

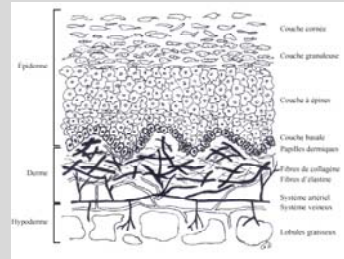
D.U. de cicatrisation des plaies, brûlures et nécroses

La cicatrisation normale : mécanismes physiologiques et modèles expérimentaux

Franck Verrecchia  
INSERM U957, Faculté de Médecine, Nantes

1<sup>ère</sup> Partie Les acteurs cellulaires de la cicatrisation

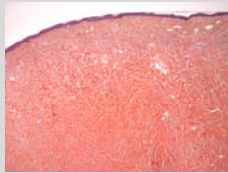
1) les **kératinocytes** = 85% des cellules de l'épiderme, % en 4 couches



**Couche basale:**  
- rangée unique de cellules cylindriques  
- renouvellement de l'épiderme par mitose des cellules

1<sup>ère</sup> Partie Les acteurs cellulaires de la cicatrisation

2) les **fibroblastes** = cellules résidentes du derme



Coupe de peau, marquage au rouge sirius

Sécrétion de la majorité des composants de la **MEC** (collagènes, l'élastine, les glycoprotéines de structure.....)

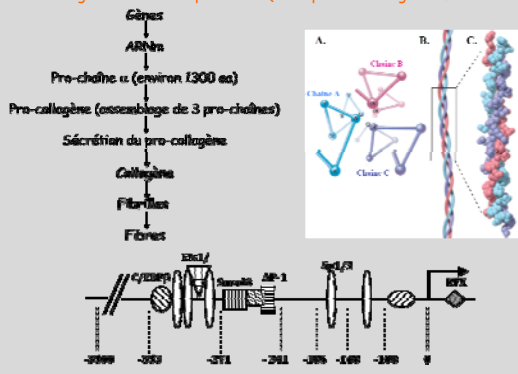
1<sup>ère</sup> Partie Les acteurs cellulaires de la cicatrisation

2) les **fibroblastes** = synthèse des collagènes

Type et chaînes α	Forme moléculaire	Caractéristiques et composition moléculaire
Type I α <sub>1</sub> (I) α <sub>2</sub> (I)	fibrillaire	Le moins commun et le plus abondant [α <sub>1</sub> (I)] <sub>2</sub> [α <sub>2</sub> (I)]
Type III α <sub>1</sub> (III)	fibrillaire	Derme, paroi artérielle [α <sub>1</sub> (III)] <sub>2</sub>
Type IV α <sub>1</sub> (IV) α <sub>2</sub> (IV) α <sub>3</sub> (IV) α <sub>4</sub> (IV) α <sub>5</sub> (IV)	réseau plan	Membranes basales [α <sub>1</sub> (IV)] <sub>2</sub> [α <sub>2</sub> (IV)] [α <sub>1</sub> (IV)] <sub>2</sub> [α <sub>3</sub> (IV)] [α <sub>1</sub> (IV)] <sub>2</sub> [α <sub>4</sub> (IV)]
Type V α <sub>1</sub> (V) α <sub>2</sub> (V)	fibrillaire	Très répandu, fines fibres de rôle mal établi ou participation aux grosses fibres de type I [α <sub>1</sub> (V)] <sub>2</sub> [α <sub>2</sub> (V)]
Type VI α <sub>1</sub> (VI) α <sub>2</sub> (VI)	filaments courts	Très répandu, signification discutable [α <sub>1</sub> (VI)] <sub>2</sub> [α <sub>2</sub> (VI)]
Type VII α <sub>1</sub> (VII)	courtes fibres dermiques	Fibrilles d'ancrage des membranes basales [α <sub>1</sub> (VII)] <sub>2</sub>
Type XII α <sub>1</sub> (XII)	collagène FACIT	Associe les fibres de collagène I à la substance fondamentale, dans le derme. [α <sub>1</sub> (XII)] <sub>2</sub>
Type XIII	Collagène transmembranaire	Composant des jonctions adhérentes dans l'épiderme et des plaques d'adhésion focale
Type XIV α <sub>1</sub> (XIV)	Collagène FACIT	Associe les fibres de collagène I à la substance fondamentale [α <sub>1</sub> (XIV)] <sub>2</sub>
Type XV	?	Associe aux membranes basales
Type XVI	Collagène FACIT	Associe au type VII dans la jonction dermo-épidermique
Type XVII	Collagène transmembranaire	Dans les hémidesmosomes des kératinocytes, antigène BP180 de la dermatite bulleuse
Type XVIII	?	Associe aux membranes basales

1<sup>ère</sup> Partie Les acteurs cellulaires de la cicatrisation

Régulation transcriptionnelle (exemple des collagènes fibrillaires)



