magnification is $\times 100$). Blue arrow (neovascularization), yellow arrow (newly formed fibrin network), black arrow (nuclear polymorphic leucocytes) and green arrow (macrophage). (a): Section of a wound treated by platelet-rich plasma, massive recruitment of inflammatory cells, large collagen deposition and a reduced number of macrophages. (b) Representative tissue from wounds treated with asiaticoside, moderate inflammatory cells, and a looser collagen network with a small number of macrophages. (c) Tissue from wounds treated with saline solution, has a much reduced number of inflammatory cells and an important number of macrophages.

At day 28, histopathological examination showed wound healing in the different groups. Perfect healing was observed in wounds of Group I, characterized by a reorganization of collagen with keratinization of the skin and reappearance of hair follicles in the site of wound (Figure-4m). Poor scarring was observed in the other groups (advanced fibrosis in wounds treated by asiaticoside, poor delayed healing in control wounds). For the other parameters, our study was showed that the number of newly formed capillaries increased considerably during the first 2 weeks following the injury and that it only decreased after the 3rd week of evolution. On the contrary, with regard to the newly formed collagen, its proportion was continuously growing.

Discussion

Nowadays, the use of PRP offers a new multi-disciplinary approach in full evaluation whether in human or veterinary medicine [1]. In this context, several widely controversial studies have been published to evaluate their biological effects of tissue regeneration, through platelets and growth factors that they released at the site of injury [3,4]. Its autologous character gives it, moreover, excellent biocompatibility and biodegradability, while avoiding the risk of transmission of pathogens. In humans and animals, numerous publications have been reported on its use in a wide variety of medical fields (osteoarticular, maxillofacial, neurosurgery, skin scarring, plastic surgery, etc.) [12,13]. However, in sheep, there is little research on the evaluation of its effect on tissue scarring, particularly cutaneous, where most researchers have focused on osteoarticular investigation [13]. In addition, some authors have reported that the

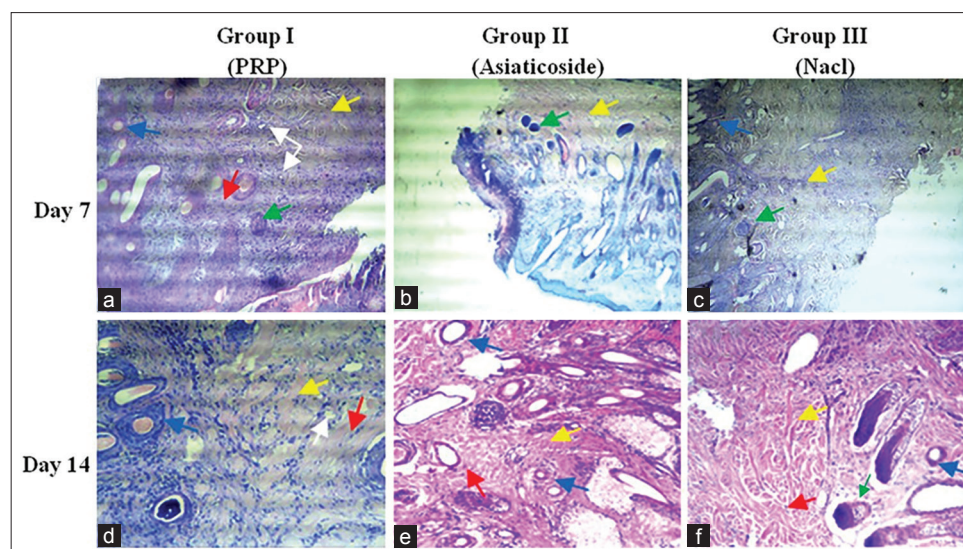


Figure-6: Hematoxylin-eosin stains from wound tissue made at day 7 (a-c) and 14 (d-f) after injury. (The magnification is $100\times$). Yellow arrow (newly formed fibrin network), red arrow (Fibroblasts), blue arrow (neovascularization), white arrow (hair follicle) and green arrow (macrophage). At day 7, a significant number of fibroblasts, and newly formed collagen bundles observed in wounds treated with platelet-rich plasma (PRP) (a), which the bundles show fibers left sparse, and that they appear to not fill the wound site. In the other groups, collagen is less abundant with irregular appearance and persistence of macrophages. At day 14, numerous fibroblasts observed in wounds treated with PRP (d), which piles up between condensed bundles of collagen. Neovascularization is important with reappearance of hair follicles. In the other groups, loose, unorganized collagen was observed (e and f).

