



HAL
open science

Nanoparticules biodégradables et multifonctionnelles pour la régénération tissulaire de plaies cutanées profondes

Morgane Berthet

► **To cite this version:**

Morgane Berthet. Nanoparticules biodégradables et multifonctionnelles pour la régénération tissulaire de plaies cutanées profondes. Pharmacologie. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1213 . tel-03035016

HAL Id: tel-03035016

<https://theses.hal.science/tel-03035016v1>

Submitted on 2 Dec 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2017LYSE1213

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205

Ecole doctorale interdisciplinaire sciences-santé

Spécialité de doctorat : Biologie, médecine et santé

Discipline : Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique

Soutenue publiquement le 20/10/2017, par :

Morgane Berthet-Clair

Nanoparticules biodégradables et multifonctionnelles pour la régénération tissulaire de plaies cutanées profondes

Devant le jury composé de :

Hartmann, Daniel , PU – Université Claude Bernard Lyon 1	Président
Préat, Véronique , PU – Université Catholique de Louvain	Rapporteuse
Kalia, Yogeshvar , PU – Université de Genève	Rapporteur
Coste, Agnès , MCU – Université Paul Sabatier	Rapporteuse
Guillot-Combe, Emmanuelle , Responsable DGA/DS/MRIS	Examinatrice
Sigaudo-Roussel, Dominique , DR – Université Claude Bernard Lyon 1	Examinatrice
Verrier, Bernard , DR – Université Claude Bernard Lyon	Directeur de thèse
Gauthier, Yves , Docteur – Institut de Recherche Biomédicale des Armées	Invité (co-encadrant)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	M. le Professeur Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y. VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Je dédie ce travail à mes parents, mon frère et tout particulièrement à mon mari.

Merci à mes parents d'avoir toujours été là et d'avoir toujours cru en moi. Merci pour votre compréhension tout au long de ces années. Merci pour votre aide et vos encouragements, sans vous je n'aurai pu arriver à terminer cette thèse dans de bonnes conditions. Merci à mon frère pour ses nombreux conseils et son soutien. Enfin merci à ma cousine Amélie et ma marraine Béatrice pour leur relecture du manuscrit. Et tout particulièrement à mon mari Johann pour son soutien inconditionnel tout au long de ces années. Voilà près de 11 ans que l'on se connaît, merci d'avoir été aussi compréhensif et patient. Ce travail n'aurait pas été possible sans tes encouragements et ton aide au quotidien ! Je suis fière du couple que l'on a bâti au fur et à mesure de ces années !

Remerciements

Ce travail de thèse n'aurait pu être réalisé sans le financement qui m'a été attribué par la DGA. Je tiens à remercier tout particulièrement ma tutrice DGA, le Dr Emmanuelle Guillot-Combe pour son soutien et son implication dans mon projet de thèse. Je la remercie également de m'avoir permis de participer activement au forum innovation 2015 de la DGA. Cela a été un plaisir et un honneur pour moi de présenter mes travaux au cours de cet événement national.

Je tiens à remercier le Pr Véronique Prétat, le Pr Yogeshvar Kalia et le Dr Agnès Coste qui m'ont fait l'honneur de rapporter ces travaux de thèse. Je remercie également le Dr Emmanuelle Guillot-Combe et le Dr Dominique Sigaud-Roussel d'avoir accepté de faire partie du jury de soutenance et le Pr Daniel Hartmann pour avoir accepté de présider ce jury. Enfin, je remercie le Dr Marek Haftek, le Dr Jean-Nicolas Tournier et le Dr Jérôme Sohier pour leurs remarques constructives lors de mes comités de suivi de thèse.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Dr Bernard Verrier, directeur de l'unité LBTI UMR 5305 pour l'entière confiance qu'il m'a accordée tout au long de la thèse. Je le remercie aussi de m'avoir confié des cours à donner à l'université et de m'avoir permis de collaborer avec le Dr Mythili Tummalapalli. Ce furent des expériences très enrichissantes professionnellement et personnellement.

J'adresse mes sincères remerciements au Dr Yves Gauthier, ces quelques mots ne suffisent pas à exprimer mes remerciements pour ton entière implication dans ma thèse. Comme encadrant de thèse je n'aurais pu rêver mieux, merci de m'avoir transmis ton savoir-faire avec patience, ta rigueur (« militaire ») et surtout ta bonne humeur. Durant ces quatre années de thèse, j'ai eu la chance de travailler avec une personne passionnée et intègre, qui m'a montré ce qu'est le métier de chercheur. Merci pour tous les conseils et remarques scientifiques que tu m'as donné, merci pour le temps consacré à corriger les nombreux rapports d'avancements DGA, les présentations aux congrès, les papiers et maintenant le manuscrit de thèse ! Merci pour ton investissement personnel et ton soutien infailible alors que tu es à la retraite. Merci pour toutes nos discussions scientifiques qui ont permis de faire avancer mon projet de thèse. Merci pour tes conseils personnels, merci de m'avoir rappelé à de nombreuses reprises qu'il faut prendre soin des siens. J'espère que cette amitié perdurera car je sais que j'aurai encore besoin de tes précieux conseils pour l'avenir. Merci pour tout !

Remerciements

À ces remerciements, j'associe évidemment tous les membres de l'équipe du Dr Bernard Verrier. Merci à ma collègue de bureau Naïma pour sa gentillesse, pour nos nombreuses discussions philosophiques. Merci pour ton soutien, tes conseils et ton amitié. J'ai eu la chance de rencontrer une personne formidable ! Merci à Céline T (M^{me} ELISA) pour avoir toujours répondu à mes questions, pour ton aide dans le laboratoire, merci pour tout ce que tu as fait pour que l'on puisse mener à bien nos manip dans de bonnes conditions, tu es un pilier de ce laboratoire. Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et les mojitos ! Merci à Charlotte P (M^{me} NP) pour tes nombreux conseils sur les nanoparticules, ta bonne humeur permanente et pour ton soutien ! Merci à Agathe pour sa gentillesse, merci à Perrine pour son esprit apaisant. Merci à Jean Yves E pour avoir pris le temps de relire ma revue et Claire L pour l'initiation au MEB et à la microscopie confocale. Merci à Damien, pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions. Merci pour tes coups de main et pour avoir toujours répondu présent lorsque j'avais des problèmes à l'HPLC ou avec le réfrigérant du rotavap ! Merci à Maxime pour ta bonne humeur, ton aide dans les manip au MEB et tes nombreux conseils en chimie. Pour finir, merci à Céline LG (la parisienne) pour m'avoir transmis ton expertise sur les QPCR, merci pour ta patience tout au long de ces manip (de l'extraction à l'analyse des fameuses QPCR), merci de m'avoir appris la rigueur scientifique, j'ai été à bonne école avec toi. Merci pour ta bonne humeur tout au long de ces manip, j'en garde un excellent souvenir. Merci pour tous les bons moments partagés, merci de m'avoir initié au Monoprix et merci aussi d'avoir ramené un peu de Paris avec toi ! Merci de ton soutien, de tes conseils et de ton amitié. J'ai rencontré une personne formidable ! Merci aux nombreux stagiaires (Lucie M, Stéphanie M, Britany G et Jade V) que j'ai eu la chance d'encadrer, merci pour le travail que vous avez fourni, cela a contribué à faire avancer significativement ma thèse. Un grand merci à Britany pour son professionnalisme et son implication indéfectible dans mon projet !

Merci à tous ceux qui m'ont aidé ; merci à toute l'équipe de Novotec et plus particulièrement à Aurélie Pagnon et Martine Melin. Merci à Aurélie pour son professionnalisme, ses nombreux conseils qui m'ont permis d'améliorer significativement mon article " Characterization and quantitative evaluation of wound healing on an experimental hairless mouse model of third degree skin burn injury ". Merci à Martine pour sa gentillesse, j'ai apprécié travailler avec vous deux durant ma thèse. Un merci à Aurélie Nallet qui a aussi grandement participé à ce travail. Je remercie également le Dr Bariza Blanquier, responsable de la plateforme analyse génétique (SFR Biosciences) pour ses nombreux conseils en extraction ARN/QPCR. Merci au Dr

Remerciements

Dominique Sigaud-Roussel et Dr Bérengère Fromy pour m'avoir initié à la physiologie et pour les congrès auxquels j'ai pu participer. Merci à Valérie Oréa et Audrey Josset-Lamaugarny pour votre gentillesse et pour m'avoir transmis votre savoir-faire en expérimentation animale.

Je remercie notre gestionnaire Corinne Uberty pour son professionnalisme, son dynamisme et sa gentillesse. Surtout je ne manquerai pas de remercier notre excellent service informatique, merci à Alexis Michon et Samuel Bosquin pour votre professionnalisme et votre dynamisme !

Merci aux amis de l'IBCP, Halima pour sa gentillesse, ses conseils et son soutien infailible tout au long de la thèse ! Merci à Célia, les mots ne suffiraient pas pour tout dire, merci pour tes nombreux conseils professionnels et personnels. Merci d'avoir été mon binôme à la fac et d'être devenue ma meilleure amie ! Sans oublier Johanna, Noëlle, Thomas, JB et Arthur avec qui j'ai passé de bons moments.

Plan de l'exposé

<i>Liste des figures</i>	8
<i>Liste des tableaux</i>	12
<i>Liste des abréviations</i>	13
<i>Liste des publications</i>	15
<i>Liste des communications orales et posters</i>	16
CONTEXTE, ENJEUX ET OBJECTIFS	19
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	22
Introduction	22
Chapitre I. La cicatrisation cutanée	23
I. Structure et fonction de la peau humaine	23
a. L'épiderme	24
b. Le derme	27
c. L'hypoderme	28
II. La brûlure : exemple de plaie cutanée profonde	29
a. Brûlures du combattant : aspects cliniques	29
b. Evaluation clinique de la brûlure	30
1. Profondeur de la brûlure	30
2. Surface de la brûlure	31
c. Physiopathologie de la brûlure : retentissement local et général	31
d. Les traitements systémiques et locaux	33
III. Le processus de cicatrisation cutanée	35
a. Le processus d'hémostase	35
b. La réaction inflammatoire	36
c. La phase de prolifération	37
d. La phase de remodelage tissulaire	37
Chapitre II. Modèles expérimentaux de plaie cutanée pour l'étude de la cicatrisation	39
I. Les modèles expérimentaux d'étude <i>in vivo</i> du processus de cicatrisation	40
a. Choix de l'espèce animale	40
b. Les modèles de plaies cutanées profondes	43
II. Les modèles expérimentaux d'étude <i>ex vivo</i> du processus de cicatrisation	44
III. Les modèles expérimentaux d'étude <i>in vitro</i> du processus de cicatrisation	45
a. Les modèles <i>in vitro</i> de peau reconstruite	45
1. Culture bidimensionnelle (2D) de cellules en monocouche	46

Plan de l'exposé

2. Culture tridimensionnelle (3D)	47
b. Les modèles d'étude de processus cellulaires impliqués dans la cicatrisation des plaies	51
Chapitre III. Les traitements actuels et en cours de développement.....	52
I. Les traitements conventionnels actuels et les nouvelles stratégies	52
a. Les approches conventionnelles	52
1. Les procédures standards de traitements des plaies.....	52
2. Les pansements	52
b. Les potentielles nouvelles approches.....	53
1. Délivrance de facteurs de croissance et autres molécules	53
2. Les cellules souches	54
c. La recherche de cibles thérapeutiques	54
II. Les cibles potentielles des traitements thérapeutiques	54
a. Les ROS	54
b. Les cellules proliférantes	56
III. Les nanoparticules comme outils innovants de vectorisation de principes actifs pour la cicatrisation cutanée.....	58
a. Les différents types de NP utilisées pour le traitement des plaies	59
b. De la synthèse à l'utilisation clinique des NP	61
1. Méthodes de synthèse à échelle industrielle.....	61
2. La réglementation régissant l'utilisation des NP	62
3. Problèmes de toxicité	62
Revue " Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment? "	64

OBJECTIF DU PROJET DE THESE 80

RESULTAT I. ENCAPSULATION DE VITAMINE E DANS DES NP DE PLA ET EVALUATION DE LEUR ACTIVITE IN VITRO 83

Introduction	83
I. Matériels et méthodes.....	85
a. Synthèse des NP de PLA-VE	85
b. Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-VE	85
1. Diamètre, indice de polydispersité, potentiel zêta des NP.....	85
2. Morphologie des NP de PLA-VE.....	86
3. Rendement d'encapsulation de VE dans les NP.....	86
4. Détermination du taux de solide des NP de PLA.	87
c. Etude de stabilité des NP de PLA-VE	87
d. Profil de relargage <i>in vitro</i> de la VE des NP de PLA-VE.....	88
e. Tests d'efficacité <i>in vitro</i>	89
1. Les cultures de cellules	89
2. Etude de cytotoxicité des NP de PLA et des NP de PLA-VE	89

Plan de l'exposé

3. Etude de l'activité antioxydante des NP-VE	90
II. Résultats	91
a. Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-VE après synthèse	91
b. Etude de stabilité des NP de PLA-VE	92
c. Stabilité morphologique des NP de PLA-VE	93
d. Profil de relargage <i>in vitro</i> de la VE des NP de PLA-VE.....	95
e. Tests d'efficacité <i>in vitro</i>	96
1. Activité cytotoxique des NP de PLA et des NP de PLA-VE	96
2. Activité antioxydante des NP de PLA-VE	98
III. Résumé des résultats I	100

RESULTAT II. ADSORPTION DE FGF2 SUR DES NP DE PLA ET EVALUATION DE LEUR ACTIVITE IN VITRO 103

Introduction	103
I. Matériels et méthodes.....	104
a. Adsorption passive du FGF2 à la surface des NP de PLA.....	104
b. Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-FGF2	104
1. Diamètre, indice de polydispersité et potentiel zêta des NP.....	104
2. Efficacité d'adsorption du FGF2 sur les NP.....	104
c. Tests d'efficacité <i>in vitro</i>	105
1. Etude de cytotoxicité des NP de PLA-FGF2.....	105
2. Test de prolifération	105
3. Test de prolifération et migration : scratch test	106
II. Résultats	107
a. Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-FGF2	107
b. Tests d'efficacité <i>in vitro</i>	107
1. Etude de cytotoxicité des NP de PLA-FGF2.....	108
2. Test de prolifération	109
3. Test de prolifération et migration : scratch test	111
III. Résumé des résultats II.....	113

RESULTAT III. DEVELOPPEMENT DE MODELES EXPERIMENTAUX DE PLAIES CUTANEEES PROFONDES POUR L'ETUDE IN VIVO DE LA CICATRISATION 115

Introduction	115
Article n°1 "Characterization and quantitative evaluation of wound healing on an experimental hairless mouse model of third degree skin burn injury"	117
Article n°2 "Experimental models of full-thickness skin wounds in the hairless SKH1 mouse for quantitative evaluation of normal or delayed wound healing"	141

RESULTAT IV. VERS LES ETUDES PRECLINIQUES : EXPERIENCES EXPLORATOIRES	160
Introduction	160
I. Matériels et méthodes.....	161
a. Évaluation <i>in vivo</i> de l'activité du FGF2 vectorisé par des NP de PLA dans la réparation tissulaire.....	161
b. Etude <i>in vivo</i> de la biodistribution de NP de PLA fluorescentes dans les plaies	161
1. Synthèse des NP de PLA fluorescentes.....	161
2. Application des NP de PLA fluorescentes sur des plaies cutanées	162
3. Cryosections, marquages et microscopie à fluorescence.....	162
II. Résultats	163
a. Évaluation <i>in vivo</i> de l'effet de FGF2 vectorisé par des NP de PLA sur la cicatrisation.....	163
b. Etude <i>in vivo</i> de la biodistribution de NP de PLA fluorescentes dans des plaies	163
III. Résumé des résultats IV	165
RESULTAT V. ETUDE D'UN COMPOSITE CONSTITUE D'UN RESEAU DE PECTINE OXYDEE ET DE GELATINE POUR ACCELERER LA CICATRISATION	167
Introduction.....	167
Article 3 "Drug loaded composite oxidized pectin and gelatin networks for accelerated wound healing"	169
Article 4 "Composite wound dressings of pectin and gelatin with aloe vera and curcumine as bioactive agents".....	183
DISCUSSION	196
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	207
<i>Annexes</i>	214
Figures complémentaires	214
Revue n°2 "Poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery"	219
Demande d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques	235
<i>Références bibliographiques</i>	265

Liste des figures

- Figure 1** : Coupe schématique de la structure de la peau humaine (adaptée de Pubmed Health). 23
- Figure 2** : Représentation schématique du processus de différenciation des kératinocytes en cornéocytes. Immunohistochimies de peau humaine (a-c), (a) expression des kératines 1/10 dans la couche spinieuse de l'épiderme, (b) expression des kératines 5/6 dans la couche basale de l'épiderme, (c) expression de collagène de type IV dans la membrane basale de l'épiderme et dans les vaisseaux du derme (adaptée de Eckhart et al., 2013 et Debeer et al., 2013) [11] [12]. 25
- Figure 3** : Coupe histologique de peau humaine avec coloration hématoxyline-éosine HE (gauche) et élastine- verhoeff's van gieson (droite), X 140 [22]. 27
- Figure 4** : Coupe histologique de tissu sous-cutané humain. Coloration HE, X 110 [22]. 28
- Figure 5** : Photographies des plaies du combattant. (a) blessure par balle du bras gauche, (b) brûlure sur le visage causée par un engin explosif improvisé à bord d'un véhicule [23] [25]. 29
- Figure 6** : Représentation schématique des différents degrés de brûlures en fonction de la profondeur des dommages tissulaires (1^{er} degré (1), 2^{ème} degré superficiel (2s), 2^{ème} degré profond (2p) et 3^{ème} degré (3), selon la SFETB 2006). 30
- Figure 7** : Représentation schématique d'une brûlure de 3^{ème} degré avec les trois zones lésionnelles : 1. zone de coagulation, 2. zone de stase, 3. zone d'hyperémie (adapté de Jackson et al., 1953) [28]. 32
- Figure 8** : Photographies de brûlures thermiques de 3^{ème} degré [25]. (a) brûlure infectée par un streptocoque (cellulite infectieuse), (b) septicémie due à une infection de la brûlure, (c) escarrotomie le long de la main, (d) excision chirurgicale de la peau brûlée avec un dermatome. 34
- Figure 9** : Les événements biologiques impliqués dans le processus de cicatrisation des plaies cutanées (Berthet et al., 2017) [30]. Les quatre étapes du processus sont les suivantes : (a) hémostase, (b) inflammation, (c) prolifération et (d) remodelage. Abréviations : ECM, matrice extracellulaire, GFs, Facteurs de croissance, ROS, Espèce réactive de l'oxygène. 35
- Figure 10** : Représentation schématique des modèles d'étude de la cicatrisation [30]. 39
- Figure 11** : Graphique représentant le nombre d'articles publiés dans PubMed en rentrant les termes « wound healing in vivo pig », « wound healing in vivo mouse » et « wound healing in vivo rat ». ... 40
- Figure 12** : Modèles ex vivo de peau humaine avec plaie partielle (A) ou de pleine épaisseur (B) [49]. 44
- Figure 13** : Développement de modèles in vitro de peaux reconstruites : des monocouches cellulaires simples jusqu'à la technologie escomptée de puces contenant l'organisme entier de l'homme [52]. ... 45
- Figure 14** : Modèles 3D de peaux humaines reconstruites commercialisés par MatTek corp. (a) EpiDerm™ - Epiderme reconstruit (b) EpiDerm-FT™ - Peau reconstruite avec épiderme et derme. Coloration HES. 47
- Figure 15** : Représentation schématique d'un insert Transwell®. Ces systèmes sont disponibles dans le commerce sous forme de systèmes Transwell® constitués d'une plaque multi-puits, équipée d'un insert contenant une membrane en polycarbonate semi-perméable, pour séparer l'ensemble en deux

Liste des figures

compartiments (apical = compartiment intérieur, basolatéral = compartiment extérieur) pour une culture à l'interface air- liquide..... 48

Figure 16 : Marquages immunohistochimiques des marqueurs de différenciation de l'épiderme et de la matrice du derme sur de la peau humaine native, de la peau reconstruite issue de cellules primaires et de lignées cellulaires [68]..... 50

Figure 17 : Mécanismes de production et de détoxification de ROS (adaptée de U auf dem Keller et al. 2006 et E Nachbar et al. 1995) [33] [79]. LH : lipide à double liaison, L· : radical lipidique, LOO· : radical peroxy lipidique, LOOH : hydroperoxyde lipidique, α -TocOH : α -tocophérol (Vitamine E active), α -TocO· : α -Tocophéryl (Vitamine E radicalaire), Vitamine C· : Vitamine C radicalaire, GSH : Glutathion réduit, GSSG : Glutathion oxydé..... 55

Figure 18 : Voie de signalisation du récepteur FGFR (adaptée de Touat et al., 2015) [91]. Le FGF se lie aux monomères de FGFR, conduisant à la dimérisation puis à l'autophosphorylation du résidu tyrosyl des récepteurs. Ceci engendre l'activation du FGFR et de diverses protéines en aval, entraînant une prolifération, une différenciation, une survie cellulaire, une anti-apoptose et une angiogenèse..... 57

Figure 19 : Structure chimique de la vitamine E naturelle et synthétique (adapté de Vagni et al. 2011) [92]. 83

Figure 20 : Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-VE à trois températures (4 °C (orange), 27 °C (gris clair) et 37 °C (gris foncé)) sur 28 jours. Évaluation dans le temps (a) du diamètre (nm) et de l'Ip des NP de PLA-VE ; (b) du potentiel zêta (mV) des NP de PLA-VE ; (c) du taux de chargement en mg VE/ g PLA et du rendement d'encapsulation (%). Les données sont exprimées comme étant la moyenne \pm la SD (N=3, n=2). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. Les valeurs obtenues aux jours J7, J14, J21 et J28 pour chaque température sont comparées à J0. **** diffère très significativement ($P \leq 0.0001$), *** diffère significativement ($P \leq 0.001$), ** diffère significativement ($P \leq 0.01$), * diffère significativement ($P \leq 0.05$)..... 93

Figure 21 : Morphologie des NP de PLA et des NP de PLA-VE observée par Microscopie Électronique à Balayage. Images de NP de PLA et NP de PLA-VE à J0 et des NP de PLA-VE à J7, J14 et J28, aux trois températures (4°C, 27°C et 37°C). 94

Figure 22 : Profil de relargage de la VE des NP de PLA-VE dans un milieu biphasique composé de PBS 1X et d'hexane. Les données sont exprimées comme étant la moyenne \pm la SD (N=2, n=3). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un one-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. **** diffère significativement de 24 h à 48 h ($P \leq 0,0001$) et ** diffère significativement de 30 min à 5 h ($P \leq 0,01$)..... 95

Figure 23 : Profil de relargage de la VE des NP de PLA-VE dans un tampon citrate pH 5,6 en absence (courbe verte) et en présence (courbe rouge) de 6 % de Tween 20 (N=2). Les données sont exprimées comme étant la moyenne \pm la SD (n=6) pour le tampon citrate pH 5,6 et (n=3-5) pour le tampon citrate pH 5,6 avec 6 % de Tween 20. Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un one-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. * diffère significativement de 30 min à 1 h ($P \leq 0,05$)..... 96

Figure 24 : Evaluation in vitro des NP de PLA-VE. Effet des NP de PLA (30 μ g/mL et 300 μ g/mL), de la VE libre (5 μ M et 10 μ M) et des NP de PLA-VE aux mêmes concentrations en VE sur l'activité LDH du surnageant de fibroblastes NHDF durant 24 h, 48 h, 72 h mesurée par LDH test. Les résultats sont représentés comme étant la moyenne \pm la SD (n= 4). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. Les valeurs obtenues en condition non traitée (contrôle négatif) sont comparées aux autres conditions. **** diffère très

Liste des figures

significativement ($P \leq 0.0001$), *** diffère significativement ($P \leq 0.001$), ** diffère significativement ($P \leq 0.01$), * diffère significativement ($P \leq 0.05$)..... 97

Figure 25 : Dosage des ROS intracellulaire dans les cellules NIH3T3. Les cellules ont été prétraitées pendant 16 h par de la VE en solution (courbe/barre vertes), encapsulée à 2,5 μM (courbe/barre bleues) ou par des nanoparticules de PLA nues (130 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (courbe/barre noires) ou sans traitement (courbe/barre rouges) ($n=11$). Elles ont ensuite été incubées pendant 2 h en présence de PMA (1 ng/mL). (a) Les résultats sont représentés comme étant la moyenne d'intensité de fluorescence (UA) \pm la SEM. (b) La production de ROS intracellulaire après 75 min de stimulation au PMA a été représentée dans l'histogramme. Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. ** diffère significativement ($P \leq 0.01$), * diffère significativement ($P \leq 0.05$). 98

Figure 26 : Effet cytotoxique du FGF2 (100 ng/mL), des NP de PLA nues (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et des NP de PLA-FGF2 (100 ng/mL en FGF2) sur des fibroblastes NHDF. Les résultats sont exprimés comme le pourcentage de cytotoxicité. Les résultats sont représentés comme étant la moyenne \pm la SD ($N=3$, Contrôle positif $n=3-4$, Contrôle négatif, FGF2, NP de PLA et NP de PLA-FGF2 $n=5$). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. Les différences significatives sont représentées par rapport à la condition témoin NT, **** diffère très significativement ($P \leq 0.0001$)..... 108

Figure 27 : Effet du FGF2 (100 ng/mL), des NP de PLA nues (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et des NP de PLA-FGF2 (100 ng/mL en FGF2) sur la prolifération des fibroblastes NIH3T3. Les résultats sont exprimés en fonction de la quantité d'ADN (ng) contenue dans les cellules. Les résultats sont représentés comme étant la moyenne \pm la SD ($N=3$, NT et NP de PLA $n=4$, FGF2 $n=3-4$, NP de PLA-FGF2 $n=3-5$). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. Les différences significatives sont représentées par rapport au condition NT, *** diffère significativement ($P \leq 0.001$), ** diffère significativement ($P \leq 0.01$), * diffère significativement ($P \leq 0.05$)..... 109

Figure 28 : Effet du FGF2 (100 ng/mL), des NP de PLA nues (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et des NP de PLA-FGF2 (100 ng/mL en FGF2) sur la migration et la prolifération des fibroblastes NHDF. (a) observations microscopiques après 14 h, 24 h et 38 h de traitements, (b) Les résultats sont exprimés comme le pourcentage de fermeture par rapport à la surface de la plaie initiale. Les résultats sont représentés comme étant la moyenne \pm la SD ($N=3$, $n=3-4$). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. Les différences significatives sont représentées par rapport au condition NT, **** diffère très significativement ($P \leq 0.0001$)..... 111

Figure 29 : Modèle de plaie excisionnelle sur la souris C57BL/6 adapté de Galiano et al. [102]. 160

Figure 30 : Etapes du protocole de cicatrisation chez la souris C57BL/6. 161

Figure 31 : Suivi de la fermeture des plaies, les souris ont été traitées avec des particules de PLA nues (contrôles négatifs, rouge), FGF2 adsorbé sur des particules de PLA (bleu), le FGF2 libre (contrôle positif, vert) et du tampon TRIS 20 mM (noir). La fermeture complète de la plaie est atteinte à 100%. Les données sont exprimées comme la moyenne \pm SD, ($n = 4-5$ souris/groupe)..... 163

Figure 32 : Coupe transversale de peau de souris SKH1 diabétiques observée au microscope AxioImager ZI, ZEISS. (a) peau contrôle, (b) peau brûlée 4 h après applications des NP de PLA fluorescentes rouges, (c) bordure de plaie d'excision 4 h après applications des NP de PLA fluorescentes rouges, (d) bordure de plaie d'excision 24 h après applications des NP de PLA fluorescentes rouges. En bleu (DAPI) le marquage des noyaux des cellules, en vert de l'actine (phalloïdine Alexafluor 488) et en rouge des NP de PLA fluorescentes. 164

Liste des figures

- Figure 33 :** (a)anneau avec maillage en acrylonitrile butadiène styrène, deux par côtés sont effectués pour laisser passer le fil de suture)préalablement thermoformée, afin d'épouser parfaitement le dos de l'animal b) dispositif fixé à l'aide de colle chirurgicale et de deux points de suture. 211
- Figure 34 :** Représentation schématique des nanomatériaux utilisés pour la cicatrisation des plaies ; “des nanoparticules aux composites nanoparticulaires” [30]. Abréviations : FMs, Films et membranes; HGs, Hydrogels; MCs, Multi-composites; NFs, Nanofibres; NP, Nanoparticules..... 212
- Figure 35 :** (a) Evaluation de la surface corporelle brûlée : règle des 9 de Wallace (<http://sofia.medicalistes.org>), (b) Evaluation de la surface corporelle brûlée : table de Lund et Browder (www.remotephmanuals.com)..... 214
- Figure 36 :** Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-VE aux différents taux de chargement en vitamine E (10,0%, 7,0%, 5,0%, 2,5% et 1,2%) à trois températures (4°C (bleu), 27°C (vert) et 37°C (orange)) sur 56 jours. Evaluation dans le temps du diamètre (nm), de l'indice de polydispersité (Ip) et du potentiel zêta (mV)..... 216
- Figure 37 :** Effet cytotoxique du FGF2 (100 ng/mL), des NP de PLA nues (15 µg/mL) et des NP de PLA-FGF2 (100 ng/mL en FGF2) sur des fibroblastes NIH3T3. Les résultats sont exprimés comme le pourcentage de cytotoxicité. Les résultats sont représentés comme étant la moyenne ± la SD (N=3, n=3-5). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. Les différences significatives sont représentées par rapport au condition NT, **** diffère très significativement ($P \leq 0.0001$)..... 217
- Figure 38 :** Effet du FGF2 (100 ng/mL), des NP de PLA nues (15 µg/mL) et des NP de PLA-FGF2 (100 ng/mL en FGF2) sur la prolifération des fibroblastes NHDF. Les résultats sont exprimés en fonction de la quantité d'ADN (ng) contenue dans les cellules. Les résultats sont représentés comme étant la moyenne ± la SD (N=3, NT, NP de PLA, FGF2 n=14, NP de PLA-FGF2 n=5). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. Les différences significatives sont représentées par rapport au condition NT, **** diffère significativement ($P \leq 0.0001$). 217
- Figure 39 :** Effet du FGF2, des NP de PLA nues et des NP de PLA-FGF2 sur la migration et la prolifération des fibroblastes NIH3T3. (a) observations microscopiques à 0 h et après 24 h de traitements, (b) et (c) Les résultats sont exprimés comme le pourcentage de fermeture par rapport à la surface de la plaie initiale. Les résultats sont représentés comme étant la moyenne ± la SD (N=4, n=3, cellules non traitées NT, FGF2 et NP de PLA-FGF2, NP de PLA). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. Les différences significatives sont représentées par rapport au condition NT. Les valeurs obtenues en condition non traitée (NT) sont comparées aux autres conditions. *** diffère significativement ($P \leq 0.001$), ** diffère significativement ($P \leq 0.01$), * diffère significativement ($P \leq 0.05$). 218

Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des caractéristiques histologiques et cliniques avec le pronostic des différents degrés de la brûlure (SFETB 2006)..... 31

Tableau 2 : Principales différences entre la peau de souris et de l’homme (adapté de Wong et al., 2011) [39]. 41

Tableau 3 : Types cellulaires les plus utilisés dans les études de cicatrisation. 46

Tableau 4 : Modèles in vitro d’épiderme humain reconstruit commercialisés. 48

Tableau 5 : Modèles in vitro de peau reconstruite humaine de pleine épaisseur. 49

Tableau 6 : Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-VE et des NP de PLA nues (n=3). Le diamètre (nm), l’indice de polydispersité et le potentiel zêta (mV) sont obtenus par DLS. La concentration en VE encapsulée (µg/mL), l’efficacité d’encapsulation (%), le rendement d’encapsulation de VE dans les NP de PLA (%) et le taux de chargement en VE (mg de VE / g de PLA) sont déterminés par HPLC. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne ± SD de trois mesures. 91

Tableau 7 : Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-FGF2 et des NP de PLA nues (n=5 et n=3, respectivement). Le diamètre (nm), l’indice de polydispersité et le potentiel zêta (mV) sont obtenus par DLS. Le rendement d’adsorption (%), la concentration en FGF2 adsorbé (µg/mL) et le taux de chargement (mg de FGF2 / g de PLA) sont déterminés par µBCA. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne ± SD de cinq mesures pour les NP de PLA-FGF2 et de 3 mesures pour les NP de PLA nues..... 107

Tableau 8 : Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-VE à différents taux de chargement en VE (1,2%, 5,0%, 2,5%, 5,0%, 7,0% et 10,0%) et des NP de PLA nues. Le diamètre (nm), l’indice de polydispersité et le potentiel zêta (mV) sont obtenus par DLS. Le rendement d’encapsulation de VE dans les NP de PLA (%) est déterminé par HPLC. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne ± SD..... 215

Liste des abréviations

2D	Deux dimensions
3D	Trois dimensions
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
ECVAM	<i>European center for validation of alternative methods</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMA	<i>European medicines agency</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factors</i>
FGFR	<i>Fibroblast growth factor Receptors</i>
GF	<i>Growth factors</i>
GSH	Glutathion
HES	Hématoxyline éosine safran
HGF	<i>Hepatocyte growth factors</i>
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HSPG	<i>Heparan sulfate proteoglycans</i>
IFN- γ	<i>Interferons-γ</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factors</i>
IL	<i>Interleukins</i>
Ip	Indice de polydispersité
ISO	<i>International organization for standardization</i>
IV	Intraveineuse
JAK STAT	<i>Janus kinase/signal transducers and activators of transcription</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
K	Kératine
LDH	Lactate déshydrogénase
m/m	masse/masse
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MEB	Microscope électronique à balayage
MEC	Matrice extracellulaire
MF	Microfibres
MMP	<i>Matrix metalloproteinases</i>
MP	Microparticules
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO	Monoxyde d'azote
NP	Nanoparticules
OECD TG	<i>Organization of economic co-operation and development test guideline</i>
PCL	<i>Polycaprolactone</i>
PDGF	<i>Platelet differentiation growth factors</i>
PEG	<i>Polyethylene glycol</i>
PGA	<i>Poly(glycolic acid)</i>

Liste des abréviations

PKC	<i>Protein kinases C</i>
PLA	<i>Poly(lactic acid)</i>
PLGA	<i>Poly(lactic-co-glycolic acid)</i>
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PVA	<i>Polyvinyl alcohol</i>
REACH	<i>Registration, evaluation and autorisation of chemicals</i>
RI	Réaction inflammatoire
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SFETB	Société française d'étude et de traitement des brûlures
<i>SMAD3</i>	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 3</i>
STZ	Streptozotocine
SVF	Sérum de veau fœtal
TA	Température ambiante
TBSA	<i>Total body surface area</i>
TGF- β	Transforming growth factors- β
TIMP	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factors-α</i>
TRIS	Trishydroxyméthylaminométhane
UA	Unité arbitraire
UV	Ultraviolet
VE	Vitamine E
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factors</i>

Liste des publications

Articles

En cours

Berthet-Clair M, Lacroix-Gimon C, Josset-Lamaugarny A, Orea V, Pagnon-Minot A, Sigauco-Roussel D, Verrier B, Gauthier Y. Experimental models of full-thickness skin wounds in the hairless SKH1 mouse for quantitative evaluation of normal or delayed wound healing. En cours de rédaction pour soumission dans le *Journal of Investigative Dermatology*.