1<sup>ère</sup> Partie Les acteurs cellulaires de la cicatrisation

3) les **cellules inflammatoires**

- a) les mastocytes
- b) les neutrophiles
- c) les macrophages
- d) les lymphocytes

4) les **cellules endothéliales**

## II) 2<sup>ème</sup> partie: Les étapes de la réparation cutanée

### Définition :

Toute lésion tissulaire, qu'elle soit son origine provoque une cascade de réponses qui conduit à la formation d'un **tissu de réparation** et à la cicatrisation de la blessure. Les processus de réparation tissulaire suivent une cinétique spécifique qui permet de distinguer **3 phases** successives:

- 1) Phase initiale vasculaire et inflammatoire
- 2) Phase de réparation tissulaire
- 3) Phase de maturation

## II) 2<sup>ème</sup> partie: Les étapes de la réparation cutanée

### 1) Phase initiale vasculaire et inflammatoire : Étape vasculaire ( formation du caillot)

- Hémorragie
  - Contact entre le sang et les tissus sous-jacents
  - Activation de la thrombine  $\Rightarrow$  transformation du fibrinogène en fibrine
- $\Rightarrow$  **caillot fibrino-plaquettaire**

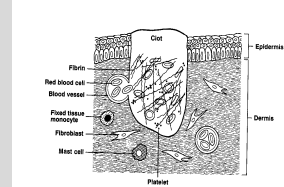


Figure 1. At the initial time of tissue disruption, platelets release coagulation factors and growth factors to initiate the healing process. (Reprinted with permission from Schwartz SI, et al, editors, Principles of surgery, 6th ed. New York: McGraw-Hill, 1993: ch 8.)

## II) 2<sup>ème</sup> partie: Les étapes de la réparation cutanée

### La formation du caillot (suite)

Le rôle du caillot est triple :

- i) assurer la **protection** des tissus mis à nu
- ii) constituer une « **matrice extracellulaire provisoire** » permettant la migration des cellules endothéliales mobilisées, des cellules inflammatoires et des fibroblastes
- iii) servir de **réservoir de cytokines et de facteurs de croissance** libérés par la dégranulation des plaquettes activées.

## II) 2<sup>ème</sup> partie: Les étapes de la réparation cutanée

### La phase inflammatoire

Différents types cellulaires sont impliqués dans la phase inflammatoire de la réparation tissulaire.

#### a) les mastocytes :

- sécrétion de facteurs stimulants
- agissent à tous les stades, jusqu'à complète restitution du tissu lésé

## II) 2<sup>ème</sup> partie: Les étapes de la réparation cutanée

### b) les polynucléaires neutrophiles :

- la phagocytose et l'élimination des débris cellulaires et tissulaires
- la fin de l'infiltration des neutrophiles marque la fin de la phase inflammatoire précoce de la cicatrisation

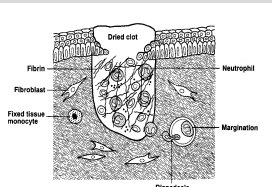


Figure 2. Within the first day of tissue injury, neutrophils attach to surrounding vessel walls (margination) and then move through the vessel walls (diapedesis) to migrate (chemotaxis) to the wound site. (Reprinted with permission from Schwartz SI, et al, editors, Principles of surgery, 6th ed. New York: McGraw-Hill, 1993: ch 8.)

## II) 2<sup>ème</sup> partie: Les étapes de la réparation cutanée

### c) les macrophages :

- stimulation de la **phagocytose** des débris tissulaires
- production de nombreux médiateurs solubles capables de moduler la réponse inflammatoire

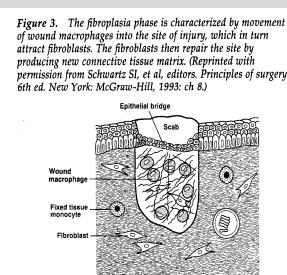


Figure 3. The fibroplasia phase is characterized by movement of wound macrophages into the site of injury, which in turn attract fibroblasts. The fibroblasts then repair the site by producing new connective tissue matrix. (Reprinted with permission from Schwartz SI, et al, editors, Principles of surgery, 6th ed. New York: McGraw-Hill, 1993: ch 8.)

## II) 2<sup>ème</sup> partie: Les étapes de la réparation cutanée

d) les lymphocytes apparaissent plus tardivement dans la plaie, ils ne sont pas essentiels à l'initiation de la cicatrisation, qui peut se faire en leur absence, mais sont nécessaires à l'obtention d'une réparation normale. Les lymphocytes T recrutent et activent les fibroblastes responsables de la synthèse de collagènes.