prevalence of skin lesion complications in ruminants, have a tendency to increase dramatically (infections such as mastitis and panaris, parasitic skin infestations with different forms of gal and burns in case of fire, etc.) [14]. According to Chicharro-Alcántara *et al.* [12] scarring can have a biomedical and economic impact that is sometimes feared. Therefore, the need to establish new strategies, such as regenerative therapies based on the PRP, remains a challenge. This research aims to examine the effect of PRP, with the hypothesis that the latter stimulates epithelialization and keratinization, accelerates contraction and promotes collagen remodeling in different tissues. We performed a comparison of cutaneous healing using three different treatments (PRP, asiaticoside, and saline) on wounds of complete excision of the skin in sheep.

In our study, the inspection of skin excision sites during the first days after injury of the skin revealed no complication or apparent signs of infection. This could be due to the excellent care of the wounds and the small number of animals used. Our results are in accord with those reported from numerous studies. Smets *et al.* [2] suggested that the biological nature of PRP could significantly affect the healing process especially when the PRP is prepared by simple centrifugation. The latter may contain variable amounts of cells of the white line, responsible for the degradation of the extracellular matrix by releasing pro-inflammatory factors [4,15]. Indeed, the results obtained from this recent study, confirm that our PRP was practically free of all cells of the white line (Figure-1b). According to Kaux *et al.* [4], the use of a double centrifugation regime is unavoidable, because this method also makes it possible to avoid free radicals derived from residual red blood cells, thus being able to create infectious foci harmful to tissue structures. Concerning the number of platelets obtained using this protocol, our results are within very good concentration limits established by Arora *et al.* [16] and Whitman *et al.* [17]. These authors stated that the ideal platelet concentration for PRP to present stimulatory properties would be 2-3 folds higher. Regarding the choice of anticoagulant, the repeated observations of the different smears performed (Figures-1a and b), confirmed the effectiveness of dextrose during the preparation of PRP in sheep. Lei *et al.* [18] reported that dextrose (ACD) was the appropriate anticoagulant for PRP preparation, and the quality of PRP was closely related to the type of anticoagulant used.

The morphometric study of the percentage of contraction of wounds has shown that there is remarkable progress in the skin healing process for animals of Group I treated with PRP. At the 7th day of evolution, a significant difference was observed between wounds of Group I, and wounds of Groups II and III. This difference becomes glaring and highly significant at the 14th day of healing progress. Our results are similar to those reported by some authors. Indeed, Al-Bayati *et al.* [8] confirmed that the subcutaneous

infiltration of PRP accelerates the contraction of wounds in the goat from the 1st post-operative week. Some authors [3,19] reported that this acceleration of contraction is directly related to the potential effects of therapeutic agents presented by growth factors accumulated in the platelet granules. These factors include vascular endothelial factor, which promotes angiogenesis, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor- β . These factors contributed in particular to the migration of leucocytes to the site of the wound [20,21], as well as to the proliferation of fibroblasts in myofibroblasts and to the synthesis of the constituents of the extracellular matrix. Other authors reported that contraction progress related to both myofibroblasts and fibroblasts that can organize connective tissue with the early consolidation of collagen by pulling the skin inward [19,22].

Semi-quantitative evaluation of histopathological scores obtained revealed significant differences for a certain number of healing parameters. Indeed, our results confirm that the topical application of PRP allowed a good reepithelialization (Figure-4m), with earlier neovascularization, followed by a more elaborate collagen reorganization. Alishahi *et al.* [23] reported that skin infiltration of PRP accelerated wound healing in dogs and allows having a more elaborate granulation tissue.