Soumis

Berthet-Clair M, Orea V, Pagnon-Minot A, Fromy B, Sigauco-Roussel D, Verrier B, Gauthier Y. Characterization and quantitative evaluation of wound healing on an experimental hairless mouse model of third degree skin burn injury. *Wound Repair and Regeneration*, Technical article. Resoumis à publication le 06. 12.17

Publiés

Tummalapalli M, **Berthet M**, Verrier B, Deopura BL, Alam MS, Gupta B. Drug loaded composite oxidized pectin and gelatin networks for accelerated wound healing. *International journal of pharmaceutics*. 2016;505(1-2):234-45. (IF : 3,6)

Tummalapalli M, **Berthet M**, Verrier B, Deopura BL, Alam MS, Gupta B. Composite wound dressings of pectin and gelatin with aloe vera and curcumine as bioactive agents. *International journal of biological macromolecules*. 2016;82:104-13. (IF : 3,7)

Revue publiée

Berthet M, Gauthier Y, Lacroix C, Verrier B, Monge C. Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment? *Trends in biotechnology*. 2017;35(8):770-84. (IF : 11)

Pavot V, **Berthet M**, Resseguier J, Legaz S, Handke N, Gilbert SC, et al. Poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery. *Nanomedicine (Lond)*. 2014;9(17):2703-18. (IF : 4,7)

Liste des communications orales et posters

Communications orales

Forum innovation de la DGA, École Polytechnique Paris Saclay, France (26/11/15),
A l'invitation de la DGA, tenue d'un stand sur la thématique « Préserver la vie et la santé du militaire en opérations » avec poster affiché et présentation vidéo de mes travaux,
« Elaboration et évaluation de nanoparticules biodégradables et bioactives pour la cicatrisation et la reconstruction dermique »,

M Berthet ; Y Gauthier ; D Sigaudou-Roussel ; B Verrier.

PERSE. 12ème Journées Nationales de l'Escarre, Bordeaux, France (01-02/10/15),
Utilisation de nanoparticules biodégradables de poly(acide lactique) pour la reconstruction tissulaire de plaies chroniques,

M Berthet ; Y Gauthier ; B Fromy ; D Sigaudou-Roussel ; B Verrier.

The 18th Annual Meeting of the European Pressure Ulcer Advisory Panel, Gent, Belgique (16-18/09/15),

Use of poly (lactic acid) biodegradable nanoparticles for tissue reconstruction of chronic wounds,

M Berthet ; Y Gauthier ; B Fromy ; D Sigaudou-Roussel ; B Verrier.

The 28th GTRV annual meeting, Orléans, France (02-03-04/12/13),

Biodegradable nanoparticles carrying an antioxidant and a fibroblastic growth factor for dermis reparation in a context of wound healing,

M Berthet ; C Primard ; V Lahaye ; B Fromy ; D Sigaudou-roussel ; B Verrier.

PERSE. 11ème Journées Nationales de l'Escarre, Saint Malo, France (03-04/10/13),

Particules biodégradables de poly(acide lactique) pour la prévention des escarres,

M Berthet ; C Primard ; B Fromy ; D Sigaudou-roussel ; B Verrier.

Posters

Advances in nanoparticulate carriers : Applications in diseases and infections, Institut Pasteur, Paris (19-21/10/15),

Use of poly (lactic acid) biodegradable nanoparticles for tissue reconstruction of deep wounds,
M Berthet ; Y Gauthier ; S Malnuit ; D Sigaudou-Roussel ; B Verrier.

BIOMAT, Autrans, France (19-20/05/14),

Biodegradable nanoparticles carrying an antioxidant and a fibroblastic growth factor for dermis reparation in a context of wound healing,

M Berthet ; C Primard ; Y Gauthier ; B Fromy ; D Sigaudou-roussel ; B Verrier.

Contexte, enjeux et objectifs

Contexte, enjeux et objectifs

Les services de santé militaires occidentaux, notamment américains et français, très engagés ces deux dernières décennies dans des opérations extérieures, ont été confrontés à des problèmes d'isolement et d'éloignement en terrain hostile. La prise en charge des combattants blessés était d'autant plus compliquée et délicate au plan sanitaire que ceux-ci étaient victimes de blessures aiguës de plus en plus destructrices, notamment brûlures et plaies ouvertes hémorragiques. En effet, des armements et équipements de plus en plus sophistiqués et destructeurs ont été utilisés dans des zones de combat où le rapatriement rapide vers une première structure de soins de terrain était imprévisible et dangereux. Une étude américaine a mis en évidence le fait que les plaies sévères de brûlure comptaient pour environ 10% des cas de blessures de guerre, principalement dues à des explosions d'engins incendiaires ou des feux secondaires de combustibles, notamment lors d'opérations de « refueling » ou d'incendies de dépôts et rejets divers. Que la blessure intervienne dans un contexte guerrier ou civil, la sévérité en est déterminée par l'intensité de l'énergie, mécanique et/ou thermique, à laquelle le patient a été exposé ainsi que la durée de l'exposition et la surface corporelle touchée. Le combattant sévèrement blessé sur le champ de bataille, ou le civil victime d'un attentat, présente souvent des plaies aiguës multiples, avec d'importants dommages osseux et tissulaires causés par des explosions, des projectiles et des brûlures. La réponse inflammatoire induite par la blessure va dicter le processus de cicatrisation de la plaie cutanée et de la régénération tissulaire. À cet égard, la première phase d'évolution de la plaie est caractérisée par la colonisation rapide du tissu lésé par la flore microbienne résidente, ou par des contaminants exogènes porteurs de bactéries, souvent multi-résistantes aux antibiotiques, ce qui fait de l'infection une des principales causes de l'échec du processus de cicatrisation et de réparation tissulaire. De manière plus générale, l'infection d'une plaie est considérée comme responsable de la plupart des causes de complication post opératoire et reste un enjeu économique majeur. Si la prise en charge du blessé et son transfert vers une structure de soins adaptée est rapide en milieu civil, le combattant blessé en opération extérieure devra passer, dans des conditions parfois hasardeuses, par des structures sanitaires intermédiaires avant son évacuation vers des structures hospitalières, souvent éloignées, mieux équipées et adaptées à son état. Il est donc

Contexte, enjeux et objectifs

nécessaire d'imaginer de nouveaux outils thérapeutiques facilitant dès le terrain une prise en charge rapide et efficace de la blessure.

Depuis ces cinq dernières années émerge tout un champ de recherche, axé sur la mise au point et le développement de biomatériaux vecteurs d'agents thérapeutiques, comme alternative aux méthodes traditionnelles de reconstruction tissulaire et régénération de la peau, notamment les greffes. Ces biomatériaux incluent des gels, films, membranes, matrices fibreuses et micro ou nanoparticules faits de polymères naturels ou synthétiques, biodégradables et biocompatibles, susceptibles de permettre la délivrance contrôlée et séquentielle *in situ* de molécules thérapeutiques. Le but est de stimuler et/ou d'activer les réponses cellulaires et biochimiques au cœur du processus de régénération tissulaire. Parallèlement, la délivrance de molécules antiseptiques et antibiotiques par des biomatériaux, afin de diminuer le risque d'infections dans les brûlures profondes commence à être explorée. L'apport récent de la nanomédecine a ainsi permis de proposer de nouvelles approches technologiques basées sur l'utilisation de vecteurs particuliers biodégradables, incorporées dans ces biomatériaux.

Mon travail de thèse s'inscrit dans un programme de recherche plus vaste (ANR-ASTRID / PaNaCée) dont le but est de concevoir à terme des « pansements biologiques » utilisables sur le terrain, notamment les théâtres d'opérations militaires, lorsque la gravité des plaies et l'éloignement des structures hospitalières classiques commandent l'intervention d'urgence, dans un contexte où l'on ne peut avoir recours aux méthodes classiques.

Etude bibliographique

Etude bibliographique

Introduction

Après un rappel sur la structure et la fonction de la peau humaine, les lésions induites par les blessures et les phases de cicatrisation sont décrites, en mettant l'accent sur les plaies de brûlure. Nous décrivons ensuite divers modèles expérimentaux de plaies cutanées permettant l'étude de la cicatrisation *in vivo* sur animaux ou *ex vivo* sur explants cutanés. D'utilisation plus récente, des modèles *in vitro* de peau reconstruite, fondés sur des cultures cellulaires bi (2D) ou tri (3D)-dimensionnelles, permettent d'étudier plus finement les mécanismes cellulaires impliqués dans le processus de cicatrisation et les éventuelles cibles thérapeutiques. Un troisième chapitre est consacré aux traitements thérapeutiques conventionnels actuels, principalement fondés sur l'utilisation de pansements ou de substituts cutanés, et aux traitements innovants en cours de développement fondés notamment sur l'utilisation de nanoparticules vectrices de molécules thérapeutiques.

Chapitre I. La cicatrisation cutanée

I. Structure et fonction de la peau humaine

La peau est considérée comme l'organe du corps humain à la fois le plus étendu et le plus lourd, avec un pH acide variant de 4,5 à 5,5 et une épaisseur de 3 mm. Elle a plusieurs fonctions fondamentales permettant de maintenir l'homéostasie de l'organisme. La principale étant une fonction de « barrière » vis-à-vis des agressions extérieures comme les chocs, les microorganismes, les rayonnements ultra-violet (UV) et les agents toxiques [1] [2]. Elle assure aussi une fonction de thermorégulation [3], immunitaire [4], et de perception sensorielle [5] [6]. Elle est impliquée dans des réactions métaboliques telles que la synthèse hormonale de la vitamine D nécessaire à la minéralisation osseuse [7]. Cet organe multifonctionnel possède une structure complexe composée de 3 couches distinctes superposées : l'épiderme, tissu de protection le plus externe, le derme, tissu conjonctif de soutien et l'hypoderme, le tissu conjonctif de réserve plus profond [8] (**Figure 1**). Dans ces couches sont intriqués un important réseau vasculaire et des annexes cutanées (phanères : cheveux, poils et ongles) ainsi que des glandes (sudoripares permettant de sécréter la sueur et sébacées qui évacuent le sébum assurant une lubrification et le maintien du pH acide).

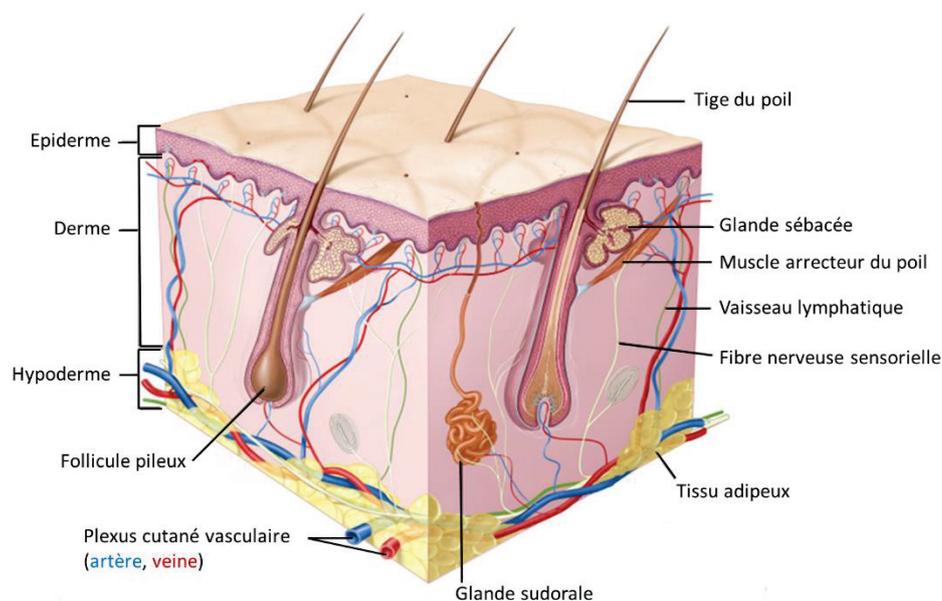


Figure 1 : Coupe schématique de la structure de la peau humaine (adaptée de Pubmed Health).

a. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium squameux, pluristratifié et kératinisé qui mesure en moyenne 100 µm d'épaisseur. Sa composition lui confère des propriétés de souplesse, de résistance et de semi-perméabilité. L'épiderme est dépourvu de vaisseaux sanguins et lymphatiques, il trouve ses nutriments dans le derme, cependant il renferme des terminaisons nerveuses libres [9]. Les kératinocytes constituent 90-95% de la population cellulaire de l'épiderme, auxquels s'ajoutent les mélanocytes (5-10%), les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel (1%). L'épiderme est en renouvellement permanent en raison des phénomènes de migration et de différenciation des kératinocytes. Ces derniers trouvent leur origine au niveau de la couche la plus profonde de l'épiderme (*couche basale*), à proximité de la jonction dermo-épidermique et migrent vers la surface la plus externe de l'épiderme (*couche cornée*) en se différenciant. Ce processus de différenciation des kératinocytes est caractérisé par des modifications de morphologie et d'expressions de marqueurs. Ainsi, au cours de la différenciation des kératinocytes, différents hétérodimères de kératines vont être synthétisés. Les kératines K5 et K14 sont exprimées dans les kératinocytes indifférenciés de la couche basale puis disparaissent dans les couches supérieures alors que les kératines K1 et K10 sont produites dans les couches supra-basales et sont absentes de la couche basale (**Figure 2**) [10] [11].

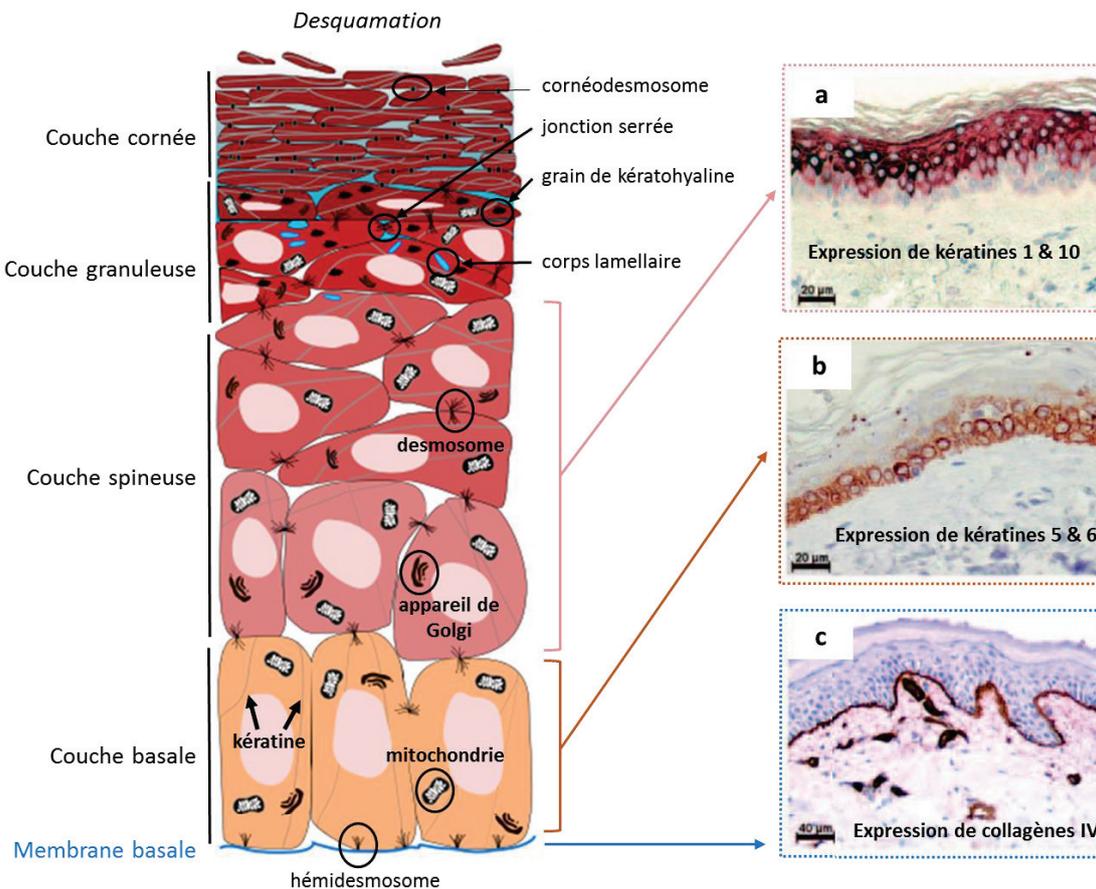


Figure 2 : Représentation schématique du processus de différenciation des kératinocytes en cornéocytes. Immunohistochimies de peau humaine (a-c), (a) expression des kératines 1/10 dans la couche spinieuse de l'épiderme, (b) expression des kératines 5/6 dans la couche basale de l'épiderme, (c) expression de collagène de type IV dans la membrane basale de l'épiderme et dans les vaisseaux du derme (adaptée de Eckhart et al., 2013 et Debeer et al., 2013) [11] [12].

La *couche basale* est constituée d'une monocouche de kératinocytes qui expriment les kératines K5 et K14, de mélanocytes et de cellules de Merkel. Les mélanocytes vont produire des granules appelés mélanosomes chargés de mélanine. La mélanine est responsable de la pigmentation de la peau, des cheveux et des poils et sa fonction principale est de protéger la peau des rayonnements UV du soleil [13]. On trouve également des cellules de Merkel responsables de la sensation tactile fine [14]. Ces mécanorécepteurs sont associés à des terminaisons nerveuses sensorielles libres et renferment des vésicules contenant des neuropeptides et des médiateurs sécrétés lors d'une stimulation [15]. Les kératinocytes ont une forme cubique et sont attachés par des hémidesmosomes à une membrane basale acellulaire qui sépare l'épiderme du derme et forme la jonction dermo-épidermique. Les kératinocytes basaux se divisent, chacun donnant deux cellules filles. L'une d'entre elles reste sur place pour se

Etude bibliographique : Chap I. La cicatrisation cutanée

diviser de nouveau tandis que l'autre peut suivre trois chemins différents : rester quiescente, entrer en apoptose pour mourir ou participer au processus de différenciation des kératinocytes des couches supra-basales de l'épiderme.

La *couche spinieuse* contient des kératinocytes qui ont une forme polygonale et volumineuse dans les couches profondes et une forme aplatie dans les couches les plus supérieures. Ils sont liés entre eux par des desmosomes qui donnent cet aspect « épineux » aux cellules. Ces jonctions desmosomiales confèrent à cette couche une grande solidité mécanique et une imperméabilité. Les kératinocytes ne se divisent plus et expriment des marqueurs de différenciation tels que les kératines K1 et K10. On trouve également des cellules de Langerhans impliquées dans le système immunitaire cutané [16]. Ces cellules dendritiques ont pour rôle d'internaliser les corps étrangers (virus, bactéries, allergènes) et de migrer vers les ganglions lymphatiques pour ensuite s'activer et présenter l'antigène phagocyté aux lymphocytes T.

La *couche granuleuse* est composée de kératinocytes avec une morphologie aplatie et parallèle à la surface de la peau. Leur noyau commence à dégénérer et leur cytoplasme contient des grains de kératohyaline et des granules lamellaires (lipides). Les grains de kératohyaline interviennent dans la formation de la matrice cytoplasmique des cornéocytes [11]. Au niveau de la jonction entre la couche granuleuse et la couche cornée, au niveau du pôle apical des kératinocytes de la couche granuleuse, les corps lamellaires fusionnent avec la membrane plasmique induisant la libération des lipides dans l'espace intercellulaire [17]. Ces lipides forment un ciment qui lie les cornéocytes entre eux pour obtenir la fonction de barrière de l'épiderme.

La *couche cornée* est la couche la plus externe, elle est constituée de kératinocytes différenciés appelés cornéocytes. Ces cellules de formes polyédriques sont très aplaties, complètement kératinisées et dépourvues de leurs noyaux et organites intracellulaires, elles sont dites mortes. Des cornéodesmosomes sont présents pour assurer une bonne cohésion entre les cornéocytes. Ces cornéocytes vont subir un processus de desquamation qui vise à éliminer ces cellules en rompant les liens inter-cornéocytaires, par l'action d'enzymes de la famille de la trypsine et de la chymotrypsine [18].

b. Le derme

Le derme est un tissu conjonctif de soutien dont l'épaisseur moyenne est de 1 à 2 mm. Il est majoritairement composé de fibroblastes qui synthétisent les composants de la matrice extracellulaire (MEC) tels que les fibres de collagènes et d'élastine, les glycoprotéines et les protéoglycanes [19]. Les fibroblastes sont aussi responsables de la sécrétion de protéases et de métalloprotéases matricielles (*matrix metalloproteinases*, MMP) impliquées dans le remodelage de la MEC au cours du processus de cicatrisation [20] [21]. Les collagènes constituent 70% du derme, ils sont responsables de la souplesse et de la résistance aux tensions et à la traction de la peau. L'élastine est la protéine responsable de l'élasticité du tissu permettant à la peau de s'étirer et de revenir en place après déformation. De nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques irriguent le derme, lui assurant une fonction de nutrition et de thermorégulation de la peau. Un système de défense mobile composé de cellules immunitaires telles que les leucocytes, les mastocytes, les macrophages, assure la défense contre l'intrusion d'éléments allogènes dans le derme. Ce dernier est organisé en deux couches qui se distinguent par la différence de composition et d'organisation de la MEC : le *derme papillaire*, superficiel et le *derme réticulaire*, profond (**Figure 3**).

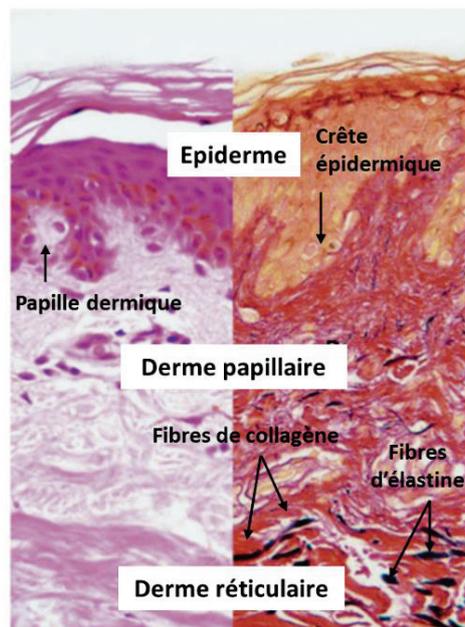


Figure 3 : Coupe histologique de peau humaine avec coloration hématoxyline-éosine HE (gauche) et élastine- verhoeff's van gieson (droite), X 140 [22].

Etude bibliographique : Chap I. La cicatrisation cutanée

Le *derme papillaire* est situé sous l'épiderme, au niveau des papilles dermiques qui s'imbriquent entre les crêtes épidermiques. Il est constitué d'un tissu conjonctif lâche composé de fibres de collagène de type I et III et d'élastine, orientées perpendiculairement à la surface de la peau. Au niveau des papilles dermiques, des capillaires sanguins issus du plexus vasculaire sous-papillaire permettent d'apporter les nutriments nécessaires à l'épiderme. Le derme héberge des terminaisons nerveuses libres dont certaines peuvent s'associer à des cellules de Merkel et des terminaisons nerveuses encapsulées spécialisées, telles que les corpuscules de Meissner (pour le toucher). Le *derme réticulaire* constitue la partie la plus profonde du derme. Il est constitué d'un tissu conjonctif plus dense avec des fibres de collagènes et des fibres élastiques (telles que l'élastine) orientées parallèlement à la surface de la peau. Il est caractérisé par une quantité plus faible de collagène de type III que le derme papillaire. De plus, on retrouve un plexus vasculaire permettant d'apporter les nutriments et les cellules du système immunitaire à l'épiderme. La racine des follicules pileux, les glandes de la peau (sudoripares et sébacées) et des terminaisons nerveuses encapsulées comme les corpuscules de Ruffini (récepteurs mécaniques) sont retrouvées dans cette couche.

c. L'hypoderme

L'hypoderme est un tissu conjonctif spongieux composé de cellules graisseuses, les adipocytes qui stockent les lipides. Ces cellules sont organisées en lobules séparés par des septa fibreux de collagènes issus du derme. Ces cloisons servent de passages aux vaisseaux et aux nerfs irriguant le derme (**Figure 4**). Le rôle principal de l'hypoderme est de stocker et de libérer des acides gras, permettant ainsi de réguler les réserves énergétiques de l'organisme selon les besoins et les approvisionnements. Il assure aussi une fonction de thermorégulation et de protection de l'organisme contre les chocs et constitue un réservoir de cellules souches mésenchymateuses.

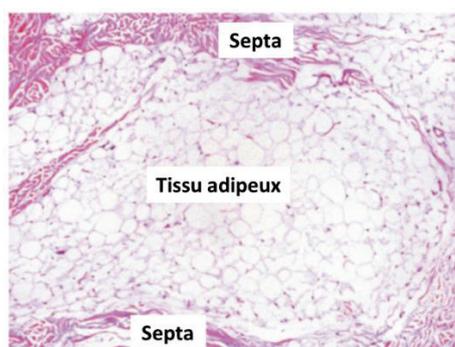


Figure 4 : Coupe histologique de tissu sous-cutané humain. Coloration HE, X 110 [22].

II. La brûlure : exemple de plaie cutanée profonde

a. Brûlures du combattant : aspects cliniques

Les blessures de guerre sont souvent des plaies multiples pénétrantes et/ou des brûlures (**Figure 5**). Elles sont souillées à des degrés variables par des microorganismes provenant des vêtements, de la peau ou de l'environnement. Les plaies pénétrantes sont provoquées par des balles ou des fragments métalliques issus de l'explosion de bombes, d'obus, de roquettes ou de grenades [23]. Ces lésions tissulaires résultent du transfert d'énergie du projectile aux tissus entraînant l'endommagement du tissu par écrasement ou arrachement. Les brûlures sont également fréquentes sur le théâtre d'opérations et constituent 10% des blessures, mortelles dans 8% des cas [24]. Un combattant brûlé sur deux présente des lésions traumatiques associées et un sur cinq des lésions d'inhalation. Les engins explosifs improvisés sont responsables d'un grand nombre des brûlures thermiques de 3^{ème} degré. Les brûlures non liées directement au combat ont une épidémiologie un peu différente. Celles-ci ont lieu lors d'incendies qui se produisent lorsque des matériaux combustibles s'enflamment, notamment lors d'opérations de « refueling » ou dans le cas d'incinération de déchets divers [25]. Les conséquences cliniques sont à la fois des atteintes cardiovasculaires, ventilatoires et métaboliques menant dans certains cas au décès du patient.

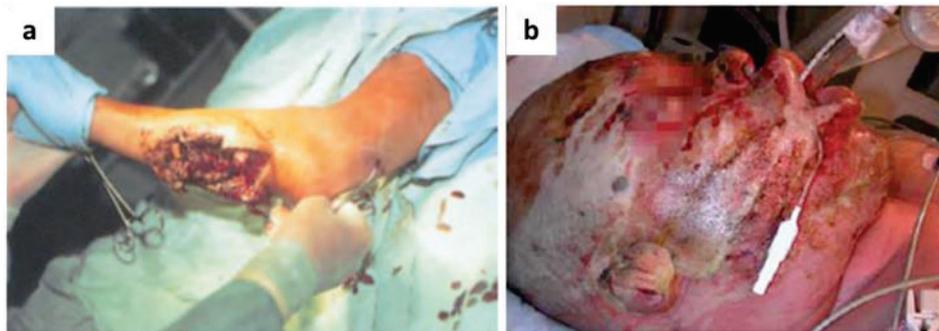


Figure 5 : Photographies des plaies du combattant. (a) blessure par balle du bras gauche, (b) brûlure sur le visage causée par un engin explosif improvisé à bord d'un véhicule [23] [25].

b. Evaluation clinique de la brûlure

La surface et la profondeur sont deux critères essentiels pour l'évaluation de la gravité d'une brûlure.

1. Profondeur de la brûlure

Selon la Société Française d'Etude et de Traitement des Brûlures (SFETB), des degrés de brûlure sont définis en lien avec (i) la profondeur des dommages tissulaires déterminée par histologie (**Figure 6**) et avec (ii) l'aspect clinique (**Tableau 1**).