## II) 2<sup>ème</sup> partie: Les étapes de la réparation cutanée

### 2) La phase de réparation

#### a) la réparation épidermique

- reconstitution d'un épithélium pluristratifié, recouvrant la plaie et ayant retrouvé sa fonction de barrière, son caractère pigmenté mais aussi ses fonctions sensorielles et immunitaires
- implique ainsi différentes étapes.
  - i) la migration cellulaire
  - ii) la prolifération
  - iii) la maturation

## II) 2<sup>ème</sup> partie: Les étapes de la réparation cutanée

### la migration cellulaire.

- événement précoce (dès la 6<sup>ème</sup> heure après l'induction de la blessure)
- migration des les kératinocytes des berges de la plaie vers le centre

### la prolifération

- événement plus tardif (après 48 à 72 heures)
- sous l'influence de nombreux facteurs (FGF, KGF, IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ...

### la maturation

- simultané avec la fermeture de la plaie
- correspond à une reprise de la fonction et de la morphologie normale des kératinocytes.

## II) 2<sup>ème</sup> partie: Les étapes de la réparation cutanée

### b) la réparation de la jonction dermo-épidermique

- le contrôle de nombreux facteurs de croissance et cytokines tels le TGF- $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-1
- commence par les bords de la plaie et progresse vers le centre fixant l'épiderme au derme sous-jacent.

### c) la réparation dermique : formation du tissu de granulation

- environ quatre jours après la survenue de la blessure
- sa formation repose sur les fibroblastes qui vont produire un tissu conjonctif lâche, et sur la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogénèse) qui apportent l'oxygène et les nutriments permettant de soutenir le métabolisme cellulaire.

## II) 2<sup>ème</sup> partie: Les étapes de la réparation cutanée

### b) Le remodelage tissulaire

= passage du caillot de fibrine à une matrice extracellulaire immature principalement constituée de fibronectine et d'acide hyaluronique puis à un tissu riche en collagène, de type III dans un premier temps puis de type I, et en protéoglycannes

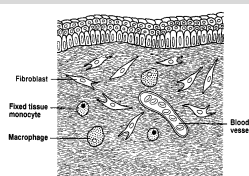


Figure 4. The remodeling phase is characterized by an equilibrium between collagen synthesis and collagen degradation in an effort to reestablish the connective tissue matrix that was destroyed by the tissue injury. (Reprinted with permission from Schwartz SJ, et al. editors. Principles of surgery. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 1993: ch 6.)

## 3<sup>ème</sup> partie : Modèles expérimentaux

### Modèles in vitro

- Modèle mocoouche
- Modèles tridimensionnels : lattices de collagène

### Modèles animaux

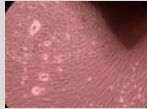
- Modèles de plaies expérimentales
- Modèle incisionnel
- Modèle excisionnel

3<sup>ème</sup> partie : Modèles expérimentaux

Modèle monocouche (Moscona, 1952)

Les cellules: kératinocytes ou fibroblastes

- ) **Cellules normales** c.a.d. À nombre de repiquages limité
- ) **Obtention**
  - ) À partir d'un prélèvement tissulaire : avec ou sans dissociation
  - ) Dissociation des liaisons fortes entre cellules
- Mécanique : broyage...
- Enzymatique essentiellement
- ) **Mise en culture** : culture primaire
- ) **Repiquage ou « passage »** : culture secondaire



3<sup>ème</sup> partie : Modèles expérimentaux

Les milieux de culture

Conditions cellulaires minimales

- eau
- ions minéraux (osmolarité physiologique)
- source de carbone et d'énergie
- source d'azote : acides aminés
- source d'acides gras
- pH constant 7,4

Compléments à ajouter

Mélanges d'antibiotiques

Glutamine

Sérum de veau fœtal apportant Facteurs de croissance cellulaire

Les supports



3<sup>ème</sup> partie : Modèles expérimentaux

Exemple d'étude sur des cellules en monocouche  
(Technique de Biologie Moléculaire)

Etude des mécanismes d'action du TGF-β sur la production des composants de la matrice extracellulaire

- 1) Identification de gènes cibles directes de Smad3 en réponse au TGF-β (cDNA micro-arrays)
- 2) JNK, cible thérapeutique dans les traitements anti-fibrosants ?