At the 3rd day of healing, our results are encouraging, testifying the biological effectiveness of PRP, the latter capable potentially accelerating of healing process by massive recruitment of nuclear polymorphs (Figure-5a). In addition, this new technology could also increase the rate of angiogenesis. Our results are in agreement with those reported in many studies, Ostvar *et al.* [6] reported that the use of PRP increases the rate of new loops of capillaries observed in skin wounds in rabbits. Darré *et al.* [22] suggested that this neovascularization during skin wounds favors the arrival of inflammatory cells with a function of debridement of the lesional focus in association with macrophages [24]. However, repeated histopathological observations of biopsies conducted from wounds treated with PRP, revealed that the number of macrophages was less important significant compared with the wounds of the other groups (Figure-5c). This confirms the finding already established by Kaux *et al.* [4], who suggested that the use of PRP by tendon infiltration delimited chronic inflammation by a reduction of the number of macrophages.

Concerning the study of fibroblast variation, our results revealed significant differences recorded at the 7th and 14th day of healing, in favor of wounds of animals of Group I. This could be explained by some authors [20,21], to the associated effects of certain PRP growth factors that can promote fibroblast differentiation and collagen formation. In addition, the careful observation of the various histopathological aspects of the micrograph of Figure-6, allowed us to think that this preparation (PRP) could contribute in

the process of remodeling and reworking of collagen. Indeed, Kaux *et al.* [4] reported in another similar study in humans that the level of collagen in the group treated by tendon infiltration of PRP increased significantly at the 5th day of healing.

However, the exact mechanism of PRP action in collagen remodeling is still unclear. Ibrahim *et al.* [9] have suggested that collagen remodeling is likely to be affected by metalloproteinases, especially MMP-1 and MMP-3 proteins that can digest the various structural components of ECM. In addition, the induction of MMP-1 in the skin can facilitate the removal of damaged collagen fragments in the tissue of the dermal matrix, thus providing a better basis for the deposition of new collagen necessary for the improvement of wounds.

Finally, concerning the reconstruction of hair follicles, the results of this present study have showed that there is some reconstitution of the dermal papilla cells, observed in the site of healing for wounds treated by PRP. Our results are in agreement with those established by Ferdousy *et al.* [25]. These authors reported in a similar study in the goat that intradermal injection of PRP into skin wounds greatly improved healing with the appearance of hair follicles. This could be explained by Wang *et al.* [26], with the potential effects of PRP specially growth factors, which significantly increases the level of Pal (alkaline phosphatase) and versican (chondroitin sulfate proteoglycan). These can promote the proliferation of human hair dermal papilla cells. In addition, Miao *et al.* [27] have suggested that the previously mentioned growth factors may induce hair follicle reconstitution; however, the exact tests on its effectiveness are limited.

Conclusion

Wound healing is a complex process, resulting from the interaction between a large number of cell types, extracellular matrix proteins, and mediators such as cytokines and growth factors. In this study, we evaluated the therapeutic efficacy of PRP obtained by a double centrifugation protocol, on cutaneous wound healing induced by complete excision of the skin in sheep. Our results showed that the use of this topical in sheep, reduced inflammation during the first 3 days of healing, reduced the contraction surface of wounds from the 1st week post-surgical and promotes epithelialization in 3 weeks of healing. All of these current findings should be accepted as preliminary. Finally, to arrive at full scientific validity, it seems necessary to consider other methods of investigation, using advanced techniques to clarify in an exact way the biological effects of the PRP.

Authors' Contributions

DB and BO have contributed equally in this research. Both authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

To the staff of the Department of Veterinary Medicine, University of Batna 1, Batna, Algeria.

The authors are grateful to the technical staff of the University Hospital of Batna (Histopathology Department), Algeria, to provide all the necessary facilities for performing the histopathological study. This research was funded by the University of Batna 1, Algeria. (Grant No. F01320140031 01/01/2015).