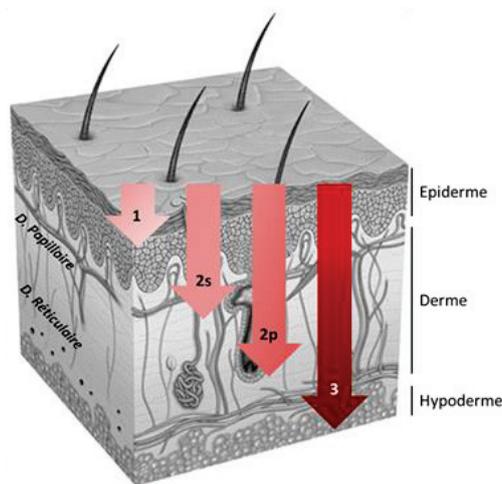


Figure 6 : Représentation schématique des différents degrés de brûlures en fonction de la profondeur des dommages tissulaires (1^{er} degré (1), 2^{ème} degré superficiel (2s), 2^{ème} degré profond (2p) et 3^{ème} degré (3), selon la SFETB 2006).

Cette classification joue un rôle décisionnel dans l'élaboration des modalités de prise en charge thérapeutique. Cependant, l'évaluation de la profondeur d'une brûlure chez un patient est essentiellement clinique. Le diagnostic est difficile car l'aspect clinique est souvent polymorphe et sujet à des variations dans les 48 premières heures qui suivent le traumatisme. En effet, une brûlure est rarement homogène et au sein d'une même localisation, elle peut être constituée de brûlures de profondeurs différentes. L'évaluation clinique de la profondeur des brûlures est assez précise pour distinguer les brûlures de 1^{er} et de 3^{ème} degré. Cependant, elle est beaucoup moins précise pour déterminer quelle brûlure de 2^{ème} degré doit bénéficier d'un débridement excisionnel suivi d'une greffe de peau. Pour aider les chirurgiens dans l'attribution des grades de brûlure, des technologies de pointe non invasives sont utilisées. Ces dernières sont basées

Etude bibliographique : Chap I. La cicatrisation cutanée

sur l'analyse du flux sanguin microvasculaire en lien directe avec la profondeur de la brûlure (par exemple le thermographie, l'utilisation de colorants, l'imagerie à laser Doppler) [26].

Classification	Profondeur	Clinique	Evolution
1^{er} degré (1)	Atteinte superficielle épidermique	Érythème douloureux	Guérison sans cicatrice en 4 à 5 jours après desquamation
2^{ème} degré superficiel (2s)	Atteinte totale de l'épiderme, Écrêtement de la membrane basale, Atteinte du derme papillaire	Douleurs intenses, Phlyctènes à parois épaisses suintantes, Fond rose /rouge, Saignement à la scarification	Guérison sans cicatrice en 10 à 14 jours, Dyschromies possibles
2^{ème} degré profond (2p)	Destruction de l'épiderme excepté au niveau des follicules pileux, Destruction de la membrane basale plus ou moins complète, Atteinte du derme réticulaire	Phlyctènes inconstantes à fond rouge brun, Quelques zones blanchâtres, Anesthésie partielle, Phanères adhérents	En l'absence d'infection guérison lente en 21 à 35 jours avec cicatrices majeurs, S'approfondit en cas d'infection
3^{ème} degré (3)	Destruction de la totalité de l'épiderme, Destruction complète de la membrane basale, Atteinte profonde du derme et parfois de l'hypoderme	Couleurs variables : du blanc au brun, Parfois noire carbonnée, Lésion sèche, carbonnée, Aspect de cuir avec vaisseaux Apparents sous la nécrose , Absence de blanchiment à la vitro-pression, Pas de saignement à la scarification, Anesthésie à la piqûre, Phanères non adhérents	Traitement chirurgical obligatoire

Tableau 1 : Récapitulatif des caractéristiques histologiques et cliniques avec le pronostic des différents degrés de la brûlure (SFETB 2006).

2. Surface de la brûlure

L'étendue d'une surface brûlée est exprimée en pourcentage de la surface corporelle totale brûlée au 2^{ème} ou au 3^{ème} degré : c'est le %TBSA pour « % total body surface area ». Ce pourcentage est calculé directement dès la prise en charge du soldat et peut être calculé par différentes méthodes. La règle des 9 de Wallace est utilisée dans l'appréciation initiale de la surface brûlée par les unités mobiles de réanimation. Celle-ci est applicable uniquement chez l'adulte car la tête d'un enfant représente un pourcentage de surface corporelle plus important (**annexe Figure 35a**). Dès l'arrivée dans des structures chirurgicales, une évaluation plus précise est réalisée à l'aide des tables de Lund et Browder, prenant en compte l'âge de la victime (**annexe Figure 35b**) [25] [27].

c. Physiopathologie de la brûlure : retentissement local et général

La brûlure entraîne des perturbations de la microcirculation cutanée, délimitant ainsi trois zones : une zone centrale de coagulation (nécrose), une zone périphérique de stase (ischémie) et une zone périphérique d'hyperémie (**Figure 7**) [28] [29]. La zone de coagulation est

Étude bibliographique : Chap I. La cicatrisation cutanée

constituée de tissu dévitalisé. La zone de stase est une zone ischémique. La zone la plus périphérique est appelée zone d'hyperémie, caractérisée par une vasodilatation, des changements inflammatoires sans dommage structurel.

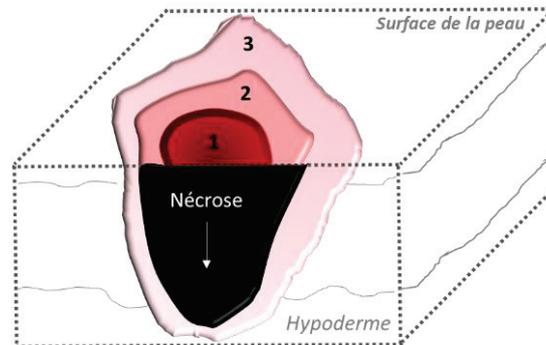


Figure 7 : Représentation schématique d'une brûlure de 3^{ème} degré avec les trois zones lésionnelles : 1. zone de coagulation, 2. zone de stase, 3. zone d'hyperémie (adapté de Jackson et al., 1953) [28].

Les altérations structurelles et moléculaires suite aux agressions thermiques déclenchent une cascade inflammatoire massive et complexe qui fait appel à des médiateurs chimiques de l'inflammation, synthétisés localement ou qui sont à l'état de précurseur inactif dans la circulation sanguine. Ces derniers d'origine plasmatique font intervenir des kinines (bradykinine), le système du complément et le processus de coagulation. Parmi les médiateurs locaux, on compte des amines vasoactives (histamine-sérotonine), des métabolites de l'acide arachidonique (prostaglandine, leucotriène), du monoxyde d'azote (NO), des espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) et des cytokines (le facteur de nécrose tumorale- α (*tumor necrosis factor- α* , TNF- α), les interleukines (*interleukins*, IL), l'interféron- γ (*interferons- γ* , IFN- γ)). Cette réponse inflammatoire locale engendre une hyperméabilité capillaire qui a pour résultat une fuite extravasculaire de protéines, d'électrolytes, d'eau et d'hématies responsables de la formation d'un œdème local pouvant se généraliser lorsque la brûlure est très étendue et profonde (25 à 30 % de la surface corporelle). Cette première phase dite « hydro-électrolytique » couvre les 48 premières heures après brûlure. Il s'ensuit une phase « hypermétabolique » qui dure jusqu'à la cicatrisation complète. Elle est caractérisée par une augmentation de la température corporelle, de la consommation d'oxygène et de glucose, de la production de CO₂. Des réactions métaboliques telles que la protéolyse et la lipolyse sont augmentées. Ces réactions métaboliques importantes entraînent un catabolisme des tissus et un épuisement des réserves de protéines essentielles se traduisant par un bilan azoté négatif, qui

cause la perte de masse corporelle (muscle), la perte de densité osseuse, la faiblesse musculaire et une mauvaise cicatrisation des plaies. Pour contrer ces problèmes, l'organisme doit mettre en place des réactions métaboliques comme la glycogénolyse, pour répondre aux besoins énergétiques. En plus de ce désordre métabolique, le retentissement général aussi peut impliquer des troubles immunologiques (effet immunodépresseur), cardiovasculaires, pulmonaires, gastro-intestinaux, hématologiques et rénaux. Tous ces changements entraînent des syndromes cliniques importants tels que l'insuffisance respiratoire et le syndrome de détresse respiratoire aiguë, des occlusions intestinales, la septicémie et l'insuffisance rénale.

d. Les traitements systémiques et locaux

La réanimation hydro-électrolytique doit être immédiatement réalisée selon des protocoles cliniques de prise en charge des brûlés à 20%TBSA. Ils recommandent l'administration par intraveineuse (IV) d'un liquide de réanimation pendant les 24 premières heures après brûlure. Cette solution de lactate de Ringer permet de restaurer l'équilibre de liquide extracellulaire et des électrolytes. Le volume injecté prend en compte le poids de la victime et est calculé selon la formule modifiée de Brooke ($2 \text{ mL} \times \%TBSA \times \text{poids en kg}$), la moitié étant injectée durant les huit premières heures. L'intubation est nécessaire pour les brûlés à 40%TBSA. Un traitement local doit aussi être réalisé au cours de la première phase. Pour cela, des pansements imprégnés d'argent comme Silverlon[®], Acticoat[®] ou SilverSeal[®] sont utilisés pour protéger la plaie des infections bactériennes (**Figure 8a**). L'utilisation d'antibiotiques prophylactiques chez les patients brûlés n'est pas recommandée sauf en périopératoire (en association avec les procédures d'excision et de greffe). En revanche, lorsque l'on suspecte une septicémie, le traitement par antibiotiques est nécessaire (**Figure 8b**). L'administration en IV d'antibiotiques tels que l'imipénème-cilastatine et l'amikacine, est utilisée en opération pour lutter contre les bactéries gram-négatives et positives et pour couvrir les multiples résistances à *pseudomonas spp* et *klebsiella pneumoniae*. L'œdème formé par les brûlures de 3^{ème} degré entraîne la formation d'escarres assimilée à un garrot. Ces brûlures sur les membres ou le cou provoquent une ischémie, lorsqu'elles sont situées au niveau du thorax, des escarres thoraciques se forment et engendrent des difficultés respiratoires. Pour rétablir le flux sanguin, des incisions de décharge (escarrotomies) sont pratiquées au bistouri (**Figure 8c**). La réanimation de la phase secondaire passe par une réanimation nutritionnelle par sonde nasogastrique. Elle est initiée car l'organisme a des besoins calorico-azotés importants pour bien cicatriser. En cas de septicémie,

Etude bibliographique : Chap I. La cicatrisation cutanée

une antibiothérapie adaptée est nécessaire. Au niveau local, il faut effectuer une excision chirurgicale permettant d'éliminer la peau nécrotique pour éviter la généralisation de la nécrose et la surinfection puis dans un deuxième temps réaliser les greffes de peau (homogreffes ou autogreffes) (**Figure 8d**).

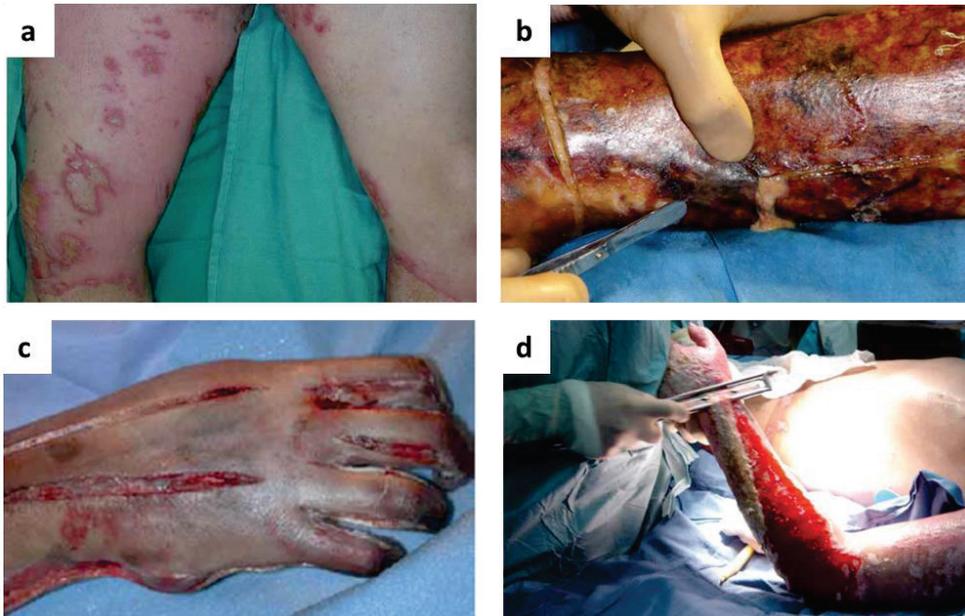


Figure 8 : Photographies de brûlures thermiques de 3^{ème} degré [25]. (a) brûlure infectée par un streptocoque (cellulite infectieuse), (b) septicémie due à une infection de la brûlure, (c) escarrotomie le long de la main, (d) excision chirurgicale de la peau brûlée avec un dermatome.

III. Le processus de cicatrisation cutanée

La cicatrisation est un processus physiologique dynamique complexe, qui se met en place après une blessure pour restaurer la structure cutanée. Il implique des événements de signalisation cellulaire et des cascades biochimiques. Après une lésion, la peau a la capacité naturelle de se réparer spontanément selon un processus divisé en quatre phases chevauchantes : (i) l'hémostase, (ii) l'inflammation, (iii) la prolifération, et (iv) le remodelage, entraînant la formation d'un tissu fibrotique non fonctionnel [21] (**Figure 9**). Cette division en phases distinctes est arbitraire car ces étapes se chevauchent et sont dépendantes les unes des autres, c'est pourquoi la phase de prolifération est initiée avant la fin de l'inflammation.

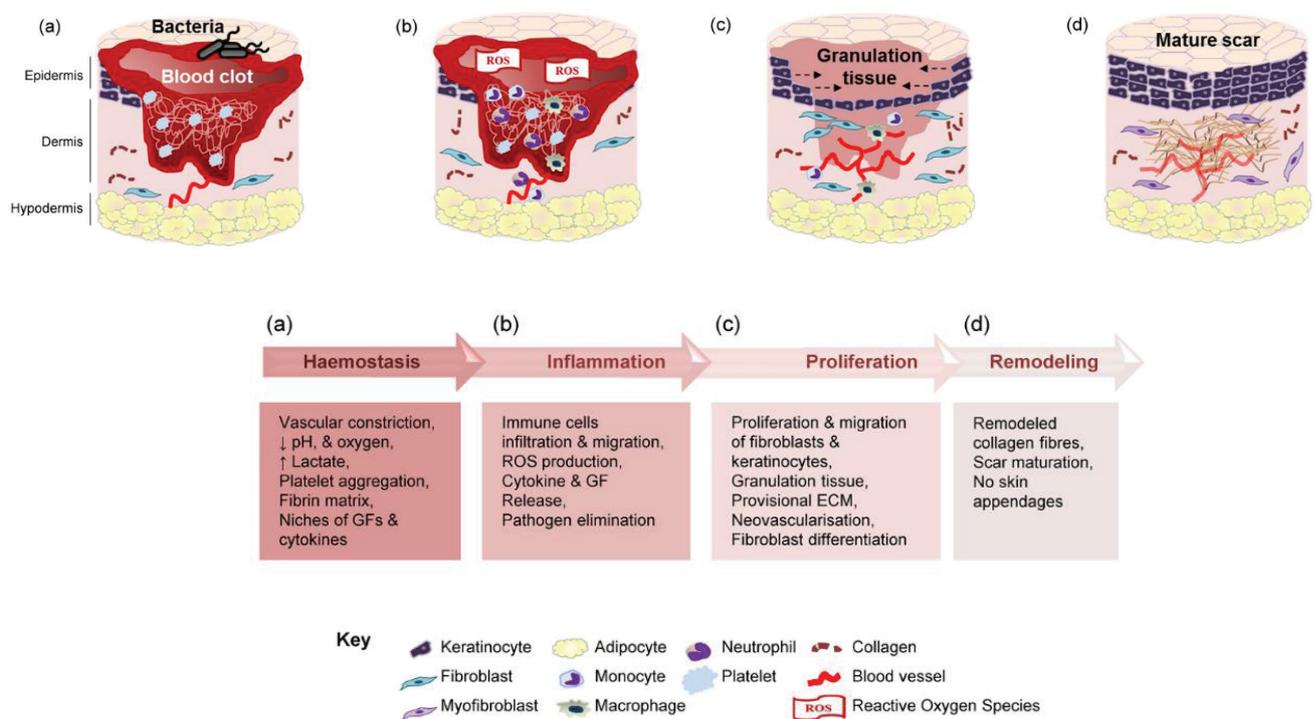


Figure 9 : Les événements biologiques impliqués dans le processus de cicatrisation des plaies cutanées (Berthet et al., 2017) [30]. Les quatre étapes du processus sont les suivantes : (a) hémostase, (b) inflammation, (c) prolifération et (d) remodelage. Abréviations : ECM, matrice extracellulaire, GFs, Facteurs de croissance, ROS, Espèce réactive de l'oxygène.

a. Le processus d'hémostasie

Après une lésion cutanée, une extravasation de sang se produit suite à la destruction des vaisseaux sanguins. Immédiatement, (i) le **processus d'hémostasie** est initié pour former une MEC provisoire servant d'échafaudage pour la migration des kératinocytes. Un processus physiologique se met en place pour arrêter le saignement et créer une barrière contre les

Etude bibliographique : Chap I. La cicatrisation cutanée

microorganismes envahissants. Immédiatement, une vasoconstriction se produit, suivi de l'agrégation et la dégranulation des plaquettes. Puis une cascade de coagulation a lieu, celle-ci conduit à la formation d'un caillot de sang fibrino-plaquettaire. Ce dernier est composé de plaquettes incluses dans un réseau de fibrines réticulées, et des protéines de la MEC telles que la fibronectine, la vitronectine et la thrombospondine [31]. Le caillot de sang fournit également un réservoir de facteurs de croissance tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (*platelet differentiation growth factor*, PDGF), le facteur de croissance transformant- β (*transforming growth factor- β* , TGF- β), le facteur de croissance des fibroblastes 2 (*fibroblast growth factor 2*, FGF2), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), le facteur de croissance des hépatocytes (*hepatocyte growth factor*, HGF), le facteur de croissance apparenté à l'insuline (*insulin-like growth factor*, IGF), le facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor*, EGF) qui stimulent les cellules impliquées dans les différentes étapes du processus de cicatrisation [21] [32].

b. La réaction inflammatoire

La **réaction inflammatoire** (ii) se produit simultanément avec la phase d'hémostase et peut durer jusqu'à 48 heures après une blessure. Cette étape se caractérise par l'infiltration et la migration des leucocytes impliqués dans la phagocytose des débris cellulaires et des microorganismes. Les neutrophiles apparaissent en premier dans la plaie, suivis par les lymphocytes et les monocytes qui se différencient en macrophages activés. Ces derniers sécrètent des facteurs de croissance tels que le VEGF et le PDGF qui vont initier la formation du tissu de granulation. Des ROS et des protéinases sont produites par les macrophages et les neutrophiles pour protéger la plaie contre les infections bactériennes exogènes. D'autres types cellulaires tels que les fibroblastes peuvent être stimulés par des cytokines pro-inflammatoires pour produire des ROS [33]. Les cellules immunitaires sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et les interleukines IL-1 α , IL-1 β , IL-6 qui vont stimuler la réponse inflammatoire et permettre d'engager la **phase de prolifération** (iii).

c. La phase de prolifération

Cette troisième phase peut durer de 2 à 10 jours après la blessure et a pour conséquence la formation d'un nouveau tissu. Elle se caractérise par la prolifération et la migration des fibroblastes, des kératinocytes et des cellules endothéliales, ces dernières étant impliquées dans l'angiogenèse [32]. Cette phase implique deux mécanismes cellulaires distincts, le premier est le processus de réépithélialisation orchestré par les kératinocytes du bord de la plaie qui migrent, prolifèrent et se différencient pour former un épiderme mature. Des facteurs de croissance comme le HGF, le FGF2, FGF7, FGF10, EGF et le TGF- α vont influencer positivement la réépithélialisation. Les changements environnementaux comme la baisse de calcium, l'augmentation de magnésium, l'acidification et l'hypoxie sont impliqués dans la réépithélialisation. Dans ce processus sont aussi impliquées des protéines de la MEC, protéases comme les métalloprotéases, protéines du cytosquelette et des enzymes qui régulent le stress oxydant. Le second processus est médié par les fibroblastes, impliqués dans la formation d'un tissu de granulation. Des facteurs de croissance comme le VEGF, le FGF2 sécrétés par les macrophages, les kératinocytes et les fibroblastes vont réguler positivement l'angiogenèse. Les modifications physiologiques apparaissant au niveau de la plaie, tel la production d'acide lactique et l'hypoxie tissulaire, vont également stimuler le processus d'angiogenèse. Les capillaires nouvellement formés, associés aux fibroblastes et aux macrophages, aident à transformer la matrice de fibrine en un tissu de granulation. Cette structure forme une MEC transitoire, dans laquelle les fibroblastes produisent des glycoprotéines telles que des collagènes, des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes dont l'acide hyaluronique. À la fin de cette étape, les fibroblastes situés dans le lit de la plaie sont stimulés par les macrophages, certains se différenciant en myofibroblastes responsables de la contraction de la plaie.

d. La phase de remodelage tissulaire

Enfin, le **remodelage** de la peau (iv) commence 2 ou 3 semaines après la blessure et peut durer un an ou plus. Le tissu de granulation est progressivement remplacé par une cicatrice mature composée de fibres élastiques, de glycosaminoglycanes et de fibres de collagène majoritairement de type I. Le remodelage du collagène est régulé par quelques enzymes protéolytiques, les MMP, sécrétées par les fibroblastes, les macrophages et les cellules endothéliales et épidermiques. Un équilibre entre les MMP et leurs inhibiteurs les TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) doit être maintenu pour une cicatrisation normale. La plupart

Etude bibliographique : Chap I. La cicatrisation cutanée

des cellules subissent une apoptose et des boucles de rétroaction permettent de maintenir les concentrations de cellules vivantes [34]. Toutefois, la peau cicatrisée reste non fonctionnelle. Elle est composée principalement de fibroblastes et de fibres de collagènes désorganisées et est dépourvue d'annexes cutanées. Le tissu reconstruit est moins résistant, il ne retrouvera jamais les propriétés initiales de la peau saine non blessée.

Chapitre II. Modèles expérimentaux de plaie cutanée pour l'étude de la cicatrisation

Comme décrit précédemment, la physiopathologie des plaies aiguës traumatiques et/ou chroniques est souvent multifactorielle et le processus de réparation est complexe. Pour tester l'efficacité de nouveaux agents thérapeutiques, il est nécessaire d'utiliser des modèles mettant en jeu des mécanismes se rapprochant au plus près des mécanismes moléculaires, cellulaires et physiologiques qui régissent la cicatrisation chez l'homme. Pour cela, des modèles de plaie utilisant des animaux (*in vivo*), des explants de peau humaine ou animale (*ex vivo*) et des cellules de peau humaine (*in vitro*) sont utilisés (**Figure 10**). Aucun de ces modèles n'est idéal, ils ont chacun des avantages et des limites.

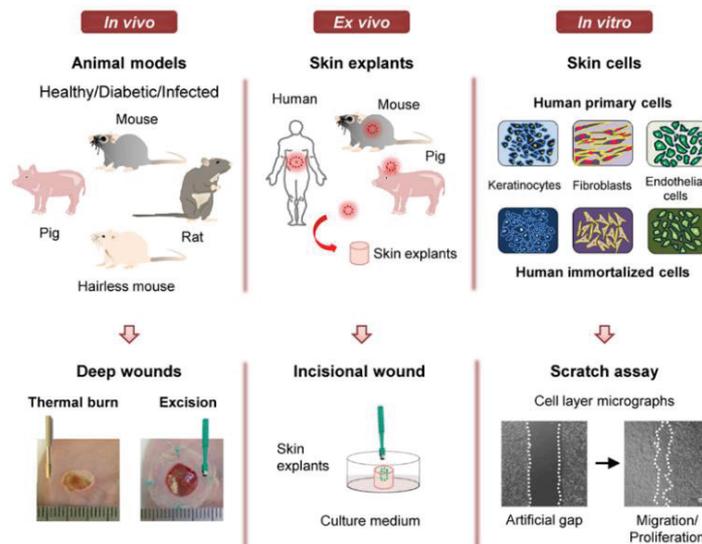


Figure 10 : Représentation schématique des modèles d'étude de la cicatrisation [30].

I. Les modèles expérimentaux d'étude *in vivo* du processus de cicatrisation

a. Choix de l'espèce animale

De nombreuses publications montrent que le porc est un modèle idéal d'étude de la cicatrisation [35] [36] [37]. Sa peau est en effet anatomiquement et physiologiquement assez semblable à la peau humaine. L'épaisseur de l'épiderme, du derme, ainsi que l'abondant tissu adipeux sous-dermique sont comparables à ceux de l'homme. Les collagènes cutanés porcins et humains sont semblables, même si la peau du porc est moins élastique [38]. De plus, les plaies se referment principalement par un processus de réépithélialisation chez l'homme comme chez le porc. La cinétique de cicatrisation est assez variable en raison d'un certain nombre de facteurs tels que la taille de la plaie, le type de plaie et l'état de santé général. Des études de brûlures cutanées ont montré des délais de cicatrisation similaires chez le porc et l'homme. De par toutes ces ressemblances avec l'homme, le porc constitue un excellent modèle animal, cependant son utilisation dans les études est limitée comme le montre la **Figure 11**. Le coût élevé de l'animal, les conditions d'hébergement, la main d'œuvre et la lourdeur des expérimentations représentent des contraintes à son utilisation.

Pour ces raisons, les rongeurs sont les animaux de laboratoire les plus largement utilisés en raison de leur faible coût, de leur disponibilité et de la facilité à les héberger et à les manipuler (**Figure 11**).

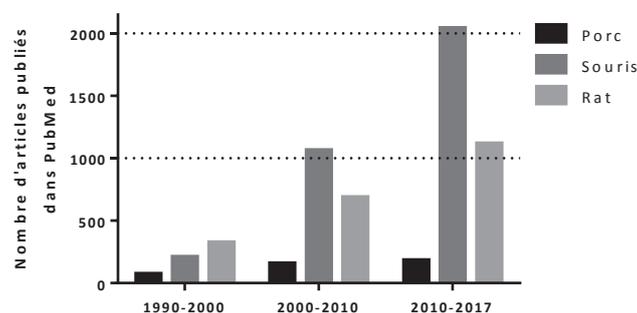


Figure 11 : Graphique représentant le nombre d'articles publiés dans PubMed en rentrant les termes « *wound healing in vivo pig* », « *wound healing in vivo mouse* » et « *wound healing in vivo rat* ».

Etude bibliographique : Chap II. Modèles expérimentaux de plaie cutanée pour l'étude de la cicatrisation

Néanmoins, l'anatomie et la physiologie de la peau des rongeurs diffèrent nettement de celle de l'homme. (**Tableau 2**) [39]. La présence du muscle cutané *panniculosus carnosus* chez les rongeurs conduit à la fermeture des plaies majoritairement par contraction des bords de la plaie. De plus, la cicatrisation est plus rapide chez les rongeurs que chez l'homme ce qui peut compliquer l'étude des mécanismes de cicatrisation et masquer de potentiels effets d'agents thérapeutiques. La peau de souris présente une forte densité de follicules pileux riches en cellules souches, ces dernières jouant un rôle important dans la cicatrisation [40] [41]. Il existe des différences notables avec l'homme, dans l'immunité innée et adaptative et dans l'expression des chimiokines. Un des avantages du modèle rongeur dans l'étude de la cicatrisation cutanée est qu'il existe de nombreux modèles de souris transgéniques, qui permettent d'étudier l'implication de certains gènes dans le processus de cicatrisation [42] [43] [44]. Des modèles pathologiques de souris transgéniques, comme le diabète, peuvent également être utilisés pour l'étude du processus de cicatrisation altérée et retardée [43].

Différences majeures	Souris 	Homme 
Cycle pileux	Approximativement 3 semaines	Très variable, région-dépendante
Architecture épithéliale	Pas de crêtes épidermiques	Crêtes épidermiques présentes
Glandes sudoripares apocrines	Non présentes dans la peau, importantes dans les glandes mammaires	Présentes dans les aisselles et les régions cutanées inguinales et périmales
Propriétés biomécaniques	Fine, souple et lâche	Epaisse, relativement rigide, adhérente aux tissus profonds
Epaisseur hypodermique	Dépendant du cycle pileux	Moins variable
Couche musculaire sous-cutanée	Présent à travers le <i>panniculosus carnosus</i>	Présente uniquement dans la région du cou (<i>platysma</i>)
Principale méthode de cicatrisation des plaies	Contraction	Formation d'un tissu de granulation et réépithélialisation pour former un nouveau tissu

Tableau 2 : Principales différences entre la peau de souris et de l'homme (adapté de Wong et al., 2011) [39].

La souche de souris SKH1 sans poil est un modèle attrayant pour les études de cicatrisation cutanée. L'avantage majeur est que l'épilation avec le rasoir ou la crème dépilatoire est évitée limitant ainsi les réactions inflammatoires associées [45] [46]. En outre, l'absence de repousse de poils empêche l'obscurcissement de la réparation des plaies. Le processus de cicatrisation de cette souche dans des conditions physiologiques ou pathologiques (ischémie, diabète) est identique à celui retrouvé chez les souris avec poils. Le seul inconvénient de cette souche est un fond génétique relativement peu caractérisé et la non-consanguinité. Un autre modèle utilisé pour les études de cicatrisation est la souris athymique BALB / c-nude. Au contraire de la souris

Etude bibliographique : Chap II. Modèles expérimentaux de plaie cutanée pour l'étude de la cicatrisation

SKH1, cette souche présente le principal inconvénient d'être immunodéficience, or le système immunitaire joue un rôle important dans le processus de cicatrisation [45]. En dépit des limites rappelées ci-dessus, la souris reste l'espèce de référence pour les études de cicatrisation.

b. Les modèles de plaies cutanées profondes

Différents types de plaies sont décrit chez l'homme. Elles peuvent être classées en deux catégories : les plaies aiguës (chirurgicales ou traumatiques) et les plaies chroniques (ulcères de jambe, escarres, plaies du diabétique). Chez la souris saine, les plaies expérimentales les plus couramment étudiées sont des plaies d'incision, d'excision (partielle ou totale) et de brûlure (thermique ou chimique), ainsi que des modèles de fibrose cutanée [47]. En situation pathologique comme le diabète, les plaies les plus étudiées chez la souris sont les modèles d'ulcère de pression, de lambeau ischémique et d'excision [39] [44].

L'excision totale consiste en l'élimination de l'ensemble des couches de la peau. Ces plaies peuvent être de différentes tailles et formes et sont réalisées à l'aide de punch à biopsie ou de ciseaux chirurgicaux. Pour minimiser la contraction cutanée locale et étudier la cicatrisation par réépithélialisation et formation du tissu de granulation, un anneau en silicone est fixé autour de la plaie [48]. Des films transparents sont positionnés sur ces plaies pour maintenir un environnement humide. Ce modèle très standardisé, permet d'étudier de manière simple le processus de cicatrisation en terme (i) de chronologie (cinétique de fermeture) et (ii) de physiologie (tissu de granulation, vascularisation, altérations matricielles...) par prélèvements de tissu cicatriciel à intervalle de temps pour des analyses moléculaires et histologiques [44]. Des pathologies telles que le diabète et l'immunodéficience peuvent être associées à ce modèle de plaies pour construire des modèles de cicatrisation retardée chez la souris.