La superfamille du TGF-β

-) Facteurs de croissance qui interviennent au cours de nombreux processus :

-) physiologiques

- Développement embryonnaire
- Contrôle du système immunitaire
- Prolifération cellulaire
- Cicatrisation

-) pathologiques

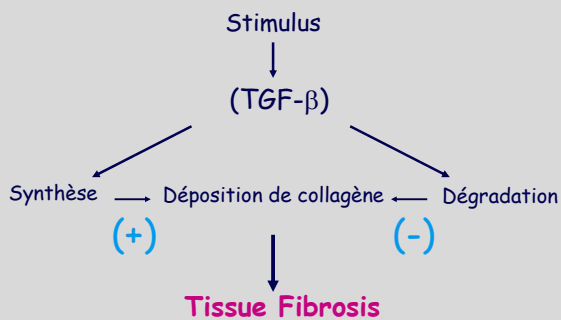
- Cancer
- Fibrose

-) Plus de 30 membres dans le règne animal

-) Les plus étudiés

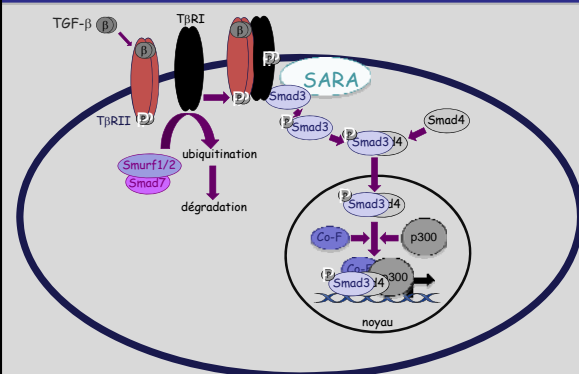
- ) TGF-βs, Bone Morphogenic Proteins, Activins

Développement des processus fibrotiques



D'après Uitto et Kouba, J. Dermatol. Sci. 2000

Voie de signalisation du TGF-β par les Smads



## Identification of novel ECM-related TGF-β/Smad3 gene targets in cultured dermal fibroblasts

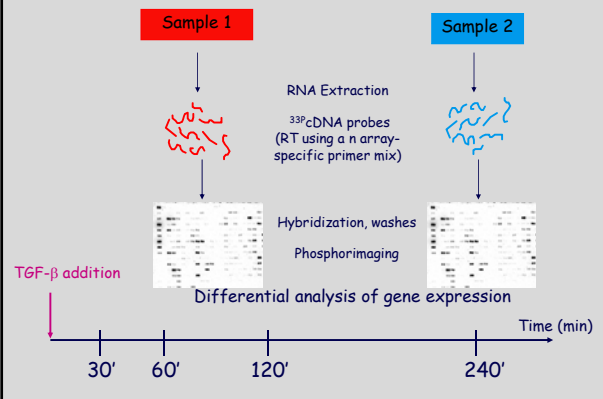
### Strategy

- 1) Differential hybridization of cDNA microarrays to identify early-induced genes
- 2) Functional analysis of the promoters for some of the genes identified in (1)

### criteria:

- transactivation by TGF-β and Smad3
- inhibition of TGF-β-induced transactivation by Smad3ΔMH2 and by Smad7
- Absence of TGF-β-induced transactivation in Smad3<sup>-/-</sup> fibroblasts

## cDNA ARRAYS: principle



## Early-induced genes, classified in clusters according to their induction kinetics

### cluster 1

**cell matrix interaction**  
 integrin alpha-3  
 plasminogen activator inhibitor-1  
 tPA  
 nidogen  
 Sparc precursor  
 laminin 37 kDa receptor  
 IGFBP3  
 HSPG/perlecan  
 versican (isoform, V1, V2, V3)  
 emmprin  
 disintegrin precursor  
**cell-cell interaction**  
 CD44  
 notch2  
 beta catenin hTcf-4  
 tyrosine-protein kinase EPH3  
**cytoplasmic regulators**  
 nucleoside diphosphate kinase A  
 rhoB  
 pak-alpha  
 P37NB

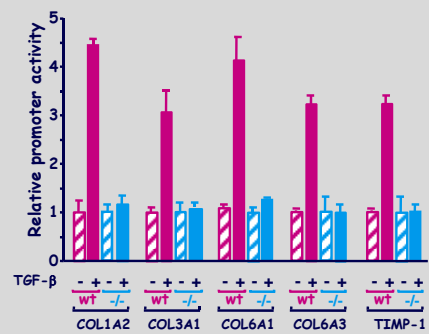
### cluster 2

**cell matrix interaction**  
 collagen type I pro-alpha-2  
 collagen type III pro-alpha-1  
 collagen type VI alpha-1  
 collagen type VI alpha-3  
 fibronectin  
 decorin  
 leukocyte adhesion prot)  
 MMP-3; stromelysin-1  
 MMP-14 (MT1-MMP)  
 MMP-16 (MT3-MMP)  
 TIMP-1  
 TIMP-3  
 LRP-1 precursor  
**cell-cell interaction**  
 CD82 antigen  
 ICAM-1  
 cadherin-6  
 protocadherin 43  
 desmoplakin III  
 dishevelled homolog (DVL)  
 Wnt-13