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Dohan, S., Dohan, A., Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M.O. and Dohan, D. (2005) Autologous platelet concentrates for topical use. *EMCODO*, 1: 141-180.
2. Smets, F., Croisier, J.L., Forthomme, B., Crielaard, J.M. and Kaux, J.F. (2012) Clinical applications of platelet-rich plasma (PRP) in tendon lesions: A literature review. *Sci. Sports*, 153(27): 141-153.
3. Anitua, E. (1999) Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of sites for implants. *Int. J. Oral. Maxillofac. Pathol.*, 14: 529-535.
4. Kaux J.F., Drion P., Croisier J.L., Colige, A., Libertiaux, V., Gothot, A. and Crielaard, J.M. (2014) Plasma rich in platelets and tendinous lesions. *Rev. Med. Liege*, 69: 72-77.
5. Gillitzer, R. and Goebeler, M. (2001) Chemokines in cutaneous wound healing. *J. Leukoc. Biol.*, 69(4): 513-521.
6. Ostvar, O., Shadvar, S., Yahaghi, E., Azma, K., Fayyaz, F.A., Koorosh, A. and Nowrouzian, I. (2015) Effect of platelet-rich plasma on the healing of cutaneous defects exposed to acute to chronic wounds: A clinico-histopathologic study in rabbits. *Diagn. Pathol.*, 10: 85.
7. Carneiro, M.O., Barbieri, C.H. and Neto, J.B. (2013) Platelet-rich plasma gel promotes regeneration of articular cartilage in knees of sheep's. *Acta Ortop. Bras.*, 21(2): 80-86.
8. AL-Bayati, A.H., Al-Asadi R.N., Mahdi A.K. and Al-Falahi, N.H. (2013) Effects of autologous platelets rich plasma on full-thickness cutaneous wounds healing in goats. *Int. J. Anim. Vet. Adv.*, 5(6): 233-239.
9. Ibrahim, Z.A.L.S., El-Tatawy, R.A., El-Samongy, M.A. and Ali, D.A.M. (2015) Comparison between the efficacy and safety of platelet-rich plasma vs. microdermabrasion in the treatment of striae distensae: Clinical and histopathological study. *J. Cosmet. Dermatol.*, 14: 336-346.
10. Singh, S. and Sharma, N. (2014) Evaluation of wound healing activity of *Acacia auriculiformis* A. cunn. stem. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 7(2): 204-207.
11. Vidinsky, B., Gal, P., Toporcer, T., Longauer, F., Lenhardt, A., Bobrov N. and Sabo, J. (2006) Histological study of the first seven days of skin wound healing in rats. *Acta Vet.*, 75: 197-202.
12. Chicharro-Alcántara, D., Rubio-Zaragoza, M., Damiá-Giménez, E., Carrillo-Poveda, J.M., Cuervo-Serrato, B., Peláez-Gorrea, P. and Sopena-Juncosa, J.J. (2018) Platelet-rich plasma: New insights for cutaneous wound healing management. *J. Funct. Biomater.*, 9(10): 1-20.
13. Abrams, G.D., Frank, R.M., Fortier, L.A. and Cole, B.J. (2013) Platelet-rich plasma for articular cartilage repair. *Sports Med. Arthrosc. Rehabil. Ther. Tech.*, 21(4): 213-219.
14. Sardari, K., Kakhki, E.G. and Mohri, M. (2007) Evaluation of wound contraction and epithelialization after subcutaneous administration of Theranekron® in cows. *Comp. Clin. Pathol.*, 16: 197-200.
15. Kaux, J.F., Le Goff, C., Renouf, J., Peters, P., Lutteri, L., Gothot, A., Albert, A. and Crielaard, J.M. (2010) Comparison of the platelet concentrations obtained in platelet-rich plasma (PRP) between the GPS II and GPS III