Le modèle de brûlure thermique infectée est largement utilisé chez les rongeurs et le porc pour tester l'efficacité de traitements anti-infectieux. De nombreuses méthodes ont été développées pour induire ces plaies. Elles utilisent de l'eau bouillante, de l'éthanol enflammé, des barres métalliques préchauffées et la flamme [36]. Ces modèles sont très souvent associés à des infections bactériennes expérimentales (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, ...). Néanmoins, l'inconvénient majeur de ces méthodes est le manque de standardisation.

L'importance croissante des préoccupations éthiques et les limites des modèles animaux, due aux différences anatomiques et physiologiques par rapport à l'homme, peuvent limiter la pertinence scientifique de ces modèles *in vivo*. Pour pallier ces limitations des modèles alternatifs *ex vivo* et *in vitro* existent.

II. Les modèles expérimentaux d'étude *ex vivo* du processus de cicatrisation

Des modèles *ex vivo* de plaies ont été mis en place à partir de biopsies de peau d'origine humaine (chirurgies plastiques, cadavres, amputations) et animale [49] [50]. Ils sont principalement utilisés pour évaluer la toxicité de produits chimiques, pharmaceutiques ou cosmétiques, ainsi que pour des études de pénétration percutanée. Des plaies d'excision peuvent être réalisées sur ces modèles *ex vivo* : elles sont d'épaisseur partielle, lorsque l'épiderme et la partie supérieure du derme sont éliminés, ou de pleine épaisseur lorsque l'épiderme et le derme sont éliminés [49] (**Figure 12**).

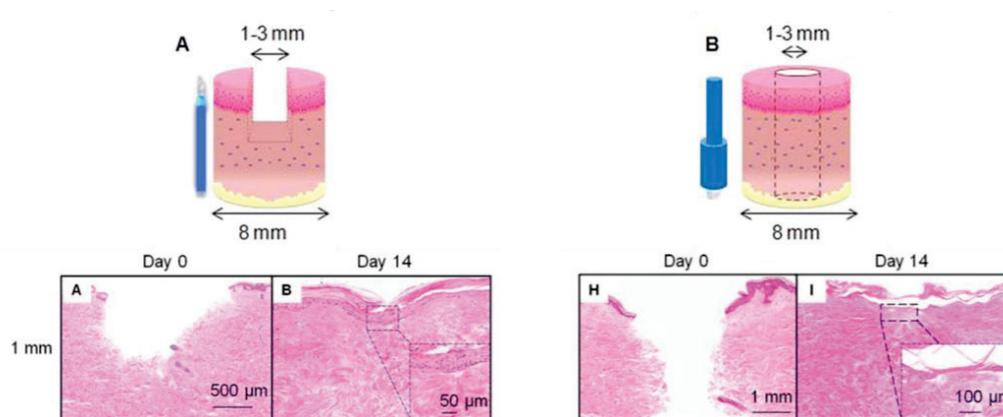


Figure 12 : Modèles *ex vivo* de peau humaine avec plaie partielle (A) ou de pleine épaisseur (B) [49].

L'utilisation de peau humaine excisée est considérée comme le « gold standard ». Cependant, du fait de la disponibilité limitée et de la durée de vie restreinte de l'explant humain après excision (7 à 14 jours), des explants de peau animale sont régulièrement utilisés (porcs, rongeurs). La faiblesse des réactions physiologiques dans le tissu cutané isolé limite aussi l'utilisation de ces modèles. Bien que les modèles *ex vivo* présentent de nombreuses limites, ils offrent des avantages notables. Les expériences sont faciles à mettre en œuvre, toutes les cellules de la peau y compris les annexes cutanées sont présentes, ce qui en fait un modèle plus pertinent, sur le plan physiologique, que les modèles *in vitro*. Il s'agit d'un modèle relevant de la peau humaine qui concourt à diminuer l'utilisation de l'animal.

III. Les modèles expérimentaux d'étude *in vitro* du processus de cicatrisation

a. Les modèles *in vitro* de peau reconstruite

Les modèles *in vitro* de peau reconstruite sont des outils importants pour la recherche fondamentale, à des fins industrielles (études de cytotoxicité, ciblage de drogues, tests de nouvelles thérapies et stratégies de traitement) et pour des applications cliniques. Le besoin de ces modèles *in vitro* est en augmentation car la réglementation de l'Union européenne (UE) encourage le remplacement, la réduction et le raffinement des modèles animaux (directive UE 2010/63 / UE) et interdit de tester les ingrédients cosmétiques chez les animaux (EU Cosmetic Directive 76/768 / EEC; EU Cosmetics Products Regulation [CE] No 1223/2009, REACH Regulation [CE] 1907/2006) [51]. Il existe un large éventail de modèles *in vitro* de peau humaine reconstruite, qui diffèrent selon (i) leur complexité biologique, (ii) les exigences scientifiques et (iii) les techniques utilisées pour les élaborer. Ces modèles ont évolué à partir de simples cultures 2D organisées en monocouche composée d'un seul type cellulaire, vers des cultures 3D avec un seul type cellulaire jusqu'à des cultures 3D composées de différents types cellulaires. Les dernières avancées portent sur la miniaturisation de tissu/organe sur puce et tend à s'étendre à l'organisme entier sur puce (**Figure 13**).

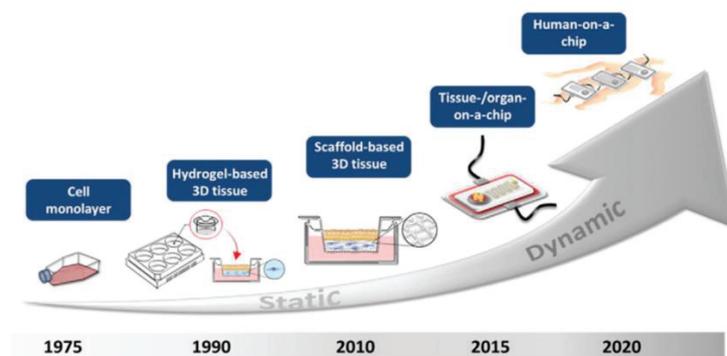


Figure 13 : Développement de modèles *in vitro* de peaux reconstruites : des monocouches cellulaires simples jusqu'à la technologie escomptée de puces contenant l'organisme entier de l'homme [52].

1. Culture bidimensionnelle (2D) de cellules en monocouche

Les techniques basées sur des systèmes de culture 2D sont largement utilisées en préclinique pour évaluer la toxicité de candidats médicaments et les mécanismes cellulaires impliqués. Dans ce modèle unicellulaire, des cellules primaires et des lignées de cellules immortalisées sont utilisées (**Tableau 3**). Les plus utilisées sont les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales vasculaires issues de culture primaire humaine [53] [54] [55] [56]. Les cellules immortalisées sont couramment utilisées car elles sont plus stables et plus faciles à cultiver que les cellules primaires, fragiles et sujettes à des changements morphologiques après la sous-culture [57] [58] [59].

Type de culture	Type cellulaire	Espèce	Tissu d'origine	Nom
Primaire	Kératinocyte	Humaine	Epiderme	Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEK)
	Fibroblaste		Derme	Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF)
	Endothéliale vasculaire		Derme	Primary Dermal Microvascular Endothelial Cells
Lignée cellulaire	Kératinocyte	Humaine	Epiderme	HaCaT
		Murine		XB-2
	Fibroblaste	Humaine	Derme	Hs68, BJ fibroblasts, CCD-1112Sk
		Murine	Embryonnaire	NIH3T3
	Endothéliale vasculaire	Humaine	Derme	Human Microvascular Endothelial Cells -1 (HMEC-1)

Tableau 3 : Types cellulaires les plus utilisés dans les études de cicatrisation.

Cependant, les modifications génotypiques et/ou phénotypiques des lignées entraînent des réponses cellulaires potentiellement modifiées, par rapport aux cellules primaires après exposition à des facteurs externes. En effet, des différences significatives dans la migration cellulaire, la prolifération, la réponse aux médicaments peuvent être observées selon les cellules utilisées, primaires vs lignées [60] [61] [62]. En plus d'être facile à mettre en place dans un laboratoire de culture cellulaire, ce modèle permet de tester très rapidement un grand nombre de conditions. Cependant, les réponses cellulaires obtenues en présence des cibles thérapeutiques ne sont pas complètement fiables. La perte de morphologie native des cellules, la perte d'interaction avec les autres cellules et la MEC sont des limites aux modèles 2D. Ces contraintes peuvent cependant être contournées par l'utilisation de modèles 3D [63]. Par exemple, les kératinocytes cultivés en monocouche développent un phénotype immature en raison de l'absence de processus de différenciation physiologique, responsable de la formation

de la barrière épidermique (*stratum corneum*) [64]. De plus, des différences au niveau du métabolisme cellulaire, plus précisément dans l'expression génique d'enzymes, leur synthèse protéique et leur activité enzymatique, sont également observées entre des modèles 2D et des structures épidermiques 3D. Les modèles 3D se rapprochent le plus des environnements *in vivo* rencontrés chez l'homme [65]. En raison de la fragilité des monocouches 2D, seule l'application directe de substance liquide est réalisable. La mise en contact directe de formulations semi-solides ou solides sur ces monocouches cellulaires provoque leur destruction suivie de la mort cellulaire. Pour résoudre ce problème, il est possible de pré-incuber ces formulations dans un milieu de culture et à des intervalles de temps prédéterminés, d'appliquer le surnageant à la monocouche cellulaire.

2. Culture tridimensionnelle (3D)

Contrairement aux cultures 2D, les cultures cellulaires 3D permettent de créer des environnements *in vitro* plus proches de l'environnement *in vivo* de la peau humaine. Cependant, elles sont bien plus difficiles à élaborer en laboratoire que les cultures 2D immergées dans du milieu de culture. Deux types de modèles 3D existent : l'épiderme humain reconstruit et la peau reconstruite, dite de « pleine épaisseur », comprenant l'épiderme et le derme (**Figure 14**). Ces modèles sont utilisés principalement pour des études de toxicité, de perméabilité de principes actifs, de dommages tissulaires (exposition UV, irritation et corrosion de la peau).

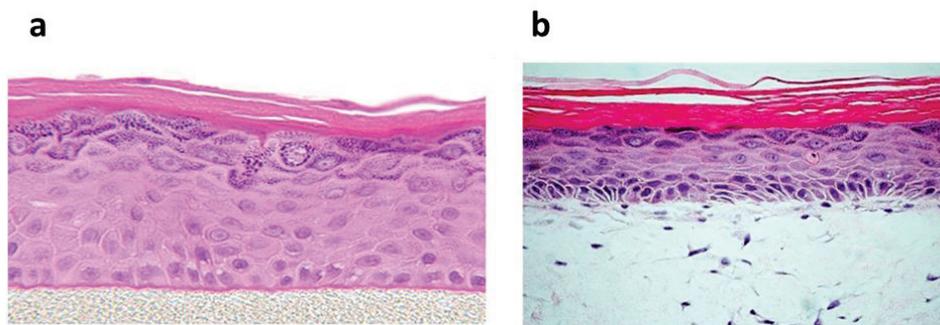


Figure 14 : Modèles 3D de peaux humaines reconstruites commercialisés par MatTek corp. (a) EpiDerm™ - Epiderme reconstruit (b) EpiDerm-FT™ - Peau reconstruite avec épiderme et derme. Coloration HES.

Etude bibliographique : Chap II. Modèles expérimentaux de plaie cutanée pour l'étude de la cicatrisation

Les modèles d'épiderme humain reconstitué sont composés de kératinocytes primaires humains mis en culture sur des plaques de culture cellulaire type Transwell® (**Figure 15**).

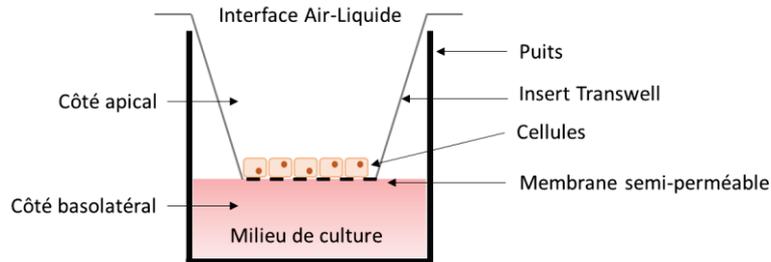


Figure 15 : Représentation schématique d'un insert Transwell®. Ces systèmes sont disponibles dans le commerce sous forme de systèmes Transwell® constitués d'une plaque multi-puits, équipée d'un insert contenant une membrane en polycarbonate semi-perméable, pour séparer l'ensemble en deux compartiments (apical = compartiment intérieur, basolatéral = compartiment extérieur) pour une culture à l'interface air-liquide.

Des modèles 3D d'épiderme reconstitué sont commercialisés et certains d'entre eux sont approuvés comme alternative aux modèles animaux, dans un contexte réglementaire basé sur de multiples normes ECVAM (« European Center for Validation of Alternative Methods ») et directives OECD TG (« Organization of Economic Co-operation and Development Test Guideline »), pour des essais respectifs de corrosion et d'irritation de la peau selon OECD TG 431 et 439 (**Tableau 4**) [52] [66] [67].

Nom	Fabricant	Cellules primaires humaines	Lignes directrices d'essai de l'OECD
EpiDerm™	MatTek Corp. et MatTek IVLSL	Kératinocytes	OECD TG 431, OECD TG 439
EpiSkin™ et SkinEthic™	EPISKIN s.a.		
LabCyte EPI-MODEL	J-Tech		
EpiCS®	Cell systems		OECD TG 431
Melanoderm	MatTek Corp.	Kératinocytes, mélanocytes	-
SkinEthic™ Reconstructed Human Pigmented Epidermis	EPISKIN s.a.		
EpiCS®-M	Cell systems		

Tableau 4 : Modèles *in vitro* d'épiderme humain reconstitué commercialisés.

La morphologie, la composition en lipides et la différenciation cellulaire de ces épidermes reconstitués se sont révélées être très proches de celle de la peau humaine. En effet, le transcriptome des épidermes reconstitués a montré une similitude dans l'expression de marqueurs de différenciation épidermique (filaggrine, loricrine et involucrine) avec l'épiderme humain [52] [66]. En revanche, ces marqueurs de différenciation ne sont pas exprimés dans les

Etude bibliographique : Chap II. Modèles expérimentaux de plaie cutanée pour l'étude de la cicatrisation

modèles 2D, ce qui prouve que les kératinocytes ne présentent pas de phénotype différencié mature dans ces conditions. Contrairement aux modèles 2D, les modèles 3D permettent d'étudier une large gamme de formes galéniques (liquides, semi-solides et solides) par administration directe à la surface de la peau reconstruite, aux concentrations finales d'utilisation [66]. Cependant, ces modèles 3D présentent des limites car des facteurs micro-environnementaux ne sont pas présents comme l'interaction entre l'épithélium et le tissu conjonctif adjacent, régulateur clé de la morphogenèse épidermique et de l'homéostasie.

Le modèle 3D de peau reconstruite humaine, associant à la fois l'épiderme et le derme, constitue le modèle 3D de référence le plus proche de la peau humaine. Pour reconstituer le derme, différents substrats cellulaires (hydrogel, fibre, éponge de collagènes) sont utilisés, chacun présentant des avantages et inconvénients. Les fibroblastes primaires humains sont incorporés à ces supports sur lesquels des kératinocytes primaires humains sont ensuite mis en culture en présence d'une interface air-liquide qui permet leur différenciation et favorise la formation de la jonction épidermique-dermique. Les hydrogels ne ressemblent pas à la structure de la MEC, responsable des propriétés biomécaniques du derme, et impliquée dans les réponses cellulaires. Ils ont une mauvaise capacité de diffusion contrairement aux structures fibreuses qui, de par leur structure en réseau, permettent un bon approvisionnement en nutriments, transport des déchets et qui ont pour effet une culture du modèle 3D à plus long terme. De par leurs propriétés biomécaniques proches de la MEC et leur capacité de faire adhérer et proliférer les cellules, les fibres en polymère sont un substrat cellulaire d'intérêt. Une limite à leur utilisation est la nécessité d'un équipement technique spécifique pour leur synthèse. Des éponges de collagènes sont aussi utilisées car leur structure permet une pénétration optimale des cellules dans l'échafaudage, leur migration et leur croissance [52]. Certains modèles sont commercialisés et malgré leur standardisation ils sont en cours d'acceptation réglementaire (**Tableau 5**).

Nom	Fabricant	Cellules primaires humaines	Lignes directrices d'essai de l'OECD
EpiDerm™-FT	MatTek Corp.	Kératinocytes, fibroblastes	-
T-Skin™	EPISKIN s.a.		
Phenion®FT	Henkel		
EpiCS®-FT	Cell systems		

Tableau 5 : Modèles in vitro de peau reconstruite humaine de pleine épaisseur.

Les cellules primaires humaines sont les cellules les plus utilisées dans les modèles 3D, cependant des limites, comme leur disponibilité, leur durée de vie et la variabilité dépendante des donneurs, apparaissent. Pour pallier ces limites, des modèles de peau reconstruite utilisant uniquement des lignées cellulaires sont développés. Celles-ci ont montré de très fortes similitudes avec la peau humaine native (**Figure 16**) [68].

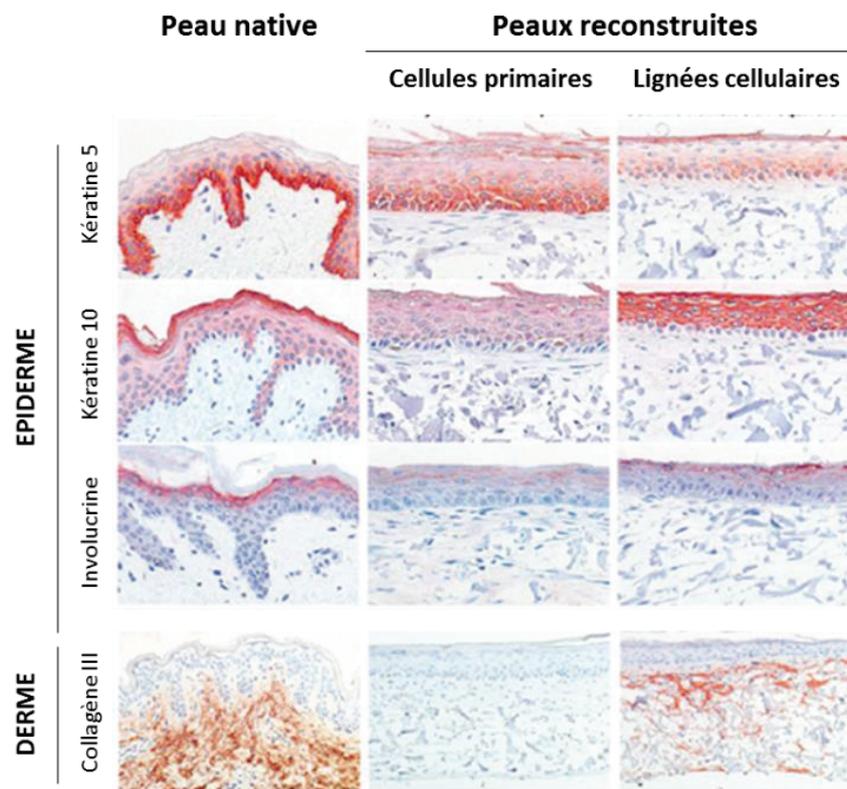


Figure 16 : Marquages immunohistochimiques des marqueurs de différenciation de l'épiderme et de la matrice du derme sur de la peau humaine native, de la peau reconstruite issue de cellules primaires et de lignées cellulaires [68].

Les modèles 3D permettent de dépasser certaines limites des modèles 2D. Les modèles de peaux reconstruites sont en évolution permanente et ils sont maintenant déclinés en modèle immunocompétent, endothélialisé et adipeux [69] [70] [71]. Des études ont montré leur faisabilité par incorporation, par exemple, de cellules endothéliales vasculaires et de macrophages dermiques [70]. Des cellules de Langerhans épidermiques et des cellules dendritiques dermiques peuvent aussi être incorporées, en fonction des conditions de culture [69]. À ce jour, ces précédents modèles ne sont toujours pas commercialisés même si leur faisabilité a été démontrée.

b. Les modèles d'étude de processus cellulaires impliqués dans la cicatrisation des plaies

Bien que les études *in vitro* ne reproduisent pas complètement le comportement des cellules dans un organisme vivant, elles reflètent des mécanismes cellulaires impliqués dans le processus de cicatrisation. Elles permettent également d'étudier une multitude de cibles avec une interférence minimale due à des facteurs externes. Un des tests les plus utilisés sur les modèles 2D est le test de « scratch », lors duquel les phénomènes de migration et de prolifération cellulaires sont étudiées, après la formation d'une brèche, sur une monocouche de cellules confluentes [72]. Ces événements cellulaires sont suivis par capture d'images en microscopie jusqu'à fermeture complète de la « plaie ». Les techniques d'imagerie cellulaire et de microscopie permettent de suivre individuellement des cellules en cours de migration. Cette méthode de faible coût est facile à mettre en place dans un laboratoire de culture cellulaire. Pour les modèles reconstruits en 3D composés de compartiments épidermiques et dermiques, une gamme plus large de techniques de blessures peut être réalisée, y compris les dommages mécaniques (punch, scalpel) et thermiques (laser-CO₂, objets métalliques chauffés ou refroidis, application de la pression). L'ensemble de ces modèles *in vitro* met en évidence un des mécanismes cellulaires clé du processus de cicatrisation qui est la réépithélialisation, par migration et prolifération des cellules épidermiques et/ou dermiques. De nombreuses cibles thérapeutiques sont testées faisant de ces modèles des plateformes efficaces d'étude de processus cellulaires impliqués dans la réparation cellulaire.

Pour conclure, les défis actuels concernant les peaux reconstruites comprennent la formation d'une barrière intègre du *stratum corneum*, proche de celle de l'homme, et la commercialisation de modèles intégrant des composants structurels plus complexes et importants pour la peau, comme les follicules pileux, le système vasculaire et les cellules immunitaires. L'orientation future de ces modèles repose sur le développement de puces multi-organes dans le but ultime de construire un système humain-sur-puce [51] [52] [73]. Ce dispositif de culture cellulaire intègre des techniques de microfluidique permettant d'obtenir un modèle dynamique contrairement aux modèles 2D et 3D présentés précédemment. Ces modèles encore très peu développés dans les laboratoires pourront remplacer l'expérimentation animale lors de tests précliniques et accélérer l'entrée de candidats « médicaments » en phase clinique.

Chapitre III. Les traitements actuels et en cours de développement

I. Les traitements conventionnels actuels et les nouvelles stratégies

a. Les approches conventionnelles

1. Les procédures standards de traitements des plaies

La norme actuelle de soins pour les brûlures de 3^{ème} degré et les plaies chroniques consiste à nettoyer la plaie pour limiter le risque d'infections, appliquer des pansements et effectuer une éventuelle étape chirurgicale de débridement du tissu nécrotique. Le « gold standard » pour le traitement de ces types de plaies cutanées profondes est l'autogreffe de peau ou des cellules d'épiderme cultivées (kératinocytes). Les peaux reconstruites totales constituent aussi un traitement pour les grands brûlés et les plaies chroniques. Des substituts cutanés biosynthétiques temporaires ou définitifs à base de composants de la peau humaine ou animale (biobrane[®], intégra[®], matriderm[®]) ou des allogreffes cutanées sont utilisés pour traiter les brûlures de 3^{ème} degré. Le coût élevé de ces traitements, les risques d'infections et de rejets constituent des limites à ces traitements.

2. Les pansements

Les approches conventionnelles de soins des plaies sont basées sur des pansements qui absorbent un exsudat excessif et fournissent un environnement humide à la plaie, afin d'optimiser la cicatrisation et d'assurer la protection contre les infections. À cette fin, les hydrocolloïdes, les hydrocellulaires et les hydrogels sont largement utilisés. Des pansements contenant des ions argent, pour prévenir les infections bactériennes ou fongiques, sont disponibles (acticoatTM). De plus, des polymères naturels biodégradables sont déjà utilisés comme composants de pansement tels que l'acide hyaluronique (ialuset[®]) pour favoriser la cicatrisation des plaies et maintenir l'homéostasie cutanée, et le chitosane utilisé pour arrêter le saignement, en raison de ses propriétés intrinsèques hémostatiques et antimicrobiennes. En effet, de nombreux pansements ou poudres à base de chitosane sont utilisés sur les théâtres d'opérations où la première cause de mortalité est l'hémorragie (hemCon[®], XStat[®]). Pour

favoriser la cicatrisation des plaies chroniques des pansements, dont le rôle est d'inhiber les protéases sécrétées dans le microenvironnement de la plaie, afin de protéger les facteurs de croissance libérés lors du processus de cicatrisation, sont utilisés (cellostart®). Actuellement, un traitement pour les plaies chroniques, à base de facteurs de croissance (rhPDGF-BB) (REGRANEX®) est commercialisé aux Etats-Unis. D'après l'agence européenne des médicaments (*european medicines agency*, EMA), il a été retiré du marché en Europe en 2011 pour des raisons de risque de formation de cancers.

b. Les potentielles nouvelles approches

1. Délivrance de facteurs de croissance et autres molécules

Les facteurs de croissance permettent d'influer sur les différentes étapes du processus de cicatrisation. De nombreuses études ont montré l'effet bénéfique de certains facteurs de croissance sur le temps de cicatrisation des plaies chroniques. Ces facteurs de croissance sont fragiles *in vivo* et ont une demi-vie réduite. De part leur action stimulatrice sur la croissance cellulaire, ils ont des effets cancérogènes potentiels. Une libération progressive de facteurs de croissance permettrait idéalement d'accélérer la vitesse de fermeture des plaies chroniques. Dans les plaies chroniques, des médiateurs de l'inflammation peuvent être identifiés et ciblés pour améliorer la cicatrisation des plaies. L'inhibition de ces molécules pro-inflammatoires est considérée comme un moyen efficace pour favoriser la cicatrisation des plaies. Les ARN interférents (siARN) peuvent être utilisés comme principes actifs pour les plaies chroniques, par l'administration d'un gène spécifique de séquence. Par exemple, les gènes pro-inflammatoires tels que le gène *SMAD3* (*mothers against decapentaplegic homolog 3*) et le gène de suppression de tumeurs (*p53*) peuvent, par cette technique, être inhibés dans le microenvironnement de la plaie [74]. Une autre approche consiste à utiliser des microARN comme molécule thérapeutique. Ces micro-ARN régulent, au niveau post-transcriptionnel, l'expression de ces gènes en se liant à leurs ARN messagers (ARNm), conduisant ainsi à la dégradation de l'ARNm et à la suppression de la traduction [74].

Dans un autre domaine, l'attention se porte aussi sur l'utilisation de molécules naturelles aux propriétés antibactériennes et antioxydantes permettant de diminuer l'inflammation (voir partie Résultats).

2. Les cellules souches

Les cellules souches des adipocytes suscitent un grand intérêt en raison de leur potentiel de sécrétion de facteurs angiogéniques stimulant l'angiogenèse, requise pour la cicatrisation des plaies. Des cellules souches mésenchymateuses issues du cordon ombilical ont montré leur capacité à promouvoir la cicatrisation [74].

c. La recherche de cibles thérapeutiques

Comme exposé précédemment, la réaction inflammatoire (RI) induite par une blessure cutanée profonde se traduit, entre autre, par une sécrétion importante de dérivés actifs de l'oxygène (ROS), notamment d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) par les macrophages, les neutrophiles et les fibroblastes [75], dont un des effets est d'entraver le développement d'éventuelles contaminations microbiennes [33]. L'emballement de la production de ROS peut cependant avoir des effets délétères sur les tissus sains environnants (induction de mort cellulaire) et enrayer le processus de cicatrisation. La maîtrise de la production de ROS est donc un paramètre intéressant du contrôle du processus de cicatrisation des plaies profondes. La troisième phase du processus de cicatrisation se caractérise, entre autre, par la prolifération et la migration de cellules telles que les fibroblastes, qui participent à la formation du nouveau tissu. La stimulation de cette prolifération/migration est un autre outil intéressant de contrôle du processus de réparation tissulaire.

II. Les cibles potentielles des traitements thérapeutiques

a. Les ROS

Les ROS produits lors de la RI résultent de la conversion de l'oxygène en anions radicalaires superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase des cellules phagocytaires [76]. Sous l'effet de superoxyde dismutases (SOD), l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est converti en radical hydroxyle (HO^{\cdot}) par la réaction de Fenton (**Figure 17**). Dans des conditions physiologiques normales, la production de ROS est extrêmement régulée par un équilibre de la balance pro-oxydant/antioxydant. Une détoxification insuffisante ou une surproduction de ROS engendre un déséquilibre de cette balance qui entraîne la production d'une inflammation massive responsable du stress oxydatif.

À de faibles niveaux, l' H_2O_2 et d'autres ROS inhibent la migration et la prolifération de divers types de cellules, y compris les kératinocytes [77]. Au contraire à des niveaux élevés, les ROS peuvent entraîner des transformations néoplasiques [78], des dommages oxydatifs à l'ADN, aux protéines et une peroxydation lipidique [79] [80]. Un déséquilibre d'enzymes détoxifiantes engendre une inflammation chronique impliquée dans des pathologies comme le diabète.

Pour se protéger du stress oxydatif, les cellules proliférantes et migratrices dans la plaie ont développé des systèmes de défense pour détoxifier les ROS [33] [80]. Deux principales stratégies à base d'antioxydants sont déployées, de nature non enzymatique et enzymatique. La première comprend de petites molécules antioxydantes comme la vitamine E (α -tocophérol), la vitamine C, le b-carotène, le glutathion (GSH), la coenzyme Q et la bilirubine, qui fonctionnent pour diminuer la production de ROS. La seconde repose sur des enzymes comme la SOD, la catalase et des peroxydases comme les séléno-enzymes GSH peroxydase (SeGPx) et la peroxyredoxine VI (Prx VI) [81] [82] [83] (**Figure 17**).

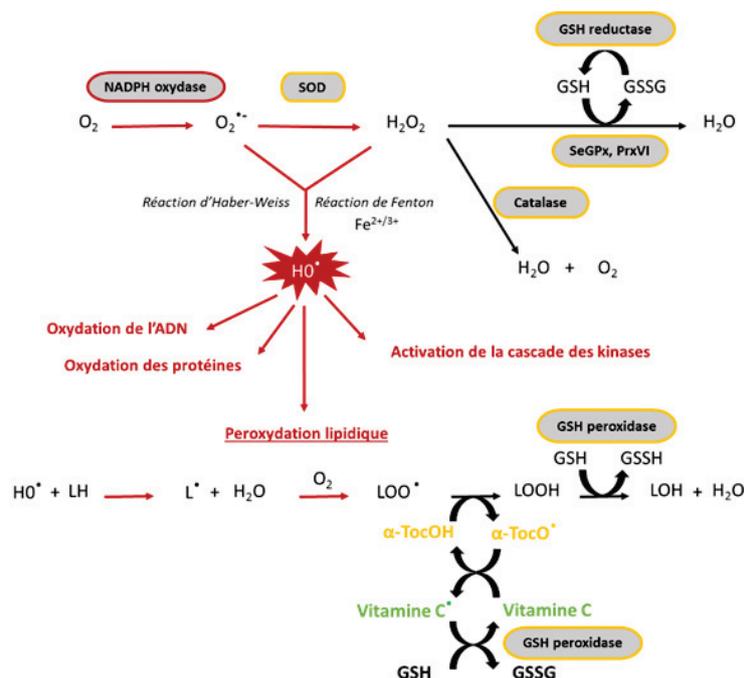


Figure 17 : Mécanismes de production et de détoxification de ROS (adaptée de U auf dem Keller et al. 2006 et E Nachbar et al. 1995) [33] [79]. LH : lipide à double liaison, L : radical lipidique, LOO : radical peroxyde lipidique, LOOH : hydroperoxyde lipidique, α -TocOH : α -tocophérol (Vitamine E active), α -TocO : α -Tocophéryl (Vitamine E radicalaire), Vitamine C : Vitamine C radicalaire, GSH : Glutathion réduit, GSSG : Glutathion oxydé.