### cytoplasmic regulators

cytohesin-1  
 MacMarcks  
 rho GDP-dissociation inhibitor 1  
 rhoC & rho G  
**cluster 3**  
**cell matrix interaction**  
 LAM3AH  
 insulin-like GF binding protein 2  
 IGFBP5  
 integrin beta-5  
 MMP-19  
 insulin-like growth factor II receptor  
**cell-cell interaction**  
 CD59  
 APC  
**cytoplasmic regulators**  
 c-myc  
 paxillin  
 ras-like protein TC10  
 RhoB protein  
 RhoA  
 zyxin + zyxin-2

## La réponse au TGF-β est abolie dans des MEFs Smad3<sup>-/-</sup>



## Conclusions

This combined cDNA array/promoter transactivation approach allowed:

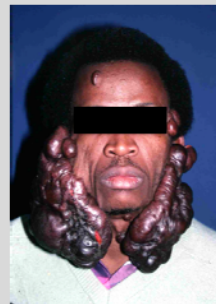
- the identification of 59 ECM-related genes rapidly induced by TGF-β
- the characterisation of 6 novel Smad3 targets:

COL1A1, COL3A1, COL5A2, COL6A1, COL6A3 et TIMP-1

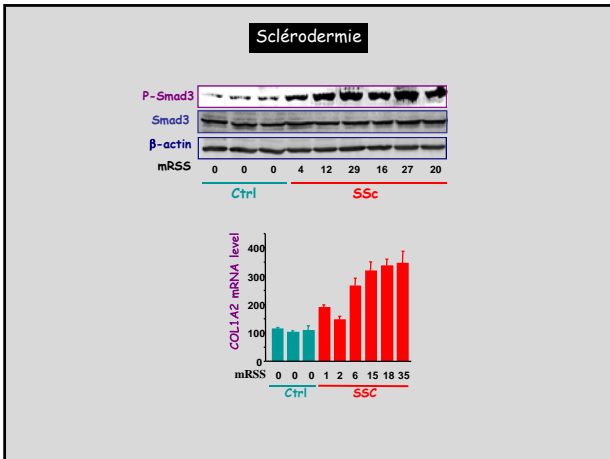
Skin fibrillar collagen genes are all Smad3 targets:

COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A2

## JNK, cible thérapeutique dans les traitements anti-fibrosants ?



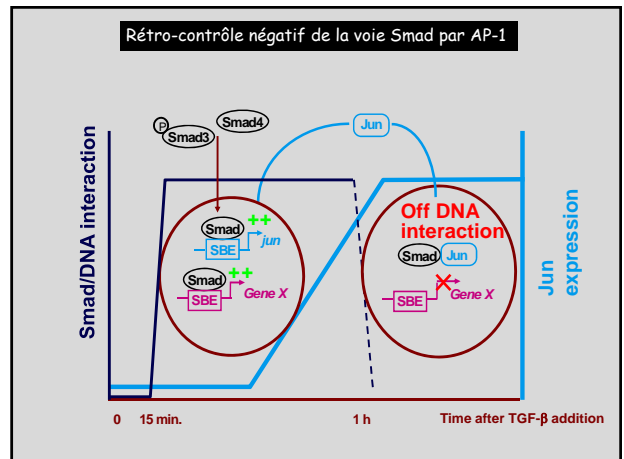
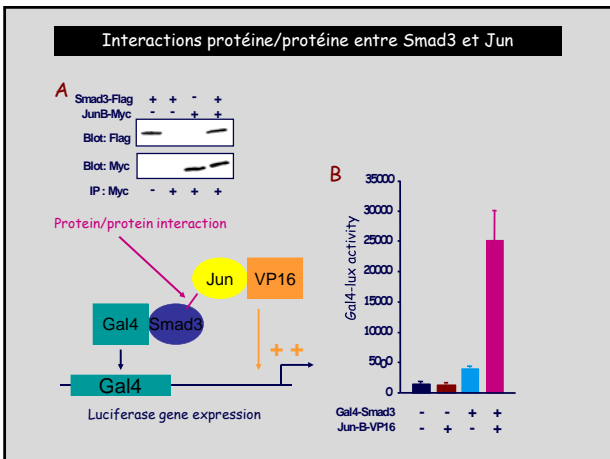
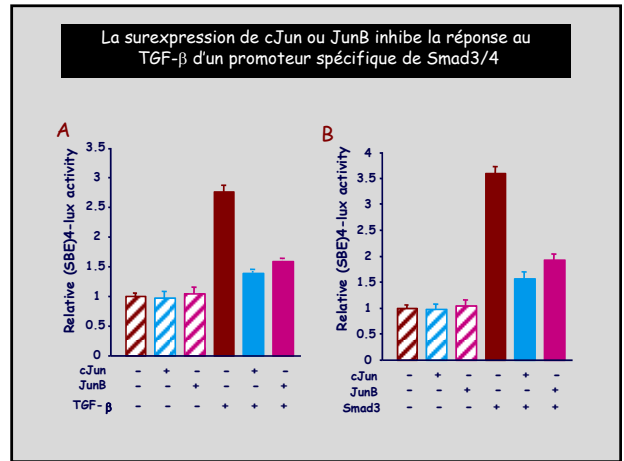
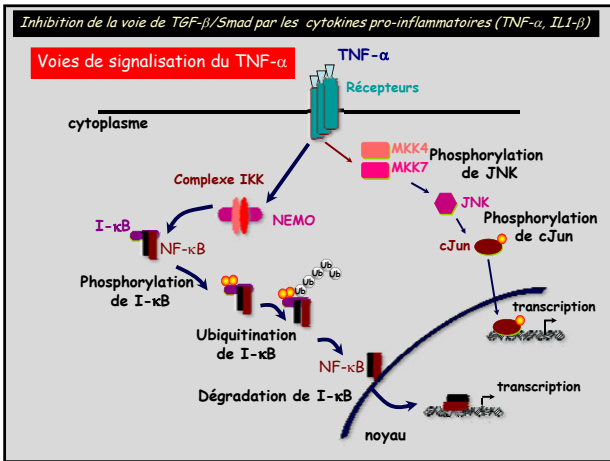
Chéloïdes : Généralement déclenché par un processus de cicatrisation cutanée ou d'inflammation dermique folliculaire