- systems. *Pathol. Biol.*, 59: 275-277.
16. Arora, N.S., Ramanayake, T., Ren, Y.F. and Romanos, G.E. (2009) Platelet-rich plasma: A literature review. *Implant. Dent.*, 18: 303-310.
 17. Whitman, D.H., Berry, R.L and Green, D.M. (1997) Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral. Maxillofac. Surg.*, 55(11): 1294-1299.
 18. Lei, H., Gui, L. and Xiao, R. (2009) The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin. Biochem.*, 42(13-14): 1452-1460.
 19. Swaim, S.F., Hinkle, S.H. and Bradley, D.M. (2001) Wound contraction: Basic and clinical factors. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, 23: 20-24.
 20. Golebiewska, E.M. and Poole, A.W. (2015) Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.*, 29: 153-162.
 21. Shin, M.D. J., Park, J.H. and Park, M.D.I. (2015) Pirfenidone inhibits transforming growth factor β 1-induced extracellular matrix production in nasal polyp-derived fibroblasts. *Am. J. Rhinol. Allergy J.*, 29(6): 408-413.
 22. Darré, T., Metowogo, K., Lawson-Evi, P., Eklun-Gadegbeku, K., Kodjo, A.A., Napo-Koura, G. and Gbeassor, M. (2014) Effet topique de l'extrait topique de l'extrait hydro éthanolique de l'acacia nilotica sur la cictrisation cutanées des brulures de second degré. *Eur. Sci.*, 10(30): 212-221.
 23. Alishahi, K.M., Mofidpoor, H. and Alishahi, M.A.K. (2014) Histopathological evaluation of the effect of platelet-rich fibrin on canine cutaneous incisional wound healing. *Int. J. Agro Vet. Med. Sci.*, 8(5): 134-141.
 24. Leal, E.C., Carvalho, E., Tellechea, A., Kafanas, A., Tecilazich, F., Kearney, C., Kuchibhotla, S., Auster, M.E., Kokkotou, E., Mooney, D.J., LoGerfo, F.W., Pradhan-Nabzdyk, L. and Veves, A. (2015) Substance P promotes wound healing in diabetes by modulating inflammation and macrophage phenotype. *Am. J. Pathol.*, 185(6): 1638-1648.
 25. Ferdousy, N.F.E., Rahman, M.M., Sattwikesh, P. and Khan, M.A.H.N.A. (2013) Role of platelet-rich plasma gel in the wound healing of black Bengal goat. *IOSR-JAVS*, 6(5): 14-21.
 26. Wang, Y., Tang, L., Zhu, F. and Jia, M. (2017) Platelet-rich plasma promotes cell viability of human hair dermal papilla cells (HHDPCs) *in vitro*. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 10(12): 11703-11709.
 27. Miao, Y.M.D., Sun, Y.B., Sun, X.N., Du, B.J., Jiang, J.D. and Hu, Z.Q. (2013) Promotional effect of platelet-rich plasma on hair follicle reconstitution *in vivo*. *Dermatol. Surg.*, 39: 1868-1876.

Résumé : Cette étude a été réalisée pour évaluer l'activité cicatrisante du PRP autologue par son application topique sur des lésions, réalisées expérimentalement, au niveau de la peau chez le mouton.

Afin d'apprécier un protocole fiable de préparation du PRP autologue chez le mouton, nous avons procédé à une étude comparative entre quatre protocoles différents. Les résultats obtenus ont montré que le nombre moyen de plaquettes dans le sang total était de $521,56 \pm 97,01 \times 10^3 / \mu\text{L}$. Les échantillons du PRP des protocoles I et III ont montré des numérations plaquettaires moyennes significativement plus élevées ($1438,25 \pm 221,72 \times 10^3 / \mu\text{L}$ et $1430,75 \pm 293,63 \times 10^3 / \mu\text{L}$, respectivement) en comparaison avec les protocoles II et IV. Il apparaît donc que le PRP préparé par le protocole I est le plus adéquat et il a montré le nombre moyen plaquettaire le plus élevé.

Pour évaluer l'activité cicatrisante du PRP, les animaux ont été divisés au hasard en trois groupes égaux de trois moutons pour chacun et des plaies d'incision de pleine épaisseur et des plaies d'excision complète de la peau ont été créées sur la surface dorsale de chaque animal. Dans le groupe I, les plaies ont été traitées par le PRP, dans le groupe II les plaies ont été traitées par un Madécassol tandis que les plaies du troisième ont été traitées par une solution saline. Les différents traitements ont été administrés par voie topique à un intervalle de trois jours. Des mesures morphométriques de la surface de contraction des plaies et des biopsies histopathologiques ont été effectuées au 3^{ème}, 7^{ème}, 14^{ème}, 21^{ème} et 28^{ème} jour de cicatrisation. Les résultats morphométriques obtenus montrent qu'il avait des différences significatives enregistrées au 7^{ème} et 14^{ème} jour de la guérison en faveur des animaux du groupe I. L'évaluation histopathologique semi-quantitative a montré que le PRP réduit l'inflammation pendant les trois premiers jours post-opératoires, et favorise l'épithélialisation en trois semaines de guérison.

Mots clés : Peau, plaie, plasma, plaquettes, cicatrisation, mouton.