Une molécule naturelle comme la vitamine E, est donc un outil efficace susceptible d'enrayer la surproduction de ROS lors de la RI.

b. Les cellules proliférantes

Le bon déroulement du processus de cicatrisation dépend de facteurs de croissance, de cytokines et de chimiokines qui régulent les processus cellulaires. Ces facteurs de croissance sont importants car ils jouent un rôle dans la formation de tissu de granulation, la modulation de la réponse inflammatoire, de la prolifération et de l'angiogenèse. De plus, ils sont nécessaires au processus de réépithélialisation, à la formation de la MEC et à son remodelage. Ce sont des polypeptides biologiquement actifs qui agissent en modifiant la croissance, la différenciation et le métabolisme d'une cellule cible. Ils peuvent agir par des mécanismes de signalisation cellulaire paracrines, autocrines, juxtacrines ou endocrines, et influencer le comportement des cellules en raison de leur liaison à des récepteurs spécifiques de surface ou à des protéines de la MEC [84]. La liaison à ces récepteurs déclenche une cascade d'événements moléculaires dont l'étape finale est la liaison des facteurs de transcription aux promoteurs de gènes qui régulent la traduction des protéines contrôlant le cycle cellulaire, la motilité et la différenciation cellulaire. Ainsi, les facteurs de croissance apparaissent comme de potentiels outils de promotion de la cicatrisation. Cependant, leur administration à des patients présente certaines limites en raison de leur faible stabilité *in vivo*. De nombreuses protéases sont activées dans le lit de la plaie et peuvent dégrader les facteurs de croissance produits physiologiquement comme ceux administrés. Cette stratégie est très utile dans le traitement de plaies chroniques où le niveau de facteurs de croissance est diminué. Certains sont déjà commercialisés en Amérique du Sud et Nord et en Asie, tels l'EGF (HEBERPROT-P, REGEN-D™ 150, EASYEF®), le PDGF (REGRANEX® (Becaplermin)) et le FGF2 (FIBLAST®) [85]. Ces traitements doivent être administrés toute les 12 heures ou 24 heures et requièrent de fortes doses pour obtenir les effets escomptés. Même si ces traitements semblent être bien tolérés (à l'exception du REGRANEX® qui semble être impliqué dans la formation de cancers), des effets indésirables peuvent survenir si l'on atteint des niveaux systémiques élevés, ce qui limite leur application clinique.

La famille des FGF compte 23 membres dont les plus impliqués dans la cicatrisation cutanée sont le FGF2, FGF7 et le FGF10 [86]. Ces FGF sont produits entre autre par des kératinocytes, des fibroblastes, des cellules endothéliales et des mastocytes. Le FGF2 est augmenté dans les

plaies aiguës et joue un rôle dans la réépithélialisation, la formation du tissu de granulation et le remodelage tissulaire [87]. Des études *in vitro* ont démontré que le FGF2 régule la synthèse et le dépôt des composants de la MEC, augmente la mobilité des kératinocytes durant la réépithélialisation [88], promeut la migration des fibroblastes et les stimulent à produire des collagénases [89]. Les FGF2 avec les protéoglycanes à héparane sulfate (*heparan sulfate proteoglycans*, HSPG) agissent comme des agonistes aux récepteurs à FGF (FGFR). Le FGF2 peut interagir avec quatre FGFRs (FGFR1 à FGFR4) [87]. La liaison du FGF2/HSPG aux FGFR induit la dimérisation des monomères des récepteurs, suivie de l'autophosphorylation des résidus de tyrosine situés dans le domaine kinase cytoplasmique. Cette étape de phosphorylation permet l'activation des voies de signalisation intracellulaire (protéines kinases C (*protein kinases C*, PKC), MAP kinases (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK), c-Jun N-terminal kinases (*c-Jun N-terminal kinases*, JNK), Janus kinases-STAT (*Janus kinases/signal transducers and activators of transcription*, JAK-STAT), phosphoinositide 3-kinases (*phosphoinositide 3-kinases*, PI3K) aboutissant à des processus tels que la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire, l'anti-apoptose et l'angiogénèse (**Figure 18**) [90] [91].

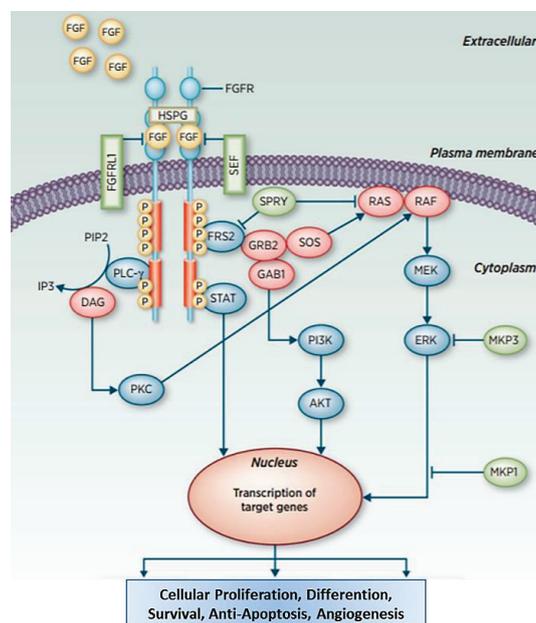


Figure 18 : Voie de signalisation du récepteur FGFR (adaptée de Touat et al., 2015) [91]. Le FGF se lie aux monomères de FGFR, conduisant à la dimérisation puis à l'autophosphorylation du résidu tyrosyl des récepteurs. Ceci engendre l'activation du FGFR et de diverses protéines en aval, entraînant une prolifération, une différenciation, une survie cellulaire, une anti-apoptose et une angiogénèse.

Une molécule comme le FGF2 est donc un outil efficace susceptible d'accélérer la reconstruction tissulaire en stimulant la réépithélialisation, la formation du tissu de granulation, l'angiogenèse et le remodelage tissulaire.

III. Les nanoparticules comme outils innovants de vectorisation de principes actifs pour la cicatrisation cutanée

Un état de l'art des différents types de NP, utilisées pour la cicatrisation des plaies et leur association avec des matrices pour former un biopanement, a été publié dans une revue jointe à la fin de cette section : « Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment? **Berthet M**, Gauthier Y, Lacroix C, Verrier B, Monge C. Trends in biotechnology. 2017;35(8):770-84. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.05.005. PubMed PMID: 28645529 ». Les références des travaux mentionnés dans cette section sont associées à la revue.

Pour créer un vocabulaire unitaire l'organisation internationale de normalisation (*international organization for standardization*, ISO) a établi la norme ISO/TS 80004-2:2015 qui définit les nano-objets comme ayant des dimensions à l'échelle nanométrique s'étendant approximativement de 1 nm à 100 nm. Ces normalisations terminologiques sont destinées à faciliter la communication entre différents organismes et membres de l'industrie et leurs interlocuteurs. Ainsi, les trois formes les plus élémentaires de nano-objets sont les nanoparticules, les nanofibres et les nanoplaques. Ces nano-objets ont respectivement 3, 2 et 1 dimension(s) externe(s) à l'échelle nanométrique. Une autre définition a été publiée par la Commission Européenne le 18 octobre 2011 dans le cadre d'une recommandation, celle-ci est en cours de révision. « On entend par « nanomatériau » un matériau naturel ou formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules (ce seuil peut être abaissé à 1% dans des cas spécifiques), dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm ». D'autres définitions ont été publiées et toutes mentionnent comme élément commun la taille comprise entre 1 et 100 nm.

Néanmoins, dans la communauté scientifique, le terme nanomatériau n'est souvent pas utilisé à son juste terme, mais par abus de langage. Par exemple, les NP évoquées dans ce projet de recherche ont un diamètre supérieur à 100 nm, elles sont qualifiées de particules

submicroniques avec un diamètre compris entre 100 nm et 1 μm . Pour nous conformer à l'usage de la littérature sur le sujet, nous continuerons d'utiliser le terme de NP dans ce manuscrit.

a. Les différents types de NP utilisées pour le traitement des plaies

Comme mentionné dans la partie exposant les traitements actuels, le principal inconvénient de toutes les thérapies conventionnelles est leur effet limité, car elles ne permettent que d'initier la cicatrisation sans en stimuler les phases qui la définissent. Par conséquent, les nouveaux concepts de pansements devraient être élaborés à partir de matériaux biodégradables et biocompatibles ciblant des événements spécifiques du processus de cicatrisation, afin d'accélérer la fermeture de la plaie et de restaurer la fonctionnalité du tissu cicatrisé. Des outils issus de la nanomédecine, en particulier les NP, ouvrent la voie à de nouvelles stratégies pour améliorer les thérapies de régénération tissulaire. La composition chimique des NP peut induire par elle-même des effets biologiques. Ceux-ci peuvent être combinés à l'activité d'un principe actif fixé aux NP pour améliorer l'efficacité du traitement. En effet, une supériorité des NP par rapport aux pansements actuels résulte de leur capacité à transporter, à protéger et à permettre une libération progressive de molécules actives. Les effets secondaires sont diminués en raison d'une plus petite quantité de principe actif vectorisé et libéré par les NP dans le lit de la plaie. Enfin, l'incorporation des NP dans une matrice permet des actions synergiques entre les NP et leur support et constitue un nouveau concept de pansements favorisant la cicatrisation par régénération.

Les NP sont classées en deux catégories de par leur nature physico-chimique : les NP non polymériques et les NP polymériques.

Les NP non polymériques regroupent les NP métalliques, céramiques et lipidiques. Les NP d'argent et d'or nues sont utilisées comme agent thérapeutique, principalement pour leurs propriétés intrinsèques antibactériennes et anti-inflammatoires. Actuellement, seules les NP d'argent sont commercialisées parmi l'ensemble des NP existantes (polymériques et non polymériques) pour leur activité antibactérienne, leur biocompatibilité, leur faible coût et leur faible toxicité systémique. Elles sont intégrées dans des pansements, gels ou crèmes pour le traitement de plaie chronique ou de brûlure infectée. Ce système de délivrance améliore l'efficacité antibactérienne en agissant directement sur le site de l'infection et contribue à limiter la résistance bactérienne au traitement en limitant les quantités d'antibactériens. En plus

des effets anti-inflammatoires, les NP d'argent ont montré leur capacité à accélérer le processus de cicatrisation en agissant principalement sur la réépithélialisation. Les NP d'or sont également utilisées pour délivrer des principes actifs aux propriétés antioxydantes (acide lipoïque ou gallate d'épigallocatechine) accélérant la cicatrisation en régulant l'inflammation et l'angiogénèse. Elles peuvent être aussi utilisées pour vectoriser des acides nucléiques tels que de l'ARN interférent (siARN) dont le rôle est de sous-exprimer spécifiquement des gènes qui sont sur-exprimés dans les plaies chroniques. Les NP de palladium, platine et d'oxyde de cérium ont montré des effets similaires aux NP d'or. Les NP en céramiques, à base de calcium et d'hydroxyapatite, ont également des propriétés curatives intrinsèques en agissant sur l'inflammation, la réépithélialisation et le remodelage tissulaire. Ces NP peuvent vectoriser des principes actifs aux propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-infectieuses (curcumine). Parmi les NP lipidiques on trouve les liposomes et les vecteurs lipidiques nanostructurés. Elles n'ont pas d'effets thérapeutiques intrinsèques évidents, et sont largement utilisées pour leur capacité à transporter des principes actifs comme la curcumine et la quercétine, des facteurs de croissances (EGF) et des acides nucléiques.

Les NP polymériques, sont à base de polymères naturels ou synthétiques. Des études réalisées avec des NP polymériques naturelles ou synthétiques, seules ou en association avec des matrices en développement, sont listées dans le tableau 1 de la revue [30]. Les polymères naturels sont issus de sources naturelles telles que le collagène, la gélatine ou divers polysaccharides, qui se trouvent dans la MEC des plantes (cellulose) ou des animaux (chitosane, acide hyaluronique). Le chitosane est un polymère approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour ses propriétés de biodégradabilité, biocompatibilité, biorésorbabilité. Les polymères synthétiques comprennent le poly (acide lactique) (*poly(lactic acid)*, PLA), le poly (acide glycolique) (*poly(glycolic acid)*, PGA), le poly (acide lactique-co-glycolique) (*poly(lactic-co-glycolic acid)*, PLGA) - un copolymère de PLA et de PGA, le polycaprolactone (*polycaprolactone*, PCL) et le polyéthylène glycol (*polyethylene glycol*, PEG). Ces polymères ont déjà été approuvés par la FDA et l'EMA pour des dispositifs chirurgicaux, tels que les fils de suture et les implants. Ces polymères synthétiques ont des propriétés intrinsèques, le PLGA et le PLA stimulent naturellement l'angiogénèse et le chitosane présente une activité antimicrobienne. Néanmoins, ils sont principalement utilisés pour transporter des principes actifs. Par exemple, les NP de PLGA vectorisent des antibiotiques (gentamicine), des antiseptiques (chlorhexidine), des anti-inflammatoires et

antioxydants (curcumine), des facteurs de croissances (VEGF, PDGF, EGF, FGF) ou des acides nucléiques comme ADN plasmidique ciblant différentes phases de cicatrisation.

Les NP ont la capacité de transporter, de protéger et de maintenir la libération de principes actifs qui sont fragiles et/ou sensibles aux conditions *in vivo*. L'administration topique des NP permet un ciblage efficace, une amélioration de l'efficacité des principes actifs et une réduction de la dose de médicament, diminuant ainsi les effets secondaires tels que la résistance bactérienne aux antibiotiques et la toxicité systémique. Ainsi, des matrices à bases de NP apparaissent comme un outil novateur pour surmonter les limites des traitements actuels. Ces matrices sont à bases de nanofibres, d'hydrogels, de membranes et de films ou d'association de matrices multiples. Leur association avec des NP est décrite dans la revue [30].

b. De la synthèse à l'utilisation clinique des NP

Leur utilisation clinique nécessite une production à échelle industrielle. Plusieurs paramètres doivent être maîtrisés, tels que la taille des NP, l'efficacité de chargement du principe actif, la stérilité, la non-toxicité et la stabilité au stockage. Des contrôles supplémentaires sont obligatoires pour l'obtention de licences en tant que systèmes de délivrance de principes actifs.

1. Méthodes de synthèse à échelle industrielle

De nombreux efforts sont déployés pour synthétiser des NP à partir de la chimie verte et des méthodes de production respectueuses de l'environnement. C'est le cas des NP métalliques comme les NP d'argent, les NP d'or, les NP d'oxyde de cérium et les NP palladium et de platine. Ces processus évitent l'utilisation de produits chimiques toxiques et de solvants puisque la synthèse de ces NP est réalisée par des microorganismes, tels que les champignons, les bactéries, les plantes ou en utilisant des glycosaminoglycanes comme agents réducteurs.

Pour répondre au besoin de biocompatibilité, la stérilisation des NP est une étape obligatoire. La stérilisation par irradiation γ est généralement possible. La stérilisation des NP céramiques telles que les NP d'hydroxyapatite peut être réalisée par autoclavage selon une procédure validée pour les applications biomédicales. La production à grande échelle de ces NP repose sur un protocole modifié de co-précipitation utilisant une matrice d'amidon gélatinisée sans toxines et sans tensioactifs. La synthèse des NP lipidiques et polymériques est basée sur diverses méthodes d'émulsion-diffusion de solvant avec des faibles quantités d'agents

tensioactifs, tels que le poly (alcool vinylique) (*polyvinyl alcohol*, PVA) pour stabiliser les NP. Les solvants ou les composants toxiques sont éliminés par évaporation, filtration ou lavages. La synthèse à grande échelle des NP polymériques, telles que les NP de PLGA, a été réalisée par modification des protocoles d'émulsion-diffusion des solvants. Les synthèses de NP lipidiques à grande échelle sont basées sur des méthodes reposant sur l'injection d'éthanol, d'homogénéisation à haute pression ou de dialyse. Bien que la stérilisation par irradiation γ puisse être utilisée pour les deux types de NP, la stérilisation par filtration à travers un filtre à membrane de 0,2 mm est mieux adaptée aux NP polymériques.

2. La réglementation régissant l'utilisation des NP

De nombreuses formulations de NP induisent des effets bénéfiques significatifs sur la cicatrisation dans différents modèles expérimentaux. Néanmoins, aucun essai clinique contrôlé par la FDA ou d'autres instances internationales n'a été lancé à ce jour. Le développement de protocoles standardisés pour caractériser les NP est nécessaire pour valider leur efficacité et s'assurer de leur non-toxicité. En effet, selon la FDA et le *National Institutes of Health* (NIH), pour accélérer la transition des laboratoires de recherche vers des applications cliniques, des efforts considérables doivent être investis dans le développement de normes de caractérisation, pour obtenir une meilleure information sur la toxicité médicale et environnementale des nanomatériaux. Cependant, certaines NP ont déjà été approuvées par la FDA et sont utilisées depuis de nombreuses années pour des applications médicales telles que la vaccination (antigènes de la grippe ou de l'hépatite A) et les traitements du cancer (cancer de la prostate utilisation de leuprolide). Ces observations sont prometteuses quant à l'utilisation des NP pour le traitement des plaies dans le futur.

3. Problèmes de toxicité

Bien que les processus d'élaboration des NP par chimie verte et la stérilisation permettent la synthèse de NP cliniquement sûres, des propriétés extrinsèques peuvent entraîner une toxicité. Par exemple, la distribution et l'accumulation des NP non biodégradables dans des zones non souhaitables (comme le cerveau) peuvent être potentiellement toxiques pour l'hôte. Pour éviter ces risques, des études de suivi *in vivo* et de biodistribution des NP non biodégradables sont essentielles avant leur utilisation en clinique. Ces études ne sont pas systématiquement requises pour les NP biodégradables ayant un profil de dégradation rapide et sûr. Les pansements à base

de NP d'argent chez l'homme sont sujets à controverse en raison de la toxicité des ions argent, qui stimulent la production de ROS. Les NP d'or de taille inférieure à 5 nm ont montré qu'elles favorisent la production de ROS et provoquent des dommages à l'ADN. Cependant, cette toxicité peut être contrôlée en maîtrisant certains paramètres comme la taille des NP ou la concentration en ions argent.

Pour conclure, les composites nanoparticulaires constituent l'avenir des systèmes de délivrance de principes actifs pour la cicatrisation des plaies. Les challenges actuels sont l'introduction de NP multifonctionnelles dans des matrices, pour constituer un pansement biologique innovant qui libère progressivement les principes actifs dans le lit de la plaie. Les processus de synthèse utilisant la chimie verte sont des prérequis pour la création de ces biopansesments à base de polymère biodégradable, biocompatible et biorésorbable. Le polymère biodégradable PLGA est l'un des plus adaptés pour la production de NP à des fins cliniques, car il protège les principes de la dégradation biologique, améliore la stabilité et maintient une libération prolongée permettant une réduction des doses de principes actifs utilisés. De nouvelles stratégies fondées sur l'expression ou non de certains gènes impliqués dans la cicatrisation sont étudiées, où les acides nucléiques constituent une nouvelle classe de principes actifs et les NP leurs systèmes de délivrance.

Revue “ Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment? ”

Trends in Biotechnology

CellPress

Review

Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment?

Morgane Berthet,^{1,*†} Yves Gauthier,² Céline Lacroix,¹
Bernard Verrier,^{1,†} and Claire Monge^{1,†}

Reconstructing functional skin after a wound remains a challenge due to the complexity of healing. In this regard, biocompatible nanoparticles (NPs) carrying and releasing bioactive drugs in a controlled and sustained manner may significantly improve the efficacy of wound therapies compared with current treatments. Topical administration of drug-loaded NPs allows optimal delivery to the dermis and improves product efficacy. Furthermore, associating NPs with scaffolds represents a new concept of ‘dressing’. Experimental *in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro* models have been developed in preclinical assays to evaluate the beneficial effects of nanoparticulate dressings. Drug-loaded NPs are promising tools for innovative wound healing treatment, especially with regard to their multifunctional properties.

From Skin Wound Healing to Functional Dermis Reconstruction

The repair of cutaneous wounds is a complex biological process involving orchestrated cell-signaling events and biochemical cascades. After damage, human skin has a natural ability to promote spontaneous repair following a four-stage process resulting in the formation non-functional fibrotic tissue (Box 1) [1]. Fast wound closure is the first aim of the care of acute or chronic wounds, where impaired and generally long-lasting healing prevails because of infections. Conventional approaches are based on dressings such as hydrocolloids and hydrogels (see Glossary) that absorb excessive exudate and provide a moist environment to the wound to optimize repair and protect against infections [2,3]. Moreover, some dressings are based on silver ions to prevent infections [4] or comprise biodegradable polymers, such as hyaluronic acid to promote healing and chitosan to stop bleeding [5]. The gold standard for the management of chronic wounds and third-degree burns is the autograft of skin or cultured epithelial cells. Allografts or cutaneous substitutes based on bioengineered animal or human skin components can also be used [5]. Although these therapies have clinical acceptance and their therapeutic efficacy is proven, their cost remains high and adverse reactions may appear (rejection, infections, allergies, etc.). Generally, the main drawback is a limited capacity to start the healing process without stimulating further reconstruction stages.

Consequently, innovative dressings should be based on biodegradable and biocompatible materials targeting specific events in the healing process to accelerate wound closure and restore the functionality of the healed tissue. Nanomedicine tools, particularly NPs, lead the way to new strategies to improve tissue regeneration therapies. The chemical nature of NPs may induce biological effects that can be combined with a loaded drug activity to enhance treatment efficacy. A superiority of NPs over current dressings results from their ability to carry, protect, and sustain active drug release. Side effects are decreased due to the greater efficacy

Trends

Nanoparticles (NPs) loaded with drugs such as growth factors or nucleic acids are promising tools for skin regeneration and represent a strategy for wound repair.

Their incorporation into an ‘intelligent’ matrix to design a nanocomposite (NCP) gives rise to innovative dressings.

Significant efforts are made to develop ‘green processes’ aimed at producing biocompatible composites. A successful outcome of these NCPs would result in a sequential release of loaded drugs following the healing process stages.

Recent advances in alternative models to animal experimentation focus on *in vitro* human reconstructed skin cultured in static conditions. *In vitro* organ-on-a-chip techniques will allow the integration of microfluidic networks with 3D tissue-engineered models. This research field opens new windows for preclinical NP screening.

¹Laboratoire de Biologie Tissulaire et d’Ingénierie Thérapeutique (LBTI), UMR 5305, Université Lyon 1, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), Lyon, France
²Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Département des Maladies Infectieuses, Brétigny-sur-Orge, France
[†]Co-last authors

*Correspondence:
morgane.berthet@ibcp.fr (M. Berthet).



of lowered drug doses directly released into the wound by NPs. Furthermore, the association of NPs with a matrix allows synergistic actions between NPs and their cargo and constitutes a new concept of 'dressing' promoting regenerative healing.

Non-Polymeric NPs

NPs comprise either polymeric or non-polymeric materials; some non-polymeric materials already have clinical uses.

Current Clinical Uses

Silver NPs [nanosilver (NS)] are widely studied due to the antimicrobial activity of silver. Clinical uses range from topical treatment of infected burns and open wounds to chronic ulcers, often associated with antibiotic-resistant hospital-acquired bacterial infections. NS particles are the only NPs used in current marketed dressings, gels, or ointments due to their antibacterial activity, biocompatibility, low systemic toxicity, and inexpensiveness [6]. NS particles have shown their efficacy in bypassing drug-resistance mechanisms [7]. NP-based drug-delivery systems improve antibacterial efficacy by acting directly at the site of infection, and may contribute to combating bacterial resistance by allowing the use of lowered doses of antimicrobials [7]. In addition to anti-inflammatory effects, NS has been shown to control collagen deposition leading to a proper alignment of collagen fibrils that accelerates wound healing [4]. Randomized clinical trials using NS-based dressings compared with standard dressings in the treatment of superficial and deep burns suggested accelerated re-epithelialization without effects on other wound healing phases [4].

Current Developments

Gold NPs have intrinsic antibacterial and antioxidant properties that promote the healing process through hemostasis and inflammatory phases. A preclinical study in mice excisional wounds using gold NPs combined with antioxidant drugs such as epigallocatechin gallate and lipoic acid showed accelerated wound healing correlating with modulation of inflammation and angiogenesis [8]. When an antioxidant **phytochemical decoration** is coated on gold NPs, cutaneous wound healing of burns and surgical wounds in rats is accelerated due to reduced oxidative stress [9]. Similar observations were made in mice with cerium oxide, palladium, and platinum NPs in excisional wounds [10,11]. With the aim of achieving fast and strong closure of deep wounds, an experimental study in rats showed the potential of a metal oxide NP aqueous solution to seal the two edges of a wound, even under bleeding [12].

Box 1. The Four Stages of Skin Wound Repair

Wound healing is a natural restorative response to skin injury. The cutaneous repair process is characterized by four overlapping stages: (i) hemostasis; (ii) inflammation; (iii) proliferation; and (iv) remodeling (Figure 1).

Immediately after skin injury, a vascular constriction and a coagulation cascade stop bleeding and create a barrier against invading microorganisms (i). Disrupted blood vessels lead to platelet aggregation, and their degranulation will activate the formation of a blood clot with the formation of a crosslinked fibrin network with entrapped ECM proteins such as fibronectin, vitronectin, and thrombospondin [77]. The blood clots also form a reservoir of GFs and cytokines and a scaffold for infiltrating cells involved in the wound healing process [1].

The inflammation reaction (ii) occurs simultaneously with the hemostasis phase and can last until 48 h after injury. This stage is characterized by the infiltration and migration of leukocytes involved in the phagocytosis of cell debris and microbes. Neutrophils appear first in the wound, followed by lymphocytes and monocytes which differentiate into macrophages. ROS and proteinases are produced by these inflammatory cells and protect the wound against exogenous bacterial infections. However, in chronic wounds like diabetic ulcers, a high level of ROS can lead to impaired healing due to prolonged inflammation resulting from insufficient production of ROS-detoxifying enzymes and antioxidants [78]. These cells also secrete cytokines and GFs, which initiate the proliferative phase (iii). This step is characterized by the proliferation and migration of fibroblasts, keratinocytes, and endothelial cells, the latter being involved in angiogenesis [79].

Glossary

Allograft: transplantation of cells, tissues, or organs between genetically non-identical individuals of the same species.

Autograft: transplantation of cells, tissues, or organs from one part of the body to another in the same individual.

Biocompatible: not toxic to the host and induces no rejection or disproportionate inflammatory reactions. Biocompatibility depends on intrinsic properties such as the physicochemical composition of the material (size, porosity, shape, or roughness) but also on external factors such as administration site and host species. All of these factors define the degree of biocompatibility of a biomaterial.

Biodegradable: able to be metabolized by an organism through biological reactions, including host enzymes and bacteria.

Bioresorbable: able to have material byproducts metabolized by an organism, followed by dissolution in biological fluids and elimination.

Chitosan: a polycationic polymer produced by deacetylation of chitin, a major component of arthropod shells.

Debridement: the process of removing necrotic or infected tissue from wounds (burns, pressure ulcers, etc.) to improve the healing potential of the remaining healthy tissue. The major debridement techniques are surgical, mechanical, chemical, autolytic, and larval therapy.

Elastomer: a polymer with weak intermolecular forces that is able to recover its original shape due to its viscoelastic properties.

Electrospinning: a process by which a charged polymer is projected on a grounded collector leading to the formation of nanofibers, which are mainly used as scaffolds for tissue engineering.

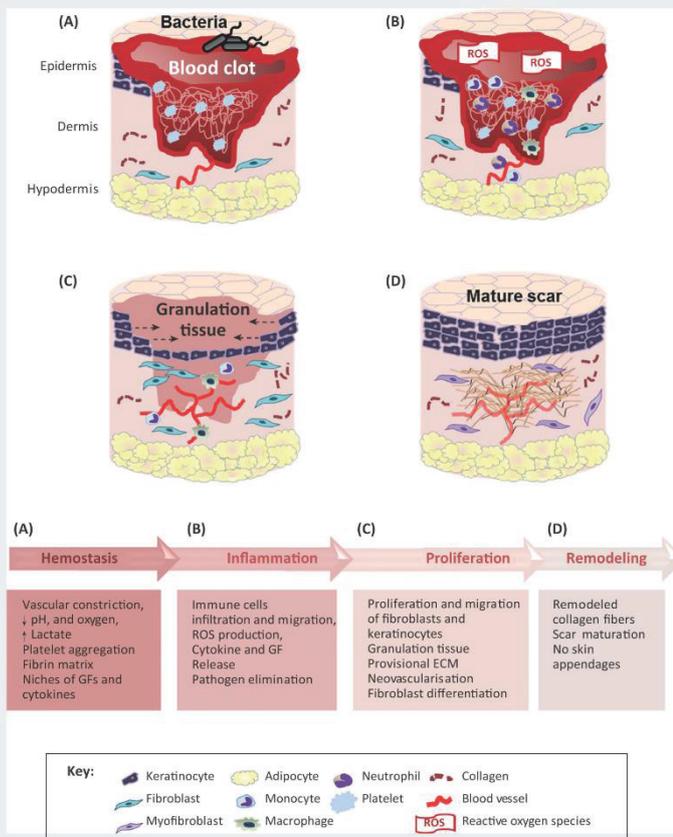
Film casting: a process used to shape polymers in the form of films. The liquid material is poured into a mold and takes a defined shape during solidification.

Glutathione peroxidase: a selenium-dependent antioxidant enzyme with peroxidase activity that protects cells from oxidative damage.

Hydrogel: a hydrophilic network of natural or synthetic polymers characterized by a high water content (over 90%).

Neoformed capillaries in conjunction with fibroblasts and macrophages help to transform the fibrin matrix into granulation tissue. This structure forms a temporary ECM in which fibroblasts produce glycoproteins such as collagens, proteoglycans, and glycosaminoglycans such as hyaluronic acid. At the end of this stage, fibroblasts in the wound bed are stimulated by macrophages and some differentiate into myofibroblasts responsible for wound contraction.

Finally, skin remodeling (iv) starts 2 or 3 weeks after injury and lasts for 1 year or more. The granulation tissue is gradually replaced with a mature scar. Collagen fibers are remodeled, most of the cells undergo apoptosis, and feedback loops allow the maintenance of living cell concentrations [80]. The mature scar remains non-functional, mainly comprising fibroblasts and disorganized collagen fibers without cutaneous appendages, and the reconstructed tissue will never regain the original properties of uninjured skin.



Nanoparticle (NP): according to the International Organization for Standardization, a particle of size ranging from 1 to 100 nm. Nevertheless, NP is now commonly used to refer to any submicron particle (<1 μm).

Nuclear factor kappa B (NF-κB): a transcription factor involved in a broad range of biological pathways, including inflammatory responses, innate/adaptive immunity, and cellular differentiation/proliferation. Although activation of NFκB is protective in many instances, misregulation and overproduction lead to fatal outcomes of severe inflammatory disease or cancer.

Organ on a chip: a dynamic, microscale tissue-culture device based on the use of microelectromechanical systems constituting a multichannel microfluidic 3D cell culture chip for the simulation of tissue or organ physiology in biomimetic systems.

Phytochemical decoration: ornamentation of NPs with chemical compounds produced by plants.

Shear stress: a stress that arises from forces parallel to the area resisting the force.

Figure 1. Biological Events Involved in Skin Wound Repair. The four stages of skin repair are depicted: (A) hemostasis, (B) inflammation, (C) proliferation, and (D) remodeling. Abbreviations: ECM, extracellular matrix; GF, growth factor.