### Inhibition de la voie de signalisation de TGF- $\beta$ /Smad par les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ )

**TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$**   
Cytokines cataboliques  $\Rightarrow$   $\nearrow$  dégradation des composants de l'ECM

**TGF- $\beta$**   
Cytokine anabolique  $\Rightarrow$   $\nearrow$  synthèse des composants de l'ECM

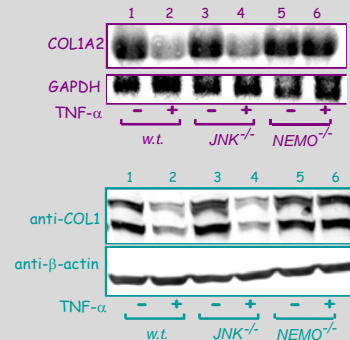


## Régulation de COL1A2 par le TNF- $\alpha$

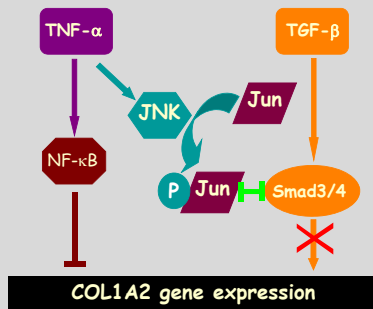
### Objectifs

Valider notre modèle dans le contexte de la régulation de l'expression du collagène de type I, largement impliqué dans le développement des processus fibrotiques

NF- $\kappa$ B est requis pour l'inhibition par le TNF- $\alpha$  de l'expression basal du collagène de type I



Rôle distinct de JNK et NF $\kappa$ B dans la régulation de l'expression de COL1A2 par le TNF- $\alpha$



### 3<sup>ème</sup> partie : Modèles expérimentaux

#### Modèles in vitro

Modèle tridimensionnels lattices de collagène  
(Lattices de collagènes à rétraction libre ou sous contrainte)

#### Rétraction libre

- la diminution du volume de l'ensemble cellules-collagène se fait librement
- le mécanisme de la rétraction consiste en un rassemblement et un réarrangement du collagène par les fibroblastes

#### Rétraction sous contrainte

- rétraction inhibée mécaniquement
- par une attache du lattice à sa périphérie
- par des attaches latérales dans une boîte rectangulaire

### 3<sup>ème</sup> partie : Modèles expérimentaux

#### Comparaison des 2 modèles

	LIBRE	SOUS CONTRAINTE
Rétraction	dans ttes les directions	en épaisseur
Morphologie	fibroblastes étoilés	bipolaires, allongés
Prolifération cellulaire	lente	rapide
Fibrilles de collagène	dispersées au hasard	alignées
Synthèse de collagène	augmentée	augmentée
Propriétés mécaniques	tissu relâché	sous tension

Exemple d'étude sur des modèles tridimensionnels  
(Lattices de collagène à rétraction libre)

Etude de l'effet de l'halofuginone sur la capacité des fibroblastes à contracter des lattices de collagène

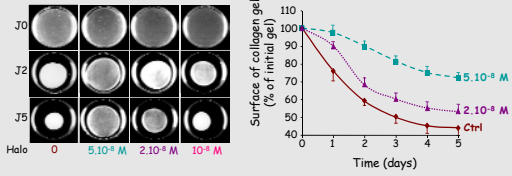
#### Myofibroblastes

- ) prolifération
- ) synthèse des composants de la MEC
- ) contraction de la matrice extracellulaire

#### Halofuginone

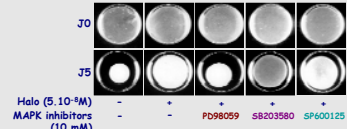
- ) alcaloïde
- ) inhibition de la synthèse de collagène dans des modèles murins
- ) Propriétés antifibrosantes ?