ملخص: أجريت هذه الدراسة لتقييم تأثير البلازما الغنية بالصفائح الدموية الذاتية على التئام الجروح وذلك باستعماله الموضعي على جروح جلدية محدثة تجريبيا عند الأغنام. لتحديد طريقة مثلى لتحضير البلازما الغنية بالصفائح الدموية عند الأغنام، اعتمدنا على دراسة مقارنة بين أربع طرق مختلفة لتحضير البلازما الغنية بالصفائح الدموية الذاتية. أظهرت النتائج أن متوسط عدد الصفائح الدموية في الدم بأكمله كان $521,56 \pm 97,01 \times 10^3 / \mu\text{L}$ ميكروليتر. كما بينت الدراسة أيضا أن متوسط الصفائح الدموية كان أعلى بكثير في المجموعتين الأولى والثانية ($1438,25 \pm 221,72 \times 10^3 / \mu\text{L}$ و $1430,75 \pm 293,63 \times 10^3 / \mu\text{L}$ ميكروليتر على التوالي) مقارنة بالمجموعتين الثالثة والرابعة. أظهرت النتائج أن الطريقة الأولى هي الطريقة المثلى للحصول على أكبر عدد من الصفائح الدموية مقارنة بالطرق الأخرى.

لتقييم تأثير البلازما الغنية بالصفائح الدموية على التئام الجروح، تم إجراء جروح قطعية وجروح نزغية على ظهر كل حيوان وقد شملت سمك الجلد بأكمله. تم تقسيم الحيوانات عشوائيا إلى ثلاث مجموعات متساوية من ثلاث خرفان لكل منها. في المجموعة الأولى، تم علاج الجروح بال PRP، في المجموعة الثانية تم علاج الجروح بـ Madécassol وفي المجموعة الثالثة تم علاجها بالحلول الملحي. استعملت العلاجات المختلفة موضعيا كل ثلاث أيام. أجريت قياسات مورفومترية لتحديد تقلص سطح الجروح كما تم أخذ عينات نسيجية في اليوم 3، 7، 14، 21 واليوم 28 بعد الإصابة بالجروح. أظهرت النتائج المورفومترية فروق ذات دلالة إحصائية تم تسجيلها في اليوم 7 و 14 للشفاء لصالح حيوانات المجموعة الأولى. أظهر تقييم الدراسة النسيجية النصف كمية أن استعمال البلازما الغنية بالصفائح الدموية يقلل من التهاب الجروح في الأيام الثلاثة الأولى بعد الإصابة ويحسن التئام الظاهري للجلد في مدة ثلاثة أسابيع.

الكلمات الدالة: الجلد، الجروح، البلازما، الصفائح الدموية، التئام، الأغنام.

Summary: This study was carried out to evaluate the healing activity of autologous PRP by its topical application to the skin experimentally injured in a sheep model.

In order to appreciate a reliable protocol for the preparation of autologous PRP in sheep, we have proceeded by a comparative study between four different protocols of PRP preparation. The results obtained showed that the mean number of platelets in whole blood was $521.56 \pm 97.01 \times 10^3 / \mu\text{L}$. Protocol I and III PRP samples showed significantly higher mean platelet counts ($1438.25 \pm 221.72 \times 10^3 / \mu\text{L}$ and $1430.75 \pm 293.63 \times 10^3 / \mu\text{L}$ respectively) compared to protocol II and IV. Therefore, it appears that the protocol used in group I PRP revealed the highest platelet mean number in comparison to the other methods.

To evaluate its healing activity, full-thickness incision wounds, and complete excisional wounds of skin were created on the dorsal surface of each animal. The animals were randomly divided into three equal groups of three animals for each group. In group I, wounds were treated with PRP, in group II wounds were treated with Madécassol while in group III wounds were treated with saline. The different treatments were administered topically at an interval of three days. Morphometric measurements of the contraction of the surface of wounds and histopathological biopsies were performed on the 3rd, 7th, 14th, 21st and 28th day of healing. Morphometric results showed significant differences recorded on the 7th and 14th postoperative days in favor of group I animals. Semi-quantitative histopathological evaluation showed that PRP reduces inflammation during the first three post operative days, and promotes epithelialization in three post operative weeks.

Key words: skin, wounds, plasma, platelets, healing, sheep.