Ceramic NPs containing inorganic materials such as silica and derivatives, calcium, and phosphate salts were also tested for skin wound healing. Calcium-based NPs regulate calcium homeostasis, which controls inflammatory process, fibroblast proliferation, and keratinocyte migration [13,14]. The acidic pH of the wound leads to NP degradation and the release of ionized calcium. The hydroxyapatite core from calcium-based NPs was shown to accelerate cutaneous wound healing through skin contraction in mice [13]. Nitric oxide-releasing NPs have been reported to be an effective antibacterial agent and to accelerate healing in healthy, diabetic, and immunocompromised rodents. Faster wound closure was the result of stimulation of proliferation and migration of fibroblasts, angiogenesis, and tissue remodeling by collagen deposition [15,16]. Antibacterial drugs such as curcumin loaded into these NPs to reinforce their therapeutic effects accelerated the healing process for infected burns in mice compared with conventional drugs or control groups [17].

Among lipid-based NPs, liposomes are the most widely used for wound therapy. In addition to being safe and biodegradable, they can entrap lipophilic and hydrophilic molecules. Liposomes sustain long-term release of drugs, reducing drug toxicity and side effects caused by massive drug release during conventional administration [18]. Some are approved by the US FDA and are marketed as drug-delivery systems for cancer and infection therapies [18]. Nevertheless, several issues impede their clinical use, such as instability, uncontrolled release, loss of reproducibility, and low encapsulation efficiency. One recent evolution of liposomes is nanostructured lipid carriers (NLCs), which are a mixture of solid lipids and oils. In a porcine excisional wound model, NLCs carrying recombinant human epidermal growth factor (rEGF) were shown to accelerate wound closure by stimulating the four stages of the wound healing process. NLCs induced a threefold decrease of the need for growth factors (GFs) compared with free GF administration, suggesting protection of the drug by encapsulation, with no systemic adsorption [19]. Protein and peptide encapsulation opens new prospects for controlling the healing process by biomimetic methods [20].

Polymeric NPs

Recent studies have highlighted the clinical interest of biodegradable, biocompatible, and **bioresorbable** polymeric materials. These avoid additional surgical intervention as the biomaterial degrades progressively *in situ* and is metabolized by the host. Studies conducted with natural or synthetic polymeric NPs, alone or in association with matrices under development, are listed in Table 1.

Natural Polymers under Development

Natural polymers are derived from natural sources, such as silk fibroin, collagen, gelatin, or various polysaccharides, that are found in the extracellular matrix (ECM) of plants (cellulose) or animals (chitosan, hyaluronan). However, proteins and polysaccharides are rarely used as isolated NPs but rather are embedded into scaffolds (see 'NPs from Synthesis to Clinical Use' below). Chitosan is an FDA-approved polymer of choice due to biocompatibility, biodegradability, and antimicrobial activity, among other favorable properties [21]. However, depending on the synthesis method, allergic reactions caused by residual proteins can appear. It is possible to encapsulate a wide range of natural components such as *Aloe vera* [22], vitamin E [22], curcumin, and melatonin [23], which have potential beneficial effects on skin wound healing. Various biologically active molecules such as corticosteroids [24] and antioxidants [25] have been loaded into chitosan NPs. Chitosan-based dressings include the HemCon[®] bandage, an FDA-approved hemostatic agent currently used in the battlefield context for the control of severely bleeding wounds [26].

Synthetic Polymers under Development

Synthetic polymers include poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) – a copolymer of PLA and PGA, polycaprolactone (PCL), and polyethylene

Table 1. Non-toxic Biodegradable and Biocompatible Polymers Studied for Skin Repair (NPs Are Presented Alone or Associated with a Polymeric Matrix)^a

NP	Matrix	Drug association	NP size (nm)/ PdI/Z pot (mV)/ EE (%)	Advantage of nanomaterial	Model	Biological/medical benefit	Refs
PLGA	None	LL37	305 nm/0.18/- 21 mV/70%	Sustained release of LL37 and intrinsic lactate, high loading efficiency	HaCat cell line and BJ fibroblast cells; NMRI mice	Improved re-epithelialization; improved granulation tissue formation and angiogenesis; upregulation of IL-6 and VEGFA at mRNA level	[29]
		VEGF	203 nm/0.07/- 30 mV/76%	Initial burst of VEGF released followed by sustained release	HaCat cell line and BJ fibroblast cells; NMRI mice and db/db mice	Well developed and organized epithelium; enhanced granulation tissue formation and synthesis of a compact and denser collagen matrix; promoted angiogenesis; upregulated VEGFR2 expression	[31]
		Curcumin	177 nm/0.105/- 23 mV/89%	Burst release followed by gradual and sustained drug release over a period of 8 days	XB-2 keratinocyte cell line; NMRI mice and db/db mice	Accelerated wound closure; downregulation of inflammatory responses; expedited re-epithelialization and improved granulation tissue formation; quenching of ROS	[30]
		NO release by polyethyleneimine/diazoniumdiodate	179 nm/+35 mV	Sustained release over 6 days without burst release	L929 mouse fibroblasts; BALB/c mice	Accelerated repair of bacteria-infected wounds; decreased mononuclear inflammatory cells with healed skin structures close to normal healthy epidermis	[15]
	Chitosan nanofibers	PDGF-BB in NPs and VEGF in nanofibers	150 nm	Biphasic release of two growth factors	Sprague-Dawley rats	Promoted fibroblast growth and angiogenesis; improved epithelial regeneration and collagen deposition; functional tissue remodeling	[53]
PLGA/heparin	Fibrin gel	Platelet-rich plasma	180-250 nm	Provided a prolonged release period, GFs maintained their bioactivity compared with fibrin gel-PRP <i>in vitro</i> ; may mimic ECM function <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	Human dermal fibroblasts; athymic mice; BALB/c-nu	Faster epithelial closure; enhanced regeneration of skin; upregulation of PECAM-1 gene expression implicated in neovascularization; functional recovery of the barrier	[59]
PLA NPs	None	Octenidine	230 nm/+12 mV	Enzymatic degradation of the PLLA; high tissue compatibility (do not induce a significant inflammatory response)	Primary human dermal microvascular endothelial cells; human dermal fibroblasts	Inhibition of the growth of bacteria	[73]

Table 1. (continued)

NP	Matrix	Drug association	NP size (nm)/ Pdl/Z pot (mV)/ EE (%)	Advantage of nanomaterial	Model	Biological/medical benefit	Refs
PLA-10R5-PLA	PLA-10R5-PLA hydrogel	EGF and curcumin	130 nm/0.1/EE of curcumin 92% and EE of EGF 85%	Injectable solution at room temperature; after application to the wound, it became a non-flowing gel; slow cumulative release compared with free drugs	Human embryonic kidney cell line HEK293 and 3T3; male Sprague-Dawley rats	Increased granulation tissue formation; collagen deposition and angiogenesis	[74]
Chitosan	None	Hydrocortisone	From 187 to 382 nm/from 45 to 14 mV/from 42% to 86%	Stability and high loading efficiency of chitosan NPs	Dermatomed N/C/Nga mouse skin	Accumulation of hydrocortisone in the epidermis and dermis; decrease of the symptoms of dermatosis; prohibition of collagen deposition at the skin lesion	[75]
Chitosan/ lectin	None	Melatonin	250 nm/0.35/ 25 mV/4%	Decreased chitosan cytotoxicity when incorporated in NPs	HaCat keratinocyte cell line	Improved keratinocyte migration	[76]
	Chitosan hydrogel with loaded β -lapachone	β -Lapachone/mnolaurin β -Lapachone/ diethyl/dimethylammonium bromide	437 nm/0.27/ 32 mV/26% 330 nm/0.24/ 90 mV/52%	Close contact between the NP and the skin due to mucoadhesive properties of the chitosan and produced an occlusive barrier	3T3 mouse fibroblasts; mouse peritoneal macrophages isolated from <i>Leishmania major</i> -infected BALB/c mice; pig ear skin	No parasite reduction but slowed lesion progression; β -lapachone exhibited anti-inflammatory activity leading to downregulation of IL-1 β and COX-2 expression and reduced neutrophil infiltration	[25]
Chitosan/poly- γ -glutamic acid	Chitosan membranes	Curcumin	From 193 to 799 nm/from 0.29 to 0.79/from 21 to 19 mV/from 53% to 41%	Composite material using both the bioactivity of natural polymers and the stability of synthetic ones	Normal human skin fibroblast cells; RAW 264.7 macrophage cells; Sprague-Dawley rats	Promoted neocollagen regeneration; tissue reconstruction; reduced inflammatory reaction; regeneration of neocollagen; faster wound closure	[21]
Chitosan/gelatin	Poly γ -glutamic acid/gelatin hydrogel + carbon fibers	NPs: epigallocatechin gallate; carbon fibers; gentamicin	230 nm/0.06/ 29 mV/46%	Multicomposite with several biological targets	Human skin fibroblasts; Sprague-Dawley rats	Controlled inflammation; prevention of bacterial infection; stimulation of neocollagen secretion, which facilitates re-epithelialization	[64]

^aAbbreviations: COX, cyclooxygenase; db/db, diabetic mice; EE, encapsulation efficiency; IL, interleukin; NMRI, Naval Medical Research Institute; NO, nitric oxide; Pdl, polydispersity index; PECAM, platelet endothelial cell adhesion molecule; PFP, platelet-rich plasma; Z pot, zeta potential.

glycol (PEG). These polymers have already been approved by the FDA and the European Medicines Agency (EMA) for surgical devices such as suture threads, screws, or implants [27]. PLGA is the most successfully biodegradable polymer due to its capacity to quickly release lactate, a degradation byproduct that accelerates reparative angiogenesis and wound healing [28]. Unlike PLGA, the PLA polymer, essentially comprising lactate, is degraded progressively and slowly. This is the reason why PLA is less used than PLGA for clinical purposes. When PLGA NPs carry antibiotics like peptide LL37, the sustained release of lactate and LL37 has been shown to accelerate wound closure in mice, with advanced granulation tissue formation and re-epithelialized and neovascularized healed tissue [29]. Curcumin loaded into PLGA NPs expedites re-epithelialization compared with the free drug and exhibits anti-inflammatory activity by downregulation of inflammatory responses due to reactive oxygen species (ROS) quenching, which reduces gene expression of **glutathione peroxidase** and **nuclear factor kappa B (NF- κ B)** [30]. Vascular endothelial growth factor (VEGF) loaded into PLGA NPs elicited faster wound closure in healthy and diabetic mice compared with control groups treated with either empty NPs or free VEGF. Moreover, restoration of an organized epithelium, enhanced granulation tissue formation, and angiogenesis were induced by upregulation of VEGF receptor 2 gene expression [31]. Epidermal growth factor (EGF)-loaded PLGA NPs stimulated cell proliferation and shortened the duration of wound healing in diabetic rats [32]. Despite moderate drug loading, PLGA NPs might be a promising delivery system for GFs [33].

The only FDA-approved GF-based treatment for chronic wounds to date (Regranex[®]) is marketed despite a decision to withdraw marketing authorization by the EMA [2]. This treatment, based on recombinant platelet-derived growth factor (PDGF)-BB, proved to be beneficial in chronic wound healing, but carcinogenic effects have been reported. The side effects could be minimized by the use of low concentrations of GFs in NPs.

NPs As Therapeutic Agents and/or Drug Carriers

Among non-polymeric NPs, bare silver and gold NPs are used as therapeutic agents, mainly for their antibacterial and anti-inflammatory effects. Gold NPs are also used to deliver drugs such as lipoic acid, with antioxidant and anti-inflammatory effects, or nucleic acids such as siRNA (Box 2), as tools for gene knockdown. Ceramic NPs also have intrinsic healing properties and can carry drugs with antioxidant, anti-inflammatory, and anti-infective properties, such as curcumin. Lipid-based NPs have no obvious therapeutic effects and are widely used for their capacity to carry drugs like curcumin and quercetin [34], GFs (EGF), and nucleic acids (Box 2). Some polymeric NPs naturally stimulate angiogenesis (PLGA) or exhibit antimicrobial activity

Box 2. NPs Carrying Nucleic Acids for Wound Healing Therapy

siRNA is a powerful tool to specifically abolish the expression of genes. However, these molecules are anionic and polar, and *in vivo* siRNA requires carriers to allow their penetration into the cell and their protection against nucleases. siRNA NP (lipid-based or gold NP) approaches have been used to specifically inhibit the *tumor necrosis factor alpha* gene, which is overproduced by infiltrating macrophages in chronic wounds [31], and ganglioside-monosialic acid 3 synthase, which impedes wound healing in diabetic animals [32]. This last study was based on the use of spherical nucleic acids conjugated to gold NPs, the latter being able to penetrate the skin and naturally enter cells. New approaches to nanoparticulate systems for siRNA delivery allow a sustained and tunable rate of siRNA release for more than 1 week from endolysosomes, achieved with pH-responsive NPs [33].

Gene therapy associated with cell therapy was explored by the transduction of epidermal stem cells (ESCs) and bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) with plasmid DNA encoding VEGF-165 carried by synthetic NPs. The results suggested that the non-viral genetic engineering of ESCs and MSCs enhanced their effects in wound repair and angiogenesis [34]. Taken together, these studies provide insight into nucleic acid-based therapies in skin wound healing that could outperform GF approaches, which have shown only moderate clinical success.

(chitosan). Nevertheless, they are mainly used for carrying drugs. For example, PLGA NPs can carry antibiotics (gentamicin), antiseptic (chlorhexidine), anti-inflammatory and antioxidant drugs (curcumin), GFs [VEGF, PDGF, EGF, fibroblast growth factor (FGF)], or nucleic acids as plasmid DNA targeting various phases of wound healing [28].

So, NP-based dressings appear to be an innovative tool to overcome the limitations of current treatments. NPs have the ability to carry, protect, and sustain the release of active drugs that are fragile and/or sensitive to *in vivo* conditions. Topical administration of NPs allows effective targeting, enhancing drug efficacy, and a lowered drug dose, decreasing side effects such as bacterial resistance and systemic toxicity.

NPs from Synthesis to Clinical Use

Clinical use needs industrial-scale production of NPs. Several parameters must be maintained, such as NP size, drug-loading efficiency, sterility, non-toxicity, and storage stability. Additional controls are mandatory for licensing NPs as drug-delivery systems.

Manufacturing Methods: From Laboratory Synthesis to Scale Up and Sterilization

Many efforts are being made towards green chemistry and ecofriendly production methods to synthesize, for instance, metal NPs such as silver NPs, gold NPs, cerium oxide NPs, and palladium and platinum NPs [35]. These are less expensive and less harmful to the environment than conventional methods of synthesis. These processes avoid the use of toxic chemicals and solvents by means of synthesis by microorganisms such as fungi [36] or bacteria [37] or by plants [38] or by using glycosaminoglycans as reducing agents [39]. Fungus-based bioprocesses tolerate higher metal concentrations than bacteria and are easy to scale up [40].

One goal in meeting the biocompatibility requirement is the production of sterile NPs. Sterilization by γ -irradiation is generally possible. Regarding ceramic NPs, for example, some methods of synthesis of hydroxyapatite NPs are compatible with steam sterilization at 120 °C for 20 min, according to a standard procedure in biomedical applications [41]. The scale up of hydroxyapatite NP production is based on a modified co-precipitation process using a toxin-free gelatinized starch matrix without any surfactants [42]. The synthesis of lipid and polymeric NPs is based on various emulsion-solvent diffusion methods using low quantities of surfactants such as poly(vinyl alcohol) (PVA) to stabilize NPs [19]. All potentially toxic solvents or components are removed by evaporation, filtration, or washing steps. Although terminal sterilization by γ -irradiation can be used for both types of NP, sterilization by pressure filtration through a 0.2- μ m membrane filter is better adapted for polymeric NPs [19,43]. Scale up of polymeric NP synthesis, such as PLGA, was achieved by modification of the spontaneous emulsion-solvent diffusion method [44]. Large-scale lipid-based NP preparations are based on ethanol injection, high-pressure homogenization, or detergent depletion [18].

Regulatory Issues

Several NP formulations induce significant beneficial effects on skin wound healing in various experimental models. Nevertheless, no FDA-controlled clinical trials have been initiated to date. The development of specific research methodologies is required to validate and ensure the efficacy, non-toxicity, and safety of these NPs. To answer these needs, recent draft guidelines published by the FDA mentioned that significant effort must be invested in developing characterization standards to obtain better information about the medical and environmental toxicity of nanomaterials [45]. However, some nanoparticulate systems have already been approved by the FDA for medical uses such as vaccination (influenza or hepatitis A antigens) [18] and cancer therapy (prostate cancer/leuproliide) [45] and have been used for years. This may be promising for the future of NP-based skin wound therapy [45].

Toxicity Issues

Although green chemistry and sterilization allow the synthesis of clinically safe, non-toxic, and sterile NPs, extrinsic properties can lead to toxicity. For instance, the distribution and accumulation of non-biodegradable NPs in non-desirable zones (such as the brain) can be potentially toxic to the host. To avoid risks, tracking and biodistribution studies are essential before clinical use of non-biodegradable NPs, whereas they may not be systematically required for biodegradable and biocompatible NPs with a fast and safe degradation profile (Box 3). NS-based dressings in humans are subject to controversy due to the toxicity of silver ions, which stimulate ROS production [46]. However, this toxicity can be controlled by managing the size of the NPs [47], the storage conditions [46], and the concentration of silver ions [39]. Moreover, gold NPs as small as 5 nm were shown to promote ROS production and to provoke DNA damage [48].

Nanoparticulate Composites: Association of NPs with Scaffolds

Nanoparticulate composites (NPCs) associate NPs with scaffolds (Figure 1). A great advantage of NPCs is dual delivery [49]; that is, the capacity to load and deliver more than one drug or active component. For instance, NPCs harboring metal NPs exhibit enhanced antibacterial properties [50]. This provides the ability to control the sequence of release of the loaded drugs from both the NPs and the scaffold and to fit the chronology of healing process.

Nanofibrous Structures

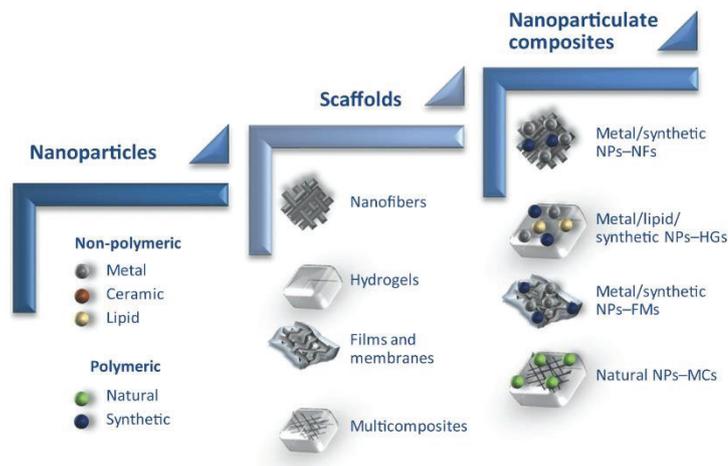
Most of the nanofibers (NFs) used in wound healing are obtained by **electrospinning**. The advantages of nanofibrous structures result from a high surface area, high porosity with small pore sizes, and biomimeticism due to morphological similarities with ECM [51]. Synergetic actions were suggested by combining the antioxidant properties of olive oil with the antibacterial properties of copper oxide NPs on polyurethane NFs [52]. An example of dual delivery was provided by the sequential release from multifunctional NFs of GFs acting first on angiogenesis and then on remodeling [53]. During dressing degradation, VEGF was released rapidly from the nanofibrous meshes of chitosan and then sustained release of PDGF-BB resulted from PLGA NP degradation.

Hydrogels

Hydrogels are mostly used for their moistening properties, which help to rehydrate necrotic skin tissue and enhance autolytic **debridement**. Polysaccharides are often chosen as polymers for hydrogel production because they are mucoadhesive and naturally possess high water affinity [54], giving superabsorbent dressings [55]. Moreover, to overcome the inactivation of proteins by ROS, co-delivery of an antioxidant by a composite hydrogel was shown to preserve the EGF delivered by polymeric PLA NPs [56]. Their mechanical properties are also interesting for wound healing applications in terms of porosity (allowing absorption of large volumes of wound exudate), flexibility (adaptation to wound geometry), viscosity, **shear stress** (deformability adapted to the skin), and elasticity. Elegant skin-inspired hybrid scaffolds were engineered to

Box 3. *In Vivo* Biodistribution of NPs

For optimal efficiency, topically administered NPs should remain at the application site and the accumulation of nanomaterials in other organs should be avoided. Hence, *in vivo* biodistribution studies are essential to confirm NP retention in the various layers of the skin and to track any eventual leakage to the bloodstream. Unfortunately, most studies relating to *in vivo* administration of NPs do not include biodistribution analysis. The main methods of *in vivo* tracking are based on NPs marked with fluorescent dyes or radioactive markers. Hence, whole-animal imaging of NP distribution, particularly in deep tissues, might be improved by the use of near-IR fluorescing dyes [85]. Moreover, use of microparticles with nuclear markers, coupled with an *in vivo* gamma scintigraphy analysis, allows the visualization of particle permeation to the bloodstream and their retention on the skin surface [22].



Trends in Biotechnology

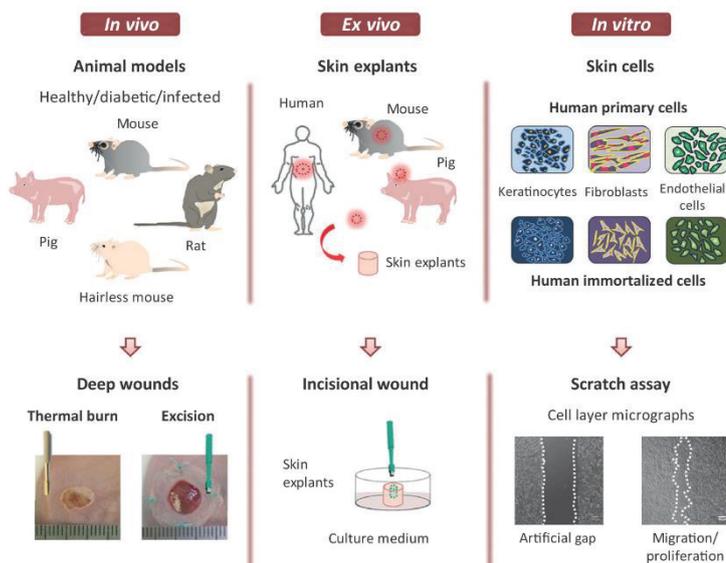
Figure 1. Schematic Illustration of Nanomaterials Used for Skin Wound Therapy: 'From Nanoparticles to Nanoparticulate Composites'. Abbreviations: FMs, films and membranes; HGs, hydrogels; MCs, multicomposites; NFs, nanofibers; NPs, nanoparticles.

mimic skin mechanical properties by using **elastomer** for epidermis and hydrogel for dermis [57]. In most studies on drug-loaded NPs, the use of hydrogels was motivated by the increased residence time of the encapsulated drug and the sustained release at the administration site [58,59].

Films and Membranes

Flexibility, bioadhesiveness, and resistance of dressings are provided by polymeric films and membranes. They must be carefully designed for skin applications, especially when produced by **film casting**, as this process could produce dense structures with low vapor and gas permeability, which can lead to exudate accumulation and infection. Film components may be either derived from natural sources, such as alginate, hyaluronan [60], or vegetable oil [61], or of synthetic origin, such as PVA [62]. They are often formulated as a mixture of the two [63]. The use of natural polymers such as collagen in the formulation leads to a certain degree of biomimeticism and provides intrinsic bioactivity [63]. These NCPs can be used for the sequential release of a proangiogenic and antimicrobial peptide from the film in the early stages of healing and of bemparin from NPs for the later regenerative events [60].

More recently, multicomposites were designed as combinations of different scaffolds and NPs. The antibiotic gentamycin was delivered from the inner layer of carbon NFs for antimicrobial action and an antioxidant polyphenol was delivered from NPs incorporated in an outer layer of a biodegradable polymer hydrogel to prevent inflammation and facilitate re-epithelialization [64]. This 'intelligent' association can induce gradual delivery of the loaded drugs according to the degradation or release characteristics of the dressing components.



Trends in Biotechnology

Figure 2. *In Vivo*, *Ex Vivo*, and *In Vitro* Experimental Models for Studying the Efficacy of Loaded Nanoparticles (NPs): 'From Mouse to Cells'. *In vivo* models of skin injury and repair usually include healthy, diabetic, and/or infected laboratory animals like pigs, rats, or (hairless) mice. Deep wounds in mice are depicted as either a second/third-degree thermal burn injury or a splinted full-thickness excisional injury. Burn depth results from the heat, the duration of exposure and the contact pressure of a heated brass bar on the skin. The splinted full-thickness excisional injury comprises skin removal with a biopsy punch and the attachment of a silicon ring around the wound to prevent skin contraction. For *ex vivo* models, total- or superficial-thickness incisional wounds using a biopsy punch are created on skin explants from mice, pigs, or humans. Regarding *in vitro* studies, one relevant test is the 'scratch assay' for the study of cell migration/proliferation. Human primary keratinocytes (normal human epidermal keratinocytes), fibroblasts (normal human dermal fibroblasts, BJ fibroblasts, CCD-112Sk cells), and endothelial cells (human microvascular endothelial cells) have been used [11,20,88]. Human and mouse fibroblast or keratinocyte immortalized cells may be used, such as Hs68 and HaCaT cells, or NIH3T3 and XB-2 cells, respectively [25,30,89]. Immortalized cells are easy to implement but carry genotype and/or phenotype modifications leading to potentially modified cellular responses to external factors compared with primary cells, which are fragile and subject to morphological changes after subculture. Significant differences in cell migration, proliferation, response to drugs, or biocompatibility may occur according to the cells used (primary cells vs cell lines and fibroblasts vs keratinocytes) [29,31,90].

Experimental Models for Studying the Efficacy of Loaded NPs

As illustrated in Figure 2, several experimental models are necessary to evaluate the efficacy of nanomaterials and to better understand the physiological events of wound healing.

In Vivo Observations

Among these, skin excision and thermal burn injury are the most widely used models for preclinical studies. Several standards, including availability, cost, ease of handling, investigator familiarity, and anatomical/functional similarity to humans, are taken into account when choosing an animal model (Box 4). The rodent excisional wound model makes possible the study of wound healing in terms of chronology (closure) and physiology (granulation, vasculature formation, etc.) as it allows tissue sampling at intervals for molecular and cellular analyses [65,66]. To prevent local skin contraction when studying the healing process through granulation and re-epithelialization, a splinting ring is fixed around the wound, allowing a reproducible

Box 4. Animal Models for Studying Skin Repair with NPs

In laboratories small rodents are largely used, as detailed in the main text. Nevertheless, mice and rats differ from human in terms of skin anatomy and physiology. For instance, the rodent skin is mobile and is covered all over the body with hair, with a thin epidermis and dermis and the presence of muscle, the panniculus carnosus, under the dermis. Moreover, the wound contraction process is part of wound closure, while in humans it occurs mainly by the generation of new tissue.

The SKH1 hairless immunocompetent mouse strain is an attractive model for wound healing studies. A major advantage is that hair removal with a razor, depilatory cream, or wax and the associated inflammation are avoided [86,87]. Moreover, the absence of hair regrowth prevents the obscuring of wound repair. The wound healing process of this strain under physiological or pathological conditions (ischemia, diabetes) is identical to that of haired mice. The only shortcoming of this strain is the relatively uncharacterized genetic background and the outbred status. Another model used for healing studies is the BALB/c-nude athymic mouse. However, this strain has the major drawback of immunodeficiency, which hides the immunological part of the healing process [59].

Interestingly, pig skin is anatomically and physiologically more similar to human skin than mouse skin. Human and pig wounds mainly close through the re-epithelialization process. Their epidermal and dermal thickness and the abundant subdermal adipose tissue are comparable. Porcine and human dermal collagens are similar, but pig skin is less elastic than its human counterpart. Consequently, because it resembles human skin, pig skin is an excellent animal model, except that studies are expensive and the animals are not easy to handle.

skin repair model [29–31]. Mouse pathologies such as diabetes and immunodeficiency are models of delayed wound healing [16,31]. The thermal burn injury model is largely used to test the anti-infective activity of NPs. Various methods of burn infliction exist, such as boiling water, preheated (single or double) metal plate/bar, ethanol bath, and gas flame [67]. Nevertheless, the major drawback of experimental burn injury is the lack of standardization. This is why a standard heated-bar-based thermal burn has been established for rats [9] and for mice [17].

Ex Vivo Observations

To reduce our reliance on the use of animals for scientific experimentation, a directive from the EU (76/768/EEC, February 2003) and other international regulations limit the use of animals for research purposes. To this aim, *ex vivo* models have been established with skin explants from humans (surgery) and animals [68,69]. Partial-thickness incisional wounds including the epidermis and the upper part of the dermis [69] and a full-thickness excisional wound (a donut-shaped model) including both epidermis and dermis [68] have been created. The restricted availability of human skin explants and the weakness of physiological reactions in the isolated tissue limit the use of this model.

In Vitro Observations

Although they do not fully reproduce the behavior of cells in a living organism, primary cells or immortalized cell lines represent an alternative to animal testing. The most frequently used cells are human primary keratinocytes, fibroblasts, or microvascular endothelial cells [30,35]. *In vitro* models have been established to mimic the cell migration and proliferation observed during the healing process. The cell-scratch assay comprises an artificial gap created on a confluent monolayer of cells as a model of a wounded tissue [70]. Cell proliferation and migration can be followed by image capture until the closure of the scratch. This inexpensive and easy method, widely used to evaluate the benefits of NPs in skin wound healing, allows for quantification of the migration pattern. The tracking of individual cell migration can be performed with microscopy and live-cell imaging.

Concluding Remarks and Future Perspectives

This review emphasizes NPCs as potential drug-delivery systems for wound healing. The current challenge is to include bioactive NPs in a matrix to create innovative biological dressings with sustained drug release into the wound bed, improving skin reconstruction. A 'green

synthesis process' is a prerequisite for the creation of these wound dressings based on biodegradable and biocompatible components. PLGA biodegradable polymer is one of those more suitable for the production of NPs of clinical interest because it protects loaded drugs from biological degradation, leading to enhanced stability and sustained release and thus allowing a reduction of the administrated dose. Another prospect for skin repair could rely on specific gene expression (Box 2), considering nucleic acids as a new class of biological drugs and NPs as effective gene-delivery systems (see Outstanding Questions). Numerous NP-based treatments are undergoing preclinical studies or are in current clinical use. Despite differences with the human healing process, rodent models remain the most widely used before moving towards clinical assays in humans. In other respects, because animal experimentation is a matter of concern, and considering the numerous differences between animals and humans, it has become crucial to consider alternative methods for preclinical studies. In this regard, *in vitro* reconstructed human skin models deserve attention, and some have already been approved [71]. They allow studies of the re-epithelialization process in real time even if challenges remain, such as the incorporation of cutaneous annexes and immune and vasculature cells. **Organ-on-a-chip** models represent a recent advance of *in vitro* methods. This system has proved to be a useful tool in various studies [72] and should be a reliable way of evaluating the safety and efficacy of drug-loaded NPs on 3D skin cell models [71]. All of these models will foster the rapid development of NP-based dressings, keeping in mind that their development will also depend on legislation guidelines and their regulatory approval by health agencies.

Acknowledgments

The authors thank J.Y. Exposito and S. Megy for insightful reading of the manuscript. M.B. is supported by a doctoral fellowship from Direction Générale de l'Armement (DGA). B.V. and Y.G. are supported by a grant from ANR ASTRID (ANR-14-ASTR-0030).