Effet sur la capacité à contracter des lattices de collagène à des [ ] > à 10<sup>-7</sup>M



> de la capacité des fibroblastes à contracter des lattices de collagène

Rôle des MAPKs sur la capacité de l'halofuginone à inhibition la contraction



L'effet sur la contraction dépend de la cascade ERK

3<sup>ème</sup> partie : Modèles expérimentaux

• Modèles in vivo: modèle animaux

• Modèles de plaies expérimentales

**Modèle incisionnel** = incision linéaire par bistouri ou laser (cicatrisation rapide des plaies = adapté pour réaliser des analyses biomécaniques)

**Modèle excisionnel**

- exérèse d'un certain volume de tissu, calibré en superficie et en profondeur
- biopsies facilement réalisables aux différents stades de la cicatrisation pour analyse histologique ou moléculaire

Ex: modèles excisionnels superficiels

- stripping par un adhésif = ablation superficielle de l'épiderme
- dermatome = ablation jusqu'au derme moyen
- bulles de suctions = clivage dermo-épidermique

3<sup>ème</sup> partie : Modèles expérimentaux



Tape Stripping (TS)



Dermotome

3<sup>ème</sup> partie : Modèles expérimentaux

Modulation of Gene Expression Induced in Human Epidermis by Environmental Stress *In Vivo*

Chaire Marionnet, Françoise Bernerd,\* Armand Dumas, Franck Verrecchia, Karine Mollet, Delphine Compan,\* Bruno Bernard, Morad Lahfa, Jacques Leclaire,\* Chantal Medaoua,\* Bruno Mehdi,\* Sophie Sevin,\* Alain Marnett, and Louis Duhotier

Institut de Recherche sur le Peau, INSERM U532, Hôpital Saint-Louis, Paris, and \*UMRI Recherche, Cléry, France

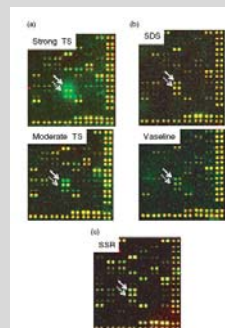


Figure 6. Heatmap of Affix Human cDNA responsive array representation of differentially expressed genes. Efficient hybridization of Affix Human cDNA expression array after incubation of array (a strong or moderate tape stripping or Vaseline TS after dermal treatment by SDS, SDS on Vaseline TS or Vaseline on Vaseline TS, and after SDS (1:1000) of SDS on Vaseline TS. Using ImageJ Software, the files hybridized with <sup>32</sup>P-labeled cDNA probes derived from control and treated epidermis of the same volunteers were analyzed. The treated sample was compared to genes the control sample was utilized as a control. Genes that were significantly downregulated, or not modulated (up-regulated genes, or not up-regulated, respectively) Full and dotted arrow indicate signals for the MMP9 and MMP10 genes, respectively.

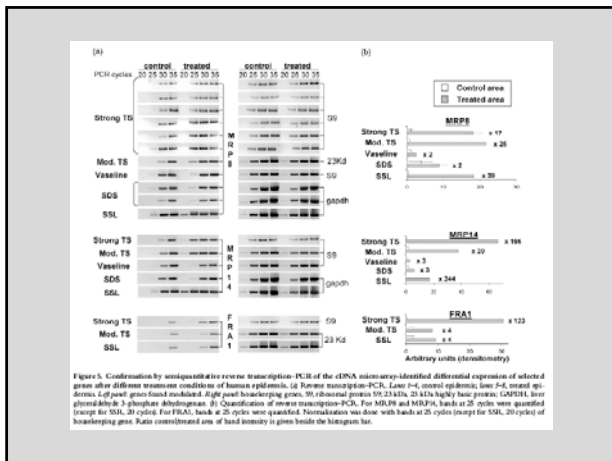


Figure 5. Confirmation by semi-quantitative reverse transcription-PCR of the cDNA microarray-identified differential expression of selected genes after different treatment conditions of human epidermis. (a) Reverse transcription-PCR. Lane 1-4, control epidermis; lane 5-8, treated epidermis. Left panel, genes found upregulated; right panel, genes found downregulated. (b) Quantification of gene expression. For MRP14 and MRP18, bands at 25 cycles were quantified for the SSL, 20 cycles. For FRA1, bands at 25 cycles were quantified. Normalization was done with bands at 25 cycles (except for SSL, 20 cycles) of housekeeping genes. Ratio (control/mean of band intensity in genes) is given beside the histogram bar.