References

- Gurtner, G.C. *et al.* (2008) Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314–321
- Powers, J.G. *et al.* (2016) Wound healing and treating wounds: chronic wound care and management. *J. Am. Acad. Dermatol.* 74, 607–625; quiz 625–626
- Das, S. and Baker, A.B. (2016) Biomaterials and nanotherapeutics for enhancing skin wound healing. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 4, 82
- Chaloupka, K. *et al.* (2010) Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 28, 580–588
- Dreifke, M.B. *et al.* (2015) Current wound healing procedures and potential care. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 48, 651–662
- Griffith, M. *et al.* (2015) Anti-microbiological and anti-infective activities of silver. In *Silver Nanoparticle Applications: In the Fabrication and Design of Medical and Biosensing Devices* (Alarcon, E.I., ed.), pp. 127–146, Springer
- Pelgriff, R.Y. and Friedman, A.J. (2013) Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 1803–1815
- Chen, S.A. *et al.* (2012) Topical treatment with anti-oxidants and Au nanoparticles promote healing of diabetic wound through receptor for advanced glycation end-products. *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 875–883
- Lee, J. *et al.* (2015) Transdermal treatment of the surgical and burned wound skin via phytochemical-capped gold nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 135, 166–174
- Shibuya, S. *et al.* (2014) Palladium and platinum nanoparticles attenuate aging-like skin atrophy via antioxidant activity in mice. *PLoS One* 9, e109288
- Chigurupati, S. *et al.* (2013) Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes, fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing. *Biomaterials* 34, 2194–2201
- Meddahi-Pelle, A. *et al.* (2014) Organ repair, hemostasis, and *in vivo* bonding of medical devices by aqueous solutions of nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53, 6369–6373
- Kawai, K. *et al.* (2011) Calcium-based nanoparticles accelerate skin wound healing. *PLoS One* 6, e27106
- Viswanathan, K. *et al.* (2016) Chlorhexidine-calcium phosphate nanoparticles – polymer mixer based wound healing cream and their applications. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 67, 516–521
- Nurhasni, H. *et al.* (2015) Nitric oxide-releasing poly(lactic-co-glycolic acid)-polyethyleneimine nanoparticles for prolonged nitric oxide release, antibacterial efficacy, and *in vivo* wound healing activity. *Int. J. Nanomedicine* 10, 3065–3080
- Blecher, K. *et al.* (2012) Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing in NOD-SCID mice. *Nanomedicine* 8, 1304–1371
- Krausz, A.E. *et al.* (2015) Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. *Nanomedicine* 11, 195–206
- Kraft, J.C. *et al.* (2014) Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *J. Pharm. Sci.* 103, 29–52
- Gainza, G. *et al.* (2015) The topical administration of rhEGF-loaded nanostructured lipid carriers (rhEGF-NLC) improves healing in a porcine full-thickness excisional wound model. *J. Control. Release* 197, 41–47
- Furnakia, M. and Ho, E.A. (2016) Nanoparticles encapsulated with LL37 and serpin A1 promotes wound healing and synergistically enhances antibacterial activity. *Mol. Pharm.* 13, 2318–2331
- Lin, Y.H. *et al.* (2015) Development of chitosan/poly-γ-glutamic acid/pluronic/curcumin nanoparticles in chitosan dressings for wound regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 105, 81–90
- Pereira, G.G. *et al.* (2014) Microparticles of *Aloe vera*/vitamin E/chitosan: microscopic, a nuclear imaging and an *in vivo* test

Outstanding Questions

Will biodegradable polymers such as PLGA, in the form of NPs, matrices, or NP-matrix composites, also be approved for use as wound dressings?

Is the benefit brought by the loading of drugs into NPs or nanoparticulate dressings sufficient to replace current dressings for wound healing?

Would active drugs, particularly GFs, currently not authorized by the EMA for clinical use due to significant side effects (e.g., rPDGF-BB/Regranex®) be acceptable in the form of loaded NPs that potentially allow significantly lowered drug dosage?

Could new molecular biology approaches based on the modulation of gene expression using nucleic acids combined with NPs raise concerns for regulation agencies?

It is important to anticipate roadblocks before moving to complex assemblies using scaffolds and NPs with no obvious added value at first glance. Will the use of 'safe-by-design' products help in moving faster to clinical testing?

Animal experimentation tends to be progressively abandoned in favor of alternative methods. Will these *in vitro* and *ex vivo* models, using cultured cells, skin explants, or reconstructed skin, be relevant and robust enough to predict wound treatment efficacy in a non-physiologically integrated model?

- analysis for burn treatment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 86, 292–300
23. Blazevic, F. *et al.* (2016) Nanoparticle-mediated interplay of chitosan and melatonin for improved wound epithelialisation. *Carbohydr. Polym.* 146, 445–454
 24. Ozcan, I. *et al.* (2013) Enhanced dermal delivery of diflucortolone valerate using lecithin/chitosan nanoparticles: *in-vitro* and *in-vivo* evaluations. *Int. J. Nanomedicine* 8, 461–475
 25. Moreno, E. *et al.* (2015) Assessment of β -lapachone loaded in lecithin–chitosan nanoparticles for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis in *L. major* infected BALB/c mice. *Nanomedicine* 11, 2003–2012
 26. Wedmore, I. *et al.* (2006) A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations. *J. Trauma* 60, 655–658
 27. Tyler, B. *et al.* (2016) Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 107, 163–175
 28. Cherreddy, K.K. *et al.* (2016) PLGA based drug delivery systems: promising carriers for wound healing activity. *Wound Repair Regen.* 24, 223–236
 29. Cherreddy, K.K. *et al.* (2014) PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing. *J. Control. Release* 194, 136–147
 30. Cherreddy, K.K. *et al.* (2013) Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity. *J. Control. Release* 171, 208–215
 31. Cherreddy, K.K. *et al.* (2015) Combined effects of PLGA and vascular endothelial growth factor promote the healing of non-diabetic and diabetic wounds. *Nanomedicine* 11, 1975–1984
 32. Chu, Y. *et al.* (2010) Nanostomax promotes the full-thickness diabetic wound healing effect of recombinant human epidermal growth factor in diabetic rats. *Wound Repair Regen.* 18, 499–505
 33. Sharma, S. *et al.* (2016) PLGA-based nanoparticles: a new paradigm in biomedical applications. *Trends Anal. Chem.* 80, 30–40
 34. Castangia, I. *et al.* (2014) Fabrication of quercetin and curcumin bionanovesicles for the prevention and rapid regeneration of full-thickness skin defects on mice. *Acta Biomater.* 10, 1292–1300
 35. Makarov, V.V. *et al.* (2014) "Green" nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae* 6, 35–44
 36. Wen, L. *et al.* (2016) Symbiosis theory-directed green synthesis of silver nanoparticles and their application in infected wound healing. *Int. J. Nanomedicine* 11, 2757–2767
 37. Otari, S.V. *et al.* (2015) Intracellular synthesis of silver nanoparticle by *Actinobacteria* and its antimicrobial activity. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 136 (Pt B), 1175–1180
 38. Jadhav, K. *et al.* (2016) Green and ecofriendly synthesis of silver nanoparticles: characterization, biocompatibility studies and gel formulation for treatment of infections in burns. *J. Photochem. Photobiol. B* 155, 109–115
 39. Im, A.R. *et al.* (2013) Wound healing and antibacterial activities of chondroitin sulfate- and aacharan sulfate-reduced silver nanoparticles. *Nanotechnology* 24, 395102
 40. Kitching, M. *et al.* (2015) Fungal biosynthesis of gold nanoparticles: mechanism and scale up. *Microb. Biotechnol.* 8, 904–917
 41. Santos, C. *et al.* (2012) Relevance of the sterilization-induced effects on the properties of different hydroxyapatite nanoparticles and assessment of the osteoblastic cell response. *J. R. Soc. Interface* 9, 3397–3410
 42. Yang, L. *et al.* (2013) A scalable synthesis of non-agglomerated and low-aspect ratio hydroxyapatite nanocrystals using gelatinized starch matrix. *Mater. Lett.* 113, 142–145
 43. Tsukada, Y. *et al.* (2009) Particle size control of poly(L-lactide-co-glycolide) nanospheres for sterile applications. *Int. J. Pharm.* 370, 196–201
 44. Ye, Z. and Squillante, E. (2013) The development and scale-up of biodegradable polymeric nanoparticles loaded with ibuprofen. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 422, 75–80
 45. Bobo, D. *et al.* (2016) Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharm. Res.* 33, 2373–2387
 46. Ahlberg, S. *et al.* (2014) Comparison of silver nanoparticles stored under air or argon with respect to the induction of intracellular free radicals and toxic effects toward keratinocytes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 88, 651–657
 47. Avalos, A. *et al.* (2016) Interactions of manufactured silver nanoparticles of different sizes with normal human dermal fibroblasts. *Int. Wound J.* 13, 101–109
 48. Xia, Q. *et al.* (2016) The effect of particle size on the genotoxicity of gold nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A* 105, 710–719
 49. Gilmore, K.A. *et al.* (2016) Matrices for combined delivery of proteins and synthetic molecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 98, 77–85
 50. Chung, S. *et al.* (2016) Addition of selenium nanoparticles to electrospun silk scaffold improves the mammalian cell activity while reducing bacterial growth. *Front. Physiol.* 7, 297
 51. Yao, J. *et al.* (2014) High strength and high modulus electrospun nanofibers. *Fibers* 2, 158–186
 52. Anna, T. *et al.* (2014) Virgin olive oil blended polyurethane micro/nanofibers ornamented with copper oxide nanocrystals for biomedical applications. *Int. J. Nanomedicine* 9, 891–898
 53. Xie, Z. *et al.* (2013) Dual growth factor releasing multi-functional nanofibers for wound healing. *Acta Biomater.* 9, 9351–9359
 54. Das, A. *et al.* (2015) Preparation and characterization of silver nanoparticle loaded amorphous hydrogel of carboxymethylcellulose for infected wounds. *Carbohydr. Polym.* 130, 254–261
 55. Nelbert, K. *et al.* (2012) Wound-healing with mechanically robust and biodegradable hydrogel fibers loaded with silver nanoparticles. *Adv. Healthc. Mater.* 1, 621–630
 56. Li, X. *et al.* (2016) EGF and curcumin co-encapsulated nanoparticle/hydrogel system as potent skin regeneration agent. *Int. J. Nanomedicine* 11, 3993–4009
 57. Yuk, H. *et al.* (2016) Skin-inspired hydrogel-elastomer hybrids with robust interfaces and functional microstructures. *Nat. Commun.* 7, 12028
 58. Chen, X. *et al.* (2013) Astragaloside IV-loaded nanoparticle-enriched hydrogel induces wound healing and anti-scar activity through topical delivery. *Int. J. Pharm.* 447, 171–181
 59. La, W.G. and Yang, H.S. (2015) Heparin-conjugated poly(lactico-co-glycolic acid) nanospheres enhance large-wound healing by delivering growth factors in platelet-rich plasma. *Artif. Organs* 39, 388–394
 60. Reyes-Ortega, F. *et al.* (2015) Bioactive bilayered dressing for compromised epidermal tissue regeneration with sequential activity of complementary agents. *Acta Biomater.* 23, 103–115
 61. Diez-Pascual, A.M. and Diez-Vicente, A.L. (2015) Wound healing bionanocomposites based on castor oil polymeric films reinforced with chitosan-modified ZnO nanoparticles. *Biomacromolecules* 16, 2631–2644
 62. Herron, M. *et al.* (2014) Reduction in wound bioburden using a silver-loaded dissolvable microfilm construct. *Adv. Healthc. Mater.* 3, 916–928
 63. Ferreira, A.M. *et al.* (2014) Bioinspired porous membranes containing polymer nanoparticles for wound healing. *J. Biomed. Mater. Res. A* 102, 4394–4405
 64. Lin, Y.H. *et al.* (2016) Dressing with epigallocatechin gallate nanoparticles for wound regeneration. *Wound Repair Regen.* 24, 287–301
 65. Wang, X. *et al.* (2013) The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. *Nat. Protoc.* 8, 302–309
 66. Galiano, R.D. *et al.* (2004) Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen.* 12, 485–492
 67. Dai, T. *et al.* (2011) Animal models of external traumatic wound infections. *Virulence* 2, 296–315
 68. Hodgkinson, T. *et al.* (2014) Electrospun silk fibroin fiber diameter influences *in vitro* dermal fibroblast behavior and promotes healing of *ex vivo* wound models. *J. Tissue Eng.* 5, 2041731414551661
 69. Fontana, F. *et al.* (2016) Platelet lysate-modified porous silicon microparticles for enhanced cell proliferation in wound healing applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 988–996

70. Liang, C.C. *et al.* (2007) *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat. Protoc.* 2, 329–333
71. Planz, V. *et al.* (2016) *In vitro* models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. *J. Control. Release* 242, 89–104
72. Bhisel, N.S. *et al.* (2014) Organ-on-a-chip platforms for studying drug delivery systems. *J. Control. Release* 190, 82–93
73. Baier, G. *et al.* (2014) Enzymatic degradation of poly(L-lactide) nanoparticles followed by the release of octenidine and their bactericidal effects. *Nanomedicine* 10, 131–139
74. Li, L. *et al.* (2016) Synthesis and wound healing of alternating block polyurethanes based on poly(lactic acid) (PLA) and poly(ethylene glycol) (PEG). *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* Published online April 5, 2016. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.33670>
75. Hussain, Z. *et al.* (2013) Antidermatitic perspective of hydrocortisone as chitosan nanocarriers: an *ex vivo* and *in vivo* assessment using an NC/Nga mouse model. *J. Pharm. Sci.* 102, 1063–1075
76. Kulkamp-Guerreiro, I.C. *et al.* (2013) Evaluation of lipoic acid topical application on rats skin wound healing. *Acta Cir. Bras.* 28, 708–715
77. Pereira, R.F. and Bartolo, P.J. (2016) Traditional therapies for skin wound healing. *Adv. Wound Care (New Rochelle)* 5, 208–229
78. auf dem Keller, U. *et al.* (2006) Reactive oxygen species and their detoxification in healing skin wounds. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 11, 106–111
79. Werner, S. and Grose, R. (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 83, 835–870
80. Shechter, R. and Schwartz, M. (2013) CNS sterile injury: just another wound healing? *Trends Mol. Med.* 19, 135–143
81. Kasiewicz, L.N. and Whitehead, K.A. (2016) Silencing TNF α with lipidoid nanoparticles downregulates both TNF α and MCP-1 in an *in vitro* co-culture model of diabetic foot ulcers. *Acta Biomater.* 32, 120–128
82. Randeria, P.S. *et al.* (2015) siRNA-based spherical nucleic acids reverse impaired wound healing in diabetic mice by ganglioside GM3 synthase knockdown. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 5573–5578
83. Nelson, C.E. *et al.* (2013) siRNA delivery from an injectable scaffold for wound therapy. *Adv. Wound Care (New Rochelle)* 2, 93–99
84. Peng, L.H. *et al.* (2015) β -Cyclodextrin-linked polyethylenimine nanoparticles facilitate gene transfer and enhance the angiogenic capacity of mesenchymal stem cells for wound repair and regeneration. *J. Biomed. Nanotechnol.* 11, 680–690
85. Markus, M.A. *et al.* (2015) Tracking of inhaled near-infrared fluorescent nanoparticles in lungs of SKH-1 mice with allergic airway inflammation. *ACS Nano* 9, 11642–11657
86. Benavides, F. *et al.* (2009) The hairless mouse in skin research. *J. Dermatol. Sci.* 53, 10–18
87. Konger, R.L. *et al.* (2016) Comparison of the acute ultraviolet photoresponse in congenic albino hairless C57BL/6J mice relative to outbred SKH-1 hairless mice. *Exp. Dermatol.* 25, 688–693
88. Frankova, J. *et al.* (2016) Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* 14, e137–e142
89. Leu, J.G. *et al.* (2012) The effects of gold nanoparticles in wound healing with antioxidant epigallocatechin gallate and α -lipoic acid. *Nanomedicine* 8, 767–775
90. Boonkaew, B. *et al.* (2014) Cytotoxicity testing of silver-containing burn treatments using primary and immortal skin cells. *Burns* 40, 1562–1569

Objectif du projet de thèse

Objectif du projet de thèse

Dans le contexte et le cadre décrits en introduction de ce travail et dans l'analyse bibliographique, l'objectif précis de mon travail de recherche est de développer une thérapie innovante pour le traitement des plaies cutanées profondes, fondée sur l'utilisation de nanoparticules de poly(acide lactique) biocompatibles et biodégradables, capables de délivrer des principes actifs impliqués dans la régénération tissulaire.

Cette recherche se décline en trois grandes macro-tâches :

- 1) Produire des NP de PLA vectrices a) d'un antioxydant, la vitamine E (VE), afin de contrer la surproduction délétère d'espèces réactives de l'oxygène induite par une plaie profonde, et/ou b) du facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF2), pour induire la prolifération, la migration des cellules endothéliales et la néoangiogenèse impliquées dans la reconstruction tissulaire.
- 2) Evaluer *in vitro* l'efficacité de ces NP fonctionnalisées par les molécules bioactives.
- 3) Mettre au point un modèle expérimental *in vivo* de plaie cutanée profonde, afin d'initier une étude préclinique d'efficacité de nos NP « médicalisées ».

Ensuite, une fois ces tâches réalisées dans le cadre de la thèse, l'objectif est, dans le cadre plus large du projet PaNaCée évoqué en introduction, d'insérer ces NP actives dans une matrice nano-fibrillaire « support » porteuse de molécules anti-infectieuses, afin de réaliser un pansement bioactif-biodégradable, utilisable sur le terrain, favorisant dans un environnement aseptique, la colonisation cellulaire, la cicatrisation rapide et la reconstruction d'un derme fonctionnel.

Résultats

Résultat I. Encapsulation de vitamine E dans des NP de PLA et évaluation de leur activité in vitro

Résultat I. Encapsulation de vitamine E dans des NP de PLA et évaluation de leur activité in vitro

Introduction

En raison du rôle central des ROS dans le processus de cicatrisation, le maintien de l'équilibre de la balance pro-oxydant/antioxydant est une cible thérapeutique dans le développement de nouvelles stratégies, pour endiguer l'inflammation excessive des plaies cutanées. La vitamine E (VE) est à cet égard un outil intéressant. C'est un antioxydant liposoluble, de nature non enzymatique, qui se présente sous plusieurs formes : 4 tocophérols et 4 tocotriénols (formes α , β , γ et δ). La structure moléculaire est constituée d'un noyau chromanol et d'une chaîne latérale phytyle saturée en position C2. La forme α -tocophérol est la plus abondante dans l'organisme et la plus active biologiquement. L' α -tocophérol présente huit stéréoisomères (RRR, RSR, RRS, RSS ; SRR, SSR, SRS, SSS), qui diffèrent entre eux par la position des groupements méthyle en C2, C4 et C8 des chaînes latérales. Les tocophérols de source naturelle ont une seule structure, la forme RRR (d- α -tocophérol) alors que l' α -tocophérol synthétique, appelé all-rac- α -tocophérol ou dl- α -tocophérol, est un mélange racémique des huit stéréoisomères (**Figure 19**). Comme mentionné ci-dessus, la VE protège les lipides membranaires contre l'oxydation. En effet, une molécule de α -tocophérol peut piéger deux radicaux peroxydés responsables de l'initiation de l'oxydation lipidique.

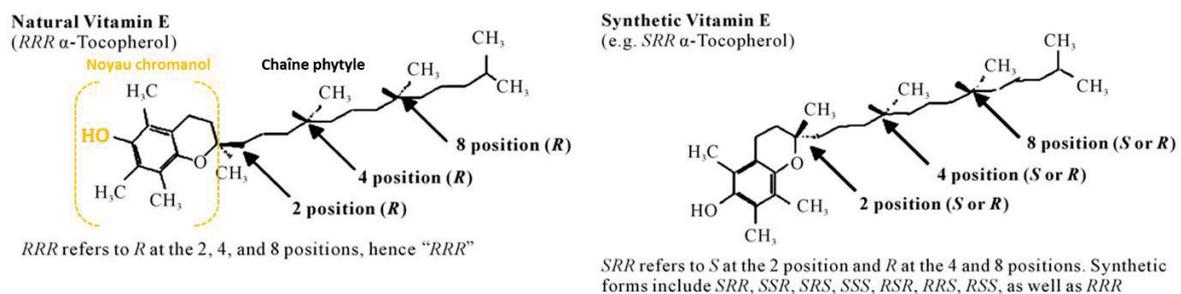


Figure 19 : Structure chimique de la vitamine E naturelle et synthétique (adapté de Vagni et al. 2011) [92].

La VE en application topique a déjà montré son efficacité dans la protection de la peau des coups de soleil, du photovieillissement et des maladies cutanées comme l'eczéma ou le

Résultat I. Encapsulation de vitamine E dans des NP de PLA et évaluation de leur potentiel *in vitro*

psoriasis. De par son action anti-antioxydante, la VE est donc susceptible de moduler la réaction inflammatoire, d'accélérer la cicatrisation des plaies et d'éviter la formation de cicatrice hypertrophique. Cependant, la formulation de α -tocophérol en tant que principe actif est difficile, de par sa forte hydrophobicité et sa sensibilité à l'oxygène et la lumière. Différentes techniques de nanoencapsulation ont été utilisées pour protéger cette molécule bioactive, permettant ainsi d'augmenter sa stabilité et de prolonger sa durée de délivrance.

L'objectif principal de la présente étude a été de développer une nouvelle formulation à base d' α -tocophérol. Notre travail a consisté à encapsuler de la VE (dl- α -tocophérol) dans des NP de PLA par la méthode de nanopréciipitation, sans ajout de tensioactifs et à optimiser l'encapsulation de l' α -tocophérol. Ces formulations ont été caractérisées par des méthodes physico-chimiques et des méthodes *in vitro* pour évaluer leur potentiel en tant que système de délivrance de VE sur la cicatrisation des plaies. Pour atteindre cet objectif une étude préalable a été réalisée pour évaluer l'influence du taux de chargement sur les caractéristiques de NP de PLA-VE, comme le pourcentage d'encapsulation, le diamètre hydrodynamique, l'indice de polydispersité et le potentiel zêta. Une fois le taux de chargement optimal pour les formulations, c'est-à-dire le taux de chargement permettant d'introduire la plus grande quantité de VE avec le minimum de modifications des paramètres physico-chimiques, une seconde étude a été réalisée pour évaluer la stabilité et le relargage de la VE des NP de PLA-VE. La cytotoxicité et l'action antioxydante des NP de PLA-VE ont été évaluées sur des fibroblastes issus de culture primaire.

I. Matériels et méthodes

a. Synthèse des NP de PLA-VE

Les NP de PLA (Poly (D,L-acide lactique)) ; PLA 50 Mn = 50 000 g/mol, distribution des masses molaires Mw/Mn = 1,7) encapsulant de la VE (Sigma, T3251-56) ont été élaborées par nanopréciipitation sans utilisation de tensioactifs [93]. Brièvement, 1,0 g de polymère de PLA est dissout dans 49,25 mL d'acétone (Carlo Erba, 301505) sous agitation magnétique à 250 rpm, pendant 10 min. Une solution de vitamine E à 100 µg/mL en acétone a été préparée. Un volume de 750 µL de la solution de vitamine E a été ajouté à la solution de polymère. Le mélange est laissé sous agitation magnétique à 250 rpm, pendant 5 min. La solution contenant le polymère et la vitamine E est placée dans une ampoule à décanter et est coulée en un léger filet dans un ballon, contenant 20 mL d'eau stérile (OTEC, 600499) et 15 mL d'éthanol 96°C (Carlo Erba, 3086412) placé sous agitation magnétique à 250 rpm. En fin de coulée, 10 mL d'eau ont été ajoutés à la solution de particules néo-formées. Les solvants organiques ont été évaporés sous vide partiel à 32°C, à l'aide d'un rotavapor (BUCHI). Les NP de PLA sans VE sont préparées selon le même protocole à l'exception de l'ajout de VE dans la solution de polymère. La fraction de VE encapsulée dans les NP de PLA a été déterminée après centrifugation à 16 896 x g pendant 30 min. Le surnageant est collecté pour déterminer la fraction de VE non encapsulée. Le culot est lavé deux fois avec de l'eau stérile et centrifugé à 16 896 x g pendant 15 min. Le culot a été congelé -20°C et lyophilisé pendant 6 h pour ensuite déterminer la fraction de VE encapsulée.

b. Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-VE

1. Diamètre, indice de polydispersité, potentiel zêta des NP

Le diamètre hydrodynamique (nm) et l'indice de polydispersité (Ip) des NP de PLA et des NP de PLA-VE ont été mesurés par diffusion dynamique de la lumière (*dynamic light scattering*, DLS) et le potentiel zêta a été déterminé par électrophorèse en utilisant un Zêta Sizer Nano Zen 5600 (Malvern Instruments, UK). Les NP ont été diluées à 1 mM en NaCl pour effectuer ces mesures. Les valeurs retenues sont la moyenne de quatre mesures indépendantes.

2. Morphologie des NP de PLA-VE

La morphologie des NP de PLA et des NP de PLA-VE a été observée par microscope électronique à balayage (MEB) comme précédemment décrit [94]. Brièvement, une goutte de NP diluées en eau (0,15% (m/m)) a été déposée sur une lamelle en verre (coverslip) fixée sur un plot (Aluminum mount, Slotted Head, Electron Microscopy Sciences). Après séchage dans un incubateur à 37°C, quelques points avec un vernis argent (Silver Conductive Adhesive 18DB7OX, Electro Microscopy Sciences) ont été effectués sur les parois du plot avant d'observer les NP au MEB (FEG Hitachi S800).

3. Rendement d'encapsulation de VE dans les NP

Le rendement d'encapsulation de VE dans les NP de PLA estime la quantité de VE encapsulée dans les NP de PLA-VE. Le surnageant a été utilisé pour doser la quantité de VE non encapsulée. Le culot a été resuspendu dans 1 mL d'acétonitrile grade HPLC (Carlo ERBA, V4C712284E). Une HPLC (Agilent 1100 Series) a été utilisée pour quantifier la concentration de VE. Une colonne HPLC de silice C18 (LiChroCART® 125-4 RP-18e (5 µm), Merck Millipore) a été utilisée avec un débit d'élution de 0,8 mL.min⁻¹. Un mode isocratique a été réalisé avec un éluant composé de 99% CH₃CN, 1% H₂O et 0,1% C₂HF₃O₂. Un volume de 40 µL de l'échantillon est injecté. Une gamme de calibration en Vitamine E diluée en acétonitrile de 1 µg/mL à 100 µg/mL a été réalisée. La longueur d'onde de détection de la Vitamine E a été fixée à 290 nm. La concentration totale de VE contenue dans le lot de NP de PLA-VE (fraction libre et encapsulée) ainsi que la concentration de VE encapsulée dans le lot de NP de PLA-VE ont été mesurées pour déterminer le taux de chargement, l'efficacité d'encapsulation et le rendement d'encapsulation de VE dans les NP de PLA. Les équations sont présentées dans l'encadré ci-dessous [95] :

$$\text{Taux de chargement (\%)} : \frac{(Cr \times Vr)}{(m \text{ NP PLA-VE})} \times 100$$

Cr : concentration de VE dans les NP (HPLC, culot) (µg/mL)

Vr : volume de la solution de NP-VE (Volume dans lequel on reprend le culot de NP-VE) (mL)

m NP PLA-VE : masse du culot (µg)

Résultat I. Encapsulation de vitamine E dans des NP de PLA et évaluation de leur potentiel *in vitro*

$$\text{Efficacité d'encapsulation (\%)} : \frac{\text{Taux de chargement}}{(m \text{ VE}/(m \text{ VE}+m \text{ PLA}))} \times 100$$

m VE : masse de VE initialement introduite lors de la synthèse du lot (masse théorique) (g)

m PLA : masse de PLA initialement introduite lors de la synthèse du lot (masse théorique) (g)

$$\text{Rendement d'encapsulation (\%)} : \frac{(C \text{ NP PLA-VE culot })}{(C \text{ NP PLA -VE totale})} \times 100$$

C NP-VE culot : concentration dosée dans le culot ($\mu\text{g/mL}$)

C NP-VE totale : concentration dosée dans le lot entier de NP-VE ($\mu\text{g/mL}$)

4. Détermination du taux de solide des NP de PLA.

Le taux de solide détermine la concentration massique de la solution de particules. Il est mesuré pour chaque lot de particules après leur synthèse et est calculé à partir de la pesée d'un volume de dispersion humide puis séché à l'étuve une nuit à 50°C. Des triplicats sont effectués pour chaque lot de particules. Le taux de solide est exprimé selon l'équation suivante :

$$\text{Taux de solide (\%)} = \frac{(\text{masse de nanoparticules sèches (g)})}{(\text{masse de la solution de nanoparticules (g)})} \times 100$$

c. Etude de stabilité des NP de PLA-VE

Cette étude de stabilité a été réalisée immédiatement après la synthèse de trois lots indépendants de NP de PLA-VE pour s'assurer de la robustesse des résultats (N=3). Au jour 0, des aliquots des 3 lots de NP de PLA-VE ont été suspendus dans de l'eau (3% (m/m)) et transférés à chaque fois dans 2 tubes en polypropylène de 5 mL (n=2). Ils ont été stockés soit à 4°C, soit dans des incubateurs à 27°C et 37°C. Aux jours 0, 7, 14, 21 et 28, 10 μL ont été prélevés pour mesurer le diamètre, l' I_p , le potentiel zêta des NP de PLA-VE et 500 μL ont été prélevés pour déterminer le rendement d'encapsulation en VE, comme décrit dans les sections **I.b.1** et **I.b.3**. Aux jours 0, 14 et 28, la morphologie des NP de PLA-VE a été contrôlée par prélèvement de 2,5 μL des lots comme décrit dans la section **I.b.2**.

d. Profil de relargage *in vitro* de la VE des NP de PLA-VE

La libération *in vitro* de VE des NP de PLA-VE a été étudiée dans des milieux différents aux caractéristiques physico-chimiques proches de l'environnement d'une plaie. (i) Un premier système composé de deux phases (hydrophile/lipophile) utilisant du PBS 1X comme phase hydrophile et de l'hexane comme phase lipophile a été développé pour mimer l'environnement du *stratum corneum* de la peau [96]. (ii) Un second système de relargage a été développé, composé d'une phase hydrophile à pH acide avec ou sans tensioactif (Tween 20), pour mimer l'environnement acide de la plaie et les membranes cellulaires [97].

(i) Des NP de PLA-VE (taux de chargement VE de 10%) ont été suspendues dans du PBS 1X (4 mL, 0,06% (m/m)) et ajoutées à un même volume d'hexane (Sigma Aldrich, 15671) dans des flacons en verre [96]. Les flacons, fermés par un bouchon en plastique et entourés de parafilm, ont été placés à TA (TA) sur un agitateur rotatif à 35 rpm. Aux temps 30 min, 1 h, 3 h, 5 h, 24 h, 48 h, 72 h et 1 semaine, 1 mL des suspensions de NP de PLA-VE contenues dans la phase hydrophile sont prélevés et centrifugés 30 min, à 16 896 x g. La VE contenue dans le culot a été analysée par HPLC comme décrit dans la section **I.b.3**. Une gamme étalon de VE dans de l'acétonitrile est réalisée de 1,5 µg/mL à 100 µg/mL pour quantifier la VE contenue dans le culot. Cette étude a été réalisée deux fois sur un lot de NP de PLA-VE et des triplicats sont réalisés pour chaque temps (N=2, n=3). La quantité de VE libérée à chaque temps (t « x ») a été déterminée et est exprimée comme le pourcentage de VE libérée des NP de PLA selon l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage de libération des NP de PLA-VE (\%)} = 100 - \frac{(100 - C_{\text{NP.VE culot t"x"}})}{(C_{\text{NP.VE culot t0}})}$$

(ii) Des NP de PLA-VE (taux de chargement VE de 7%) ont été suspendues dans du tampon citrate pH 5,6 (0,5% (m/m)) avec ou sans 6% de Tween 20 [97]. 1 mL de NP de PLA-VE a été distribués dans des tubes Eppendorf de 2 mL et stockés à 37°C sous agitation à 0,009 x g (25 rpm). Aux temps 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h les suspensions de NP de PLA-VE sont centrifugées à 16 896 x g pendant 15 min et la VE libérée dans le surnageant (500 µL) a été dosée selon la méthode décrite dans la section **I.b.3**. Une gamme de calibration de la VE dans le tampon citrate pH 5,6 avec 6% de Tween 20 est réalisée de 100 µg/mL à 700 µg/mL pour quantifier la VE contenue dans les échantillons contenant 6% de Tween 20. Une gamme de calibration de la VE dans l'acétone est réalisée de 1,5 µg/mL à 100 µg/mL pour quantifier la

Résultat I. Encapsulation de vitamine E dans des NP de PLA et évaluation de leur potentiel *in vitro*

VE contenue dans les échantillons sans Tween 20. Cette étude a été réalisée sur deux lots indépendants de NP de PLA-VE et des triplicats sont réalisés pour chaque temps (N=2, n=3). La quantité de VE libérée à chaque temps (t « x ») a été déterminée et est exprimée comme le pourcentage de VE libérée des NP de PLA selon l'équation suivante :

$$\text{VE libérée des NP de PLA (\%)} = \frac{(\text{C VE surnageant t "x"})}{(\text{C VE totale t0})} \times 100$$

e. Tests d'efficacité *in vitro*

1. Les cultures de cellules

Une lignée de fibroblastes embryonnaires de souris NIH3T3 (CelluloNet : CRB de Lignées Cellulaires) a été cultivée dans un milieu DMEM complet composé de DMEM 1X (4,5 g/L D-Glucose), (Gibco par life technologies, 31053-028) supplémenté par un mix d'antibiotiques pénicilline-streptomycine (100 Unités/mL Pénicilline, 100 µg/mL Streptomycine) (Life technologies, 15070-063) et par 10% de SVF (Gibco, by life technologies, 10270-106), 1 mmol/L de pyruvate (100 mM, S11-033, PAA Cell culture compagny), et 1X de L-glutamine (200 mmol/L 100X, 25030-024, Gibco by life technologies).