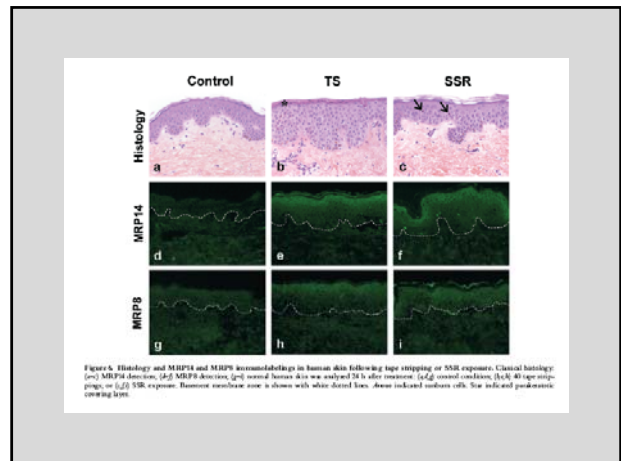


Figure 6. Histology and MRP14 and MRP18 immunohistochemistry in human skin following tape stripping or SSR exposure. Classical histology (a-c), MRP14 detection (d-f), MRP18 detection (g-i) control human skin was analyzed 72 h after treatment. (a-g) control conditions; (h-i) 40 tape stripings; (j-l) SSR exposure. Basement membrane zone is shown with white dashed lines. Arrows indicate surface cells. Six indicated proliferative centers (open bars).

### 3<sup>ème</sup> partie : Modèles expérimentaux

#### Skin Blister technique :

**suction apparatus**

On each intra-dermal site, a local depression is applied by the suction apparatus during one to two hours, until the blister is raised

3 blisters per arm

### 3<sup>ème</sup> partie : Modèles expérimentaux

#### Blister fluid and blister roof collection :

in about 2 hours

Suction blister      Blister fluid collection      Cutaneous window

### 3<sup>ème</sup> partie : Modèles expérimentaux

## Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response

Gillian S. Ashcroft<sup>1,2</sup>, Xiao Yang<sup>1</sup>, Adam B. Glicks<sup>1</sup>, Michael Weinstein<sup>1</sup>, John J. Letterio<sup>1</sup>, Diane E. Mizell<sup>1</sup>, Marie-Anne<sup>1</sup>, Teresa Greenwell-Wigley<sup>1</sup>, Sharon M. Wahl<sup>1</sup>, Claudia Deming<sup>1</sup> and Anita B. Roberts<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cell Regulation and Carcinogenesis, NCI, Building 41, Room 6201, 41 E. Bruce Drive, MSC 5015, Bethesda, Maryland 20892-5015, USA  
<sup>2</sup>Orion Institute and Biotech, Biotech, NIDDK, NIDCR, Building 30, Bethesda, Maryland 20892-4302, USA  
<sup>3</sup>Division of Development and Disease Branch, NIDDK, NIDCR, Building 30, Bethesda, Maryland 20892-4304, USA  
 Laboratory of Cellular Carcinogenesis & Tumor Promotion, NCI, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA  
 E-mail: ashcroft@nci.nih.gov

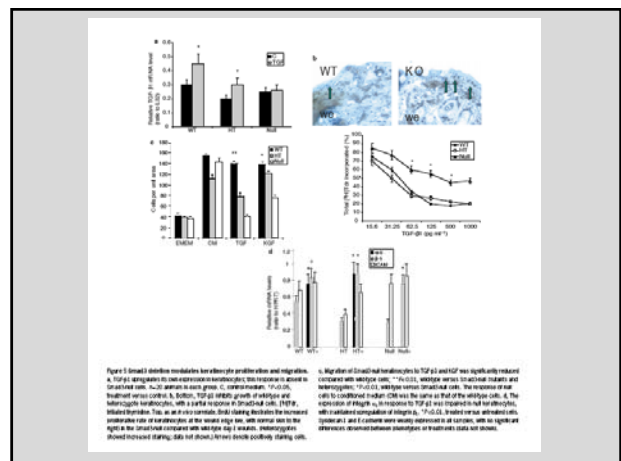


Figure 7. Smad3 deletion modulates keratinocyte proliferation and migration. (a) Total keratinocyte proliferation in WT and KO mice. (b) Keratinocyte migration in WT and KO mice. (c) Wound healing in WT and KO mice. (d) Micrographs of wound healing in WT and KO mice.

**Table 1. Accelerated wound healing after targeted Smad3 disruption**

Phenotype	Day 1	Day 2	Day 3	Day 5
Wildtype	Inflammation (+++) Wide wound (++)	No re-epithelialization Granulation tissue (++)	No re-epithelialization	Re-epithelialized Moderate wound width
Smad3 heterozygote	Inflammation (++) Wide wound (+)	No re-epithelialization Granulation tissue (++)	Re-epithelialized	Moderate wound width
Smad3 knockout	Reduced inflammation Narrow wound	Re-epithelialized Reduced granulation tissue	Re-epithelialized	Narrow wound width