Des fibroblastes dermiques primaires humains NHDF (Normal Human Dermal Fibroblast), isolés de prépuce néonatal, ont été obtenus auprès de PromoCell (ref C-12300, Heidelberg, Allemagne). Ces cellules sont mises en culture dans un milieu DMEM-F12 1:1, Glutamax (Life technologies) supplémenté par 10% de SVF et par de la pénicilline-streptomycine (100 Unités/mL pénicilline, 100 µg/mL streptomycine).

Les cellules NIH3T3 et NHFD sont cultivées à 37°C, sous 5% de CO₂ et décollées des flasques lorsqu'elles atteignent 80% de confluence par une solution de trypsine-EDTA (0,5%) (Life technologies, 15400-054) avec un ratio de sous culture de 1:5.

2. Etude de cytotoxicité des NP de PLA et des NP de PLA-VE

La cytotoxicité de la formulation a été testée sur les NHDF à l'aide du « Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH) » (Roche, 04 744 934 001). La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytoplasmique stable dans toutes les cellules. Elle est rapidement libérée dans le surnageant de culture cellulaire lorsque la membrane cellulaire est endommagée. L'augmentation de l'activité

Résultat I. Encapsulation de vitamine E dans des NP de PLA et évaluation de leur potentiel *in vitro*

LDH du surnageant de culture est corrélée à l'augmentation de la mort cellulaire. Les cellules NHDF (50 000/puits) sontensemencées en milieu de culture complet dans des plaques de 96 puits et incubées pendant 30 h. Les cellules sont traitées par 300 µL de milieu de culture avec 1% SVF dépourvu d'antibiotiques et de pyruvate avec de la VE à 4,3 µg/mL (10 µM) ou 2,2 µg/mL (5 µM), ou des NP de PLA-VE aux mêmes concentrations en VE (10 et 5 µM), ou des NP de PLA nues à 30 µg/mL et 300 µg/mL pendant 24 h, 48 h et 72 h (N=1, n=4). Aux différents temps, 150 µL de milieu est retiré de tous les puits. Un contrôle positif avec une solution de lyse est effectué en incubant les cellules 15 min avec 5 µL de solution de lyse à TA. Un surnageant de culture non traité sert de contrôle négatif. Les cellules sont incubées 10 min à TA à l'abri de la lumière, en présence de 100 µL du mélange « reaction mixture ». Pour finir, 50 µL de solution « stop » sont ajoutés à chaque puits avant de mesurer l'absorbance à 490 nm.

Le pourcentage de cytotoxicité est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{(\text{Abs moyenne expérimentale} - \text{Abs moyenne des contrôles négatifs})}{(\text{Abs moyenne des contrôles positifs} - \text{Abs moyenne des contrôles négatifs})} \times 100$$

3. Etude de l'activité antioxydante des NP-VE

La quantité de ROS intracellulaire a été mesurée par fluorimétrie en utilisant la sonde carboxy-H2DCFDA (6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate) (Life technologies, C-400). Cette sonde est hydrolysée par des estérases cellulaires en carboxy-DCFH (6-carboxy-dichlorodihydrofluorescéine) dont l'oxydation par les ROS en carboxy-DCF fluorescent (6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescéine) permet de quantifier le taux de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) intracellulaire. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de ROS intracellulaires. Brièvement, les fibroblastes NIH3T3 (40 000 cellules/puits) ont été mis en culture dans des plaques de 96 puits en milieu complet, puis incubés pendant 24 h. Les cellules ont été traitées avec de la VE à 1,1 µg/mL (2,5 µM), des NP de PLA-VE à la même concentration en VE (2,5 µM) et des NP de PLA nues à 130 µg/mL pendant 16 h (N=1, n=11). Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS 1X, puis ont été traitées avec 10 µM de carboxy-H2DCFDA pendant 2 h à 37°C, 5% CO₂. L'excès de sonde est éliminé en lavant deux fois les cellules au PBS 1X. Ensuite, les cellules ont été stressées par ajout de phorbol 12-myristate 13-acétate à 1 ng/mL (PMA, Sigma, P8139-1MG). La fluorescence émise par le réactif oxydé a été lue à 527 nm, après excitation à 495 nm toutes les 15 minutes, pendant les 2 h de traitement au PMA, à l'aide d'un fluorimètre (Infinite 1100, Tecan).

II. Résultats

Dans une précédente étude, nous avons étudié l'influence du taux de chargement en VE dans les NP de PLA sur la stabilité colloïdale pendant 56 jours. Des lots de NP de PLA-VE aux différents taux de chargements en VE (10%, 7%, 5%, 2,5%, 1,2%) ont été élaborés par nanopréciipitation (**annexe Tableau 8**). Après incubation à trois températures différentes (4°C, 27°C et 37°C), la taille, l'Ip et la charge de surface ont été mesurés par DLS. En parallèle, la stabilité en regard du relargage de la VE des NP de PLA au sein des lots a été étudiée par HPLC pendant toute la durée de l'étude. Les lots de NP de PLA-VE aux différents taux de chargement en VE ont montré une bonne stabilité dans le temps et aux différentes températures. Le lot de NP de PLA-VE au taux de chargement de 7% a été sélectionné pour la suite de nos études, pour son taux de chargement élevé avec des caractéristiques physico-chimiques stables dans le temps et au trois températures (**annexe Figure 36**).

a. Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-VE après synthèse

Des NP de PLA sans VE et avec VE ont été élaborées par la technique de nanopréciipitation sans ajout de tensioactif et caractérisées (n=3) selon les protocoles décrit dans les parties **I.a** et **I.b.1.2.3**. Le diamètre, l'Ip et la charge de surface de NP de PLA et des NP de PLA-VE ont été mesurés après synthèse et sont résumés dans le **Tableau 6**.

Nom	Diamètre (nm)	Indice de polydispersité	Potentiel zéta (mV)	[VE] encapsulée (µg/mL)	Efficacité d'encapsulation (%)	Rendement d'encapsulation (%)	Taux de chargement (mg VE / g PLA)
NPs de PLA-VE	215,5 ± 2,3	0,074 ± 0,016	-67,0 ± 2,6	2010,3 ± 510,8	91,2 ± 15,2	83,7 ± 7,1	69,1 ± 16,4
NPs de PLA	192,6 ± 11,4	0,040 ± 0,030	-57,6 ± 3,0	-	-	-	-

Tableau 6 : Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-VE et des NP de PLA nues (n=3). Le diamètre (nm), l'indice de polydispersité et le potentiel zéta (mV) sont obtenus par DLS. La concentration en VE encapsulée (µg/mL), l'efficacité d'encapsulation (%), le rendement d'encapsulation de VE dans les NP de PLA (%) et le taux de chargement en VE (mg de VE / g de PLA) sont déterminés par HPLC. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne ± SD de trois mesures.

Les NP de PLA-VE ont un diamètre moyen de 215,5 ± 2,3 nm, significativement plus élevé que les NP de PLA nues (192,6 ± 11,6 nm) ($P \leq 0.05$, t test unpaired, two-tailed). Les indices de polydispersité des NP de PLA nues et des NP de PLA-VE sont considérés comme similaires car ils ne diffèrent pas significativement (0,040 ± 0,030 vs 0,074 ± 0,016 ; respectivement) et parce que ces indices de polydispersité sont inférieurs à la valeur fixée par le cahier des charges de notre laboratoire, où un $I_p \approx 0,1-0,2$ est corrélé à une homogénéité en taille des NP. Les NP

Résultat I. Encapsulation de vitamine E dans des NP de PLA et évaluation de leur potentiel *in vitro*

sont chargées négativement avec des potentiels zêta qui diffèrent significativement de $-67,0 \pm 2,6$ mV pour les NP-VE et $-57,6 \pm 3,0$ mV pour les NP de PLA nues ($P \leq 0.05$, t test unpaired, two-tailed).

La concentration en VE encapsulée dans les NP de PLA a été déterminée par HPLC, elle est de $2010,3 \pm 510,8$ µg/mL. L'efficacité d'encapsulation est en moyenne de $91,2 \pm 15,2\%$, une perte moyenne de 8,8% en masse de VE et en masse de PLA est obtenue après synthèse des NP de PLA-VE. Le rendement d'encapsulation de VE dans les NP de PLA est en moyenne de $83,7 \pm 7,1\%$ avec un taux de chargement qui est en moyenne de $69,1 \pm 16,4\%$.

b. Etude de stabilité des NP de PLA-VE

L'étude de stabilité a été réalisée à trois températures (4°C, 27°C, 37°C), sur les trois lots de NP de PLA-VE précédemment caractérisés (N=3, n=2). À cette fin, chaque semaine la caractérisation physico-chimique des trois lots est refaite par DLS, afin de remesurer la taille, d'Ip et de potentiel zêta des NP de PLA-VE au cours du temps (28 jours) et en fonction de la température de stockage (4°C, 27°C et 37°C) (**Figure 20a/b**).

Dans la **Figure 20** sont résumées les évolutions des caractéristiques des trois lots des NP de PLA-VE en fonction du temps et de la température. Sur toute la durée de l'étude, les NP de PLA-VE ont un diamètre moyen de 217,0 nm (4°C), 217,5 nm (27°C) et 215,8 nm (37°C). Des différences significatives de taille sont observées par rapport à J0, à J21 et J28 à 4°C, à J28 à 27°C et à J7 à 37°C. Pour toutes les températures et durant toute la durée de l'étude, les Ip restent inférieurs à 0,1. En moyenne sur les 28 jours, les NP de PLA-VE stockées ont un Ip de 0,079, 0,081 et 0,073 à 4°C, 27°C et 37°C respectivement. Aucune différence significative n'est observée entre l'Ip à J0 et les autres temps. Le potentiel zêta des NP de PLA-VE stockées est en moyenne sur les 28 jours de l'étude, de -62,8 mV, -64,2 mV et de -63,5 mV à 4°C, 27°C et 37°C, respectivement. Cependant, des différences significatives sont observées entre les NP de PLA-VE stockés à 4°C à tous les temps et les NP de PLA-VE à J0 et les lots à J0 avec les lots stockés à 37°C à J21, J28 et les lots stockés à 27°C à J28. Le taux de chargement en VE reste constant dans le temps et aux différentes températures, à l'exception du J21 à 4°C où le taux de chargement est significativement plus faible qu'à J0.

Résultat I. Encapsulation de vitamine E dans des NP de PLA et évaluation de leur potentiel *in vitro*

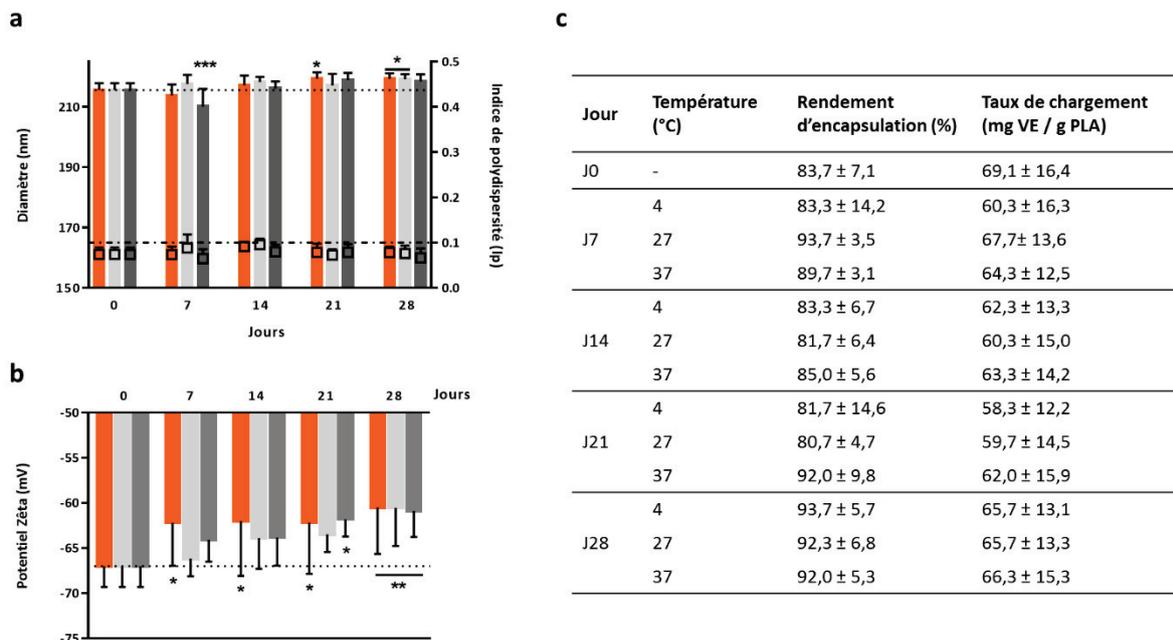


Figure 20 : Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-VE à trois températures (4 °C (orange), 27 °C (gris clair) et 37 °C (gris foncé)) sur 28 jours. Évaluation dans le temps (a) du diamètre (nm) et de l'Ip des NP de PLA-VE ; (b) du potentiel zêta (mV) des NP de PLA-VE ; (c) du taux de chargement en mg VE/ g PLA et du rendement d'encapsulation (%). Les données sont exprimées comme étant la moyenne ± la SD (N=3, n=2). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. Les valeurs obtenues aux jours J7, J14, J21 et J28 pour chaque température sont comparées à J0. **** diffère très significativement ($P \leq 0.0001$), *** diffère significativement ($P \leq 0.001$), ** diffère significativement ($P \leq 0.01$), * diffère significativement ($P \leq 0.05$).

c. Stabilité morphologique des NP de PLA-VE

Afin de corroborer les observations ci-dessus, les 3 lots de NP de PLA-VE ont été caractérisés par MEB pour visualiser la morphologie des NP fonctionnalisés aux jours 0, 7, 14 et 28. Les échantillons ont été traités comme décrit dans le protocole présenté en section **I.b.2**. Sur la **Figure 21** est représentée les NP de PLA-VE et les NP de PLA à J0 (après synthèse) et les NP de PLA-VE à J7, J14 et J28, aux trois températures (4 °C, 27 °C et 37 °C). Ces NP de PLA-VE sont de forme circulaire et lisse sur l'ensemble de l'étude. Des phénomènes de coalescence (fusion des NP entre elles) peuvent être observés.

Résultat I. Encapsulation de vitamine E dans des NP de PLA et évaluation de leur potentiel *in vitro*

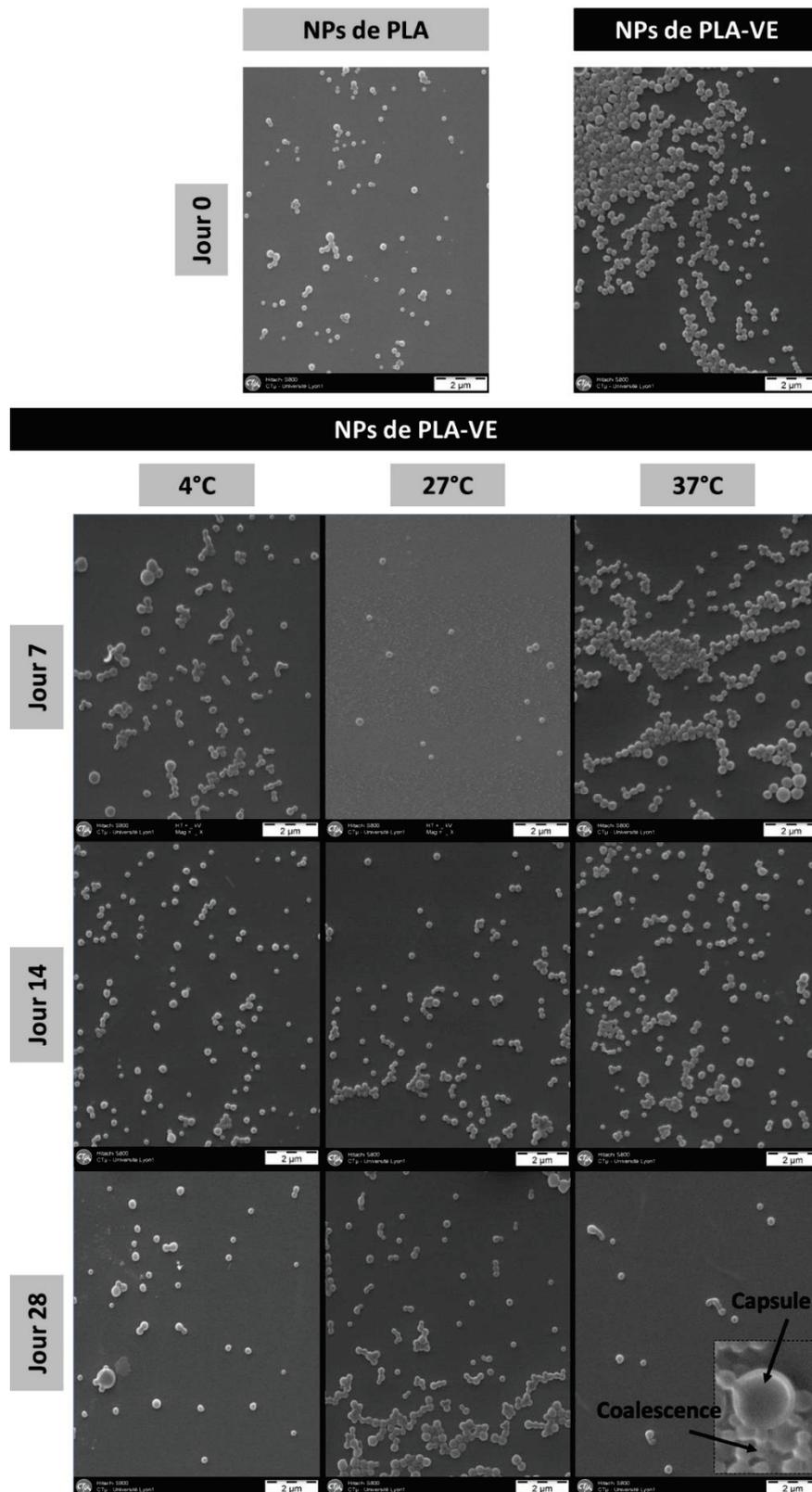


Figure 21 : Morphologie des NP de PLA et des NP de PLA-VE observée par Microscopie Électronique à Balayage. Images de NP de PLA et NP de PLA-VE à J0 et des NP de PLA-VE à J7, J14 et J28, aux trois températures (4°C, 27°C et 37°C).

d. Profil de relargage *in vitro* de la VE des NP de PLA-VE

L'étude de relargage de la VE encapsulée dans les NP de PLA est importante car une libération limitée de VE des formulations peut réduire sa biodisponibilité, donc son efficacité.

(i) La première étude, en milieu biphasique, a été réalisée sur un lot de NP de PLA-VE présentant un taux de chargement en vitamine E de 10,0%, suivant le protocole détaillé en I.d. Le profil de relargage de la VE des NP de PLA est exprimé en pourcentage de VE relarguée (**Figure 22**). La cinétique de relargage de la VE des NP de PLA a été suivie pendant une semaine, dans un milieu biphasique composé de PBS 1X et d'hexane.

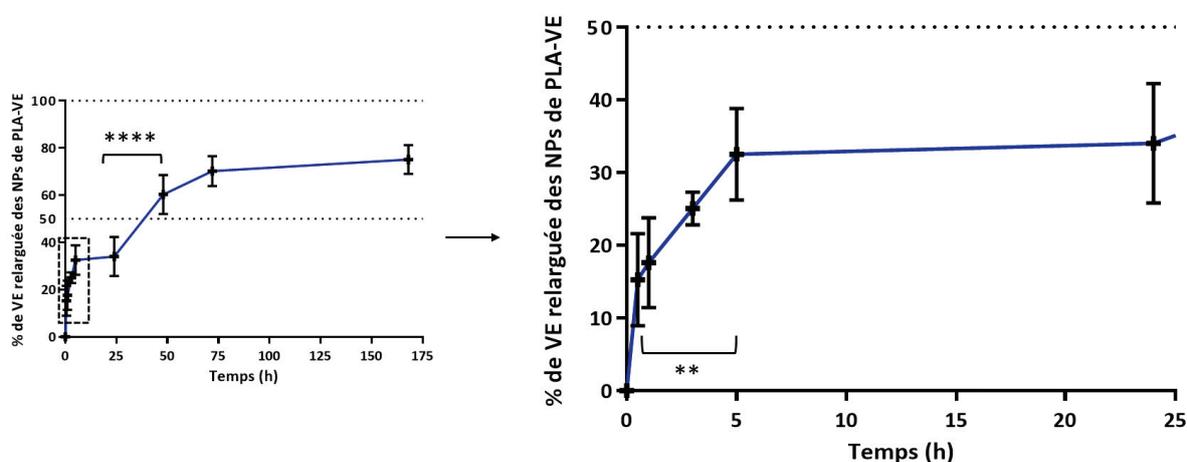


Figure 22 : Profil de relargage de la VE des NP de PLA-VE dans un milieu biphasique composé de PBS 1X et d'hexane. Les données sont exprimées comme étant la moyenne \pm la SD ($N=2$, $n=3$). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un one-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. **** diffère significativement de 24 h à 48 h ($P \leq 0,0001$) et ** diffère significativement de 30 min à 5 h ($P \leq 0,01$).

La cinétique de relargage de la VE dans le système biphasique présente un profil de libération en deux temps. La VE des NP de PLA-VE est rapidement libérée, avec $15,3 \pm 7,7\%$ et $31,4 \pm 7,8\%$ étant relargués après 30 min et 5 h d'incubation, respectivement ($p < 0,01$). De 5 h à 24 h d'incubation, un plateau apparaît, puis de 24 h à 48 h d'incubation, de la VE est de nouveau libérée avec respectivement $34,0 \pm 10,6\%$ et $60,3 \pm 10,4\%$ ($p < 0,0001$) de relargage cumulé. Au-delà de 48 h d'incubation, le relargage de la VE des NP de PLA-VE atteint un plateau atteignant $75,1 \pm 7,8\%$ de VE libérée en 1 semaine.

Résultat I. Encapsulation de vitamine E dans des NP de PLA et évaluation de leur potentiel *in vitro*

(ii) La deuxième étude est réalisée sur deux lots de NP de PLA-VE présentant un taux de chargement en vitamine E de 7,0%, suivant le protocole détaillé en I.d. Le profil de relargage de la VE des NP de PLA est exprimé en pourcentage de VE relarguée (**Figure 23**). La cinétique de relargage de la VE des NP de PLA a été suivie pendant 24 h, dans le tampon citrate pH 5,6 (courbe verte) et dans le tampon citrate avec 6% de Tween 20 (courbe rouge).

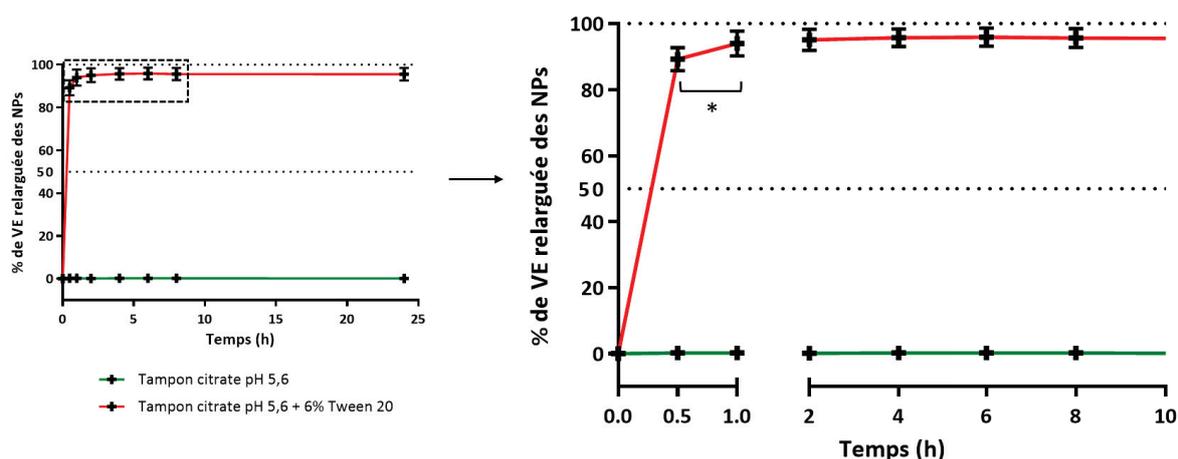


Figure 23 : Profil de relargage de la VE des NP de PLA-VE dans un tampon citrate pH 5,6 en absence (courbe verte) et en présence (courbe rouge) de 6 % de Tween 20 ($N=2$). Les données sont exprimées comme étant la moyenne \pm la SD ($n=6$) pour le tampon citrate pH 5,6 et ($n=3-5$) pour le tampon citrate pH 5,6 avec 6 % de Tween 20. Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un one-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. * diffère significativement de 30 min à 1 h ($P \leq 0,05$).

Dans le tampon citrate pH 5,6, le relargage de la VE des NP est insignifiant puisqu'il est de 0,2% sur les 24h de l'étude. La cinétique de relargage de la VE dans le tampon citrate pH 5,6 avec 6% de Tween 20 est très rapide avec $89,2 \pm 3,5\%$ de VE relarguée après 30 min d'incubation. Puis de 30 min jusqu'à environ 1 h d'incubation, la VE se relargue rapidement de $89,2 \pm 3,5\%$ à $94,0 \pm 3,8\%$ ($P \leq 0,05$). Au-delà de 1 h et jusqu'à 24 h, le relargage de la VE atteint un plateau, et la quantité de VE encapsulée dans les NP de PLA est presque totalement relarguée, avec environ $95,5 \pm 2,9\%$ de VE relarguée après 24 h.

e. Tests d'efficacité *in vitro*

1. Activité cytotoxique des NP de PLA et des NP de PLA-VE

L'effet cytotoxique des NP de PLA-VE, de la VE, des NP de PLA a été mesuré sur des fibroblastes NHDF, à l'aide du kit Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH) (**Figure 24**).

Résultat I. Encapsulation de vitamine E dans des NP de PLA et évaluation de leur potentiel *in vitro*

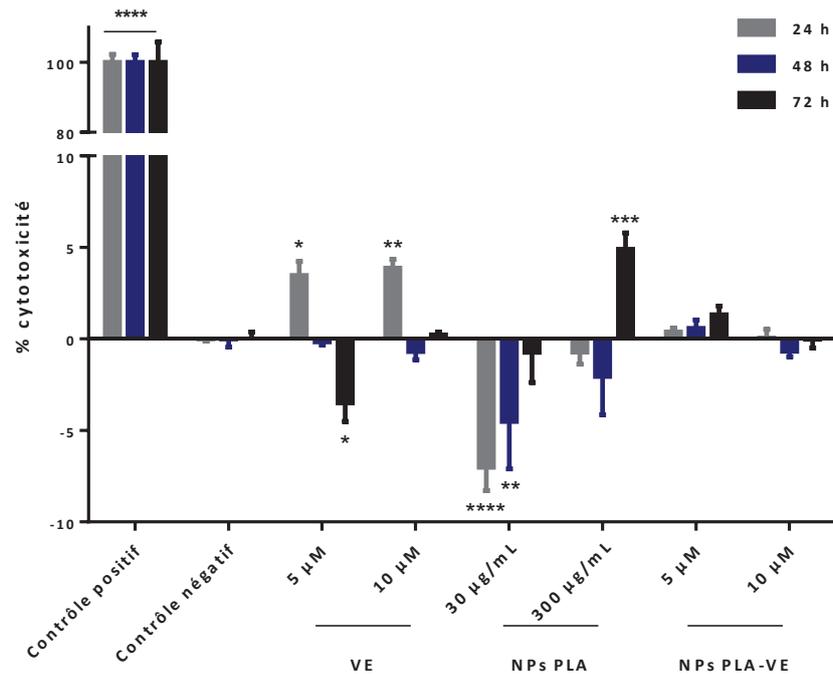


Figure 24 : Evaluation *in vitro* des NP de PLA-VE. Effet des NP de PLA (30 µg/mL et 300 µg/mL), de la VE libre (5 µM et 10 µM) et des NP de PLA-VE aux mêmes concentrations en VE sur l'activité LDH du surnageant de fibroblastes NHDF durant 24 h, 48 h, 72 h mesurée par LDH test. Les résultats sont représentés comme étant la moyenne ± la SD (n= 4). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. Les valeurs obtenues en condition non traitée (contrôle négatif) sont comparées aux autres conditions. **** diffère très significativement ($P \leq 0.0001$), *** diffère significativement ($P \leq 0.001$), ** diffère significativement ($P \leq 0.01$), * diffère significativement ($P \leq 0.05$).

Le pourcentage de mortalité des fibroblastes traités par des NP de PLA-VE, de la VE libre ou des NP de PLA nues est comparé à la mortalité des fibroblastes non traités (contrôle négatif). Les moyennes des pourcentages de cytotoxicité des cellules traitées avec de la VE à 5 µM et à 10 µM pendant 24 h sont significativement plus élevées que les cellules NT, ces valeurs sont respectivement de $3,5 \pm 0,1\%$ pour et $3,9 \pm 0,8\%$ contre $-7,5 \cdot 10^{-7} \pm 0,1\%$ pour les cellules NT. Les NP de PLA à 300 µg/mL induisent une cytotoxicité significativement plus élevée après 72 h de traitement comparé aux cellules NT ($4,9 \pm 0,9\%$, $P \leq 0,001$). Les NP de PLA-VE n'induisent pas significativement d'effet cytotoxique. Pour finir, les moyennes des pourcentages de mortalité des fibroblastes traités par des NP de PLA-VE, de la VE libre et des NP de PLA nues à tous les temps sont significativement différentes des cellules traitées avec une solution de lyse (contrôle positif) ($P \leq 0,0001$).

2. Activité antioxydante des NP de PLA-VE

L'efficacité de l'antioxydant après encapsulation a été évaluée *in vitro* et comparée à celle de la VE libre en solution. Pour cela, un dosage des ROS a été réalisé sur une lignée de fibroblastes NIH3T3 comme décrit dans la partie matériels et méthodes, section **I.e.3**. Nous avons étudié l'intensité de fluorescence, proportionnelle à la quantité de ROS, en fonction du temps (**Figure 25**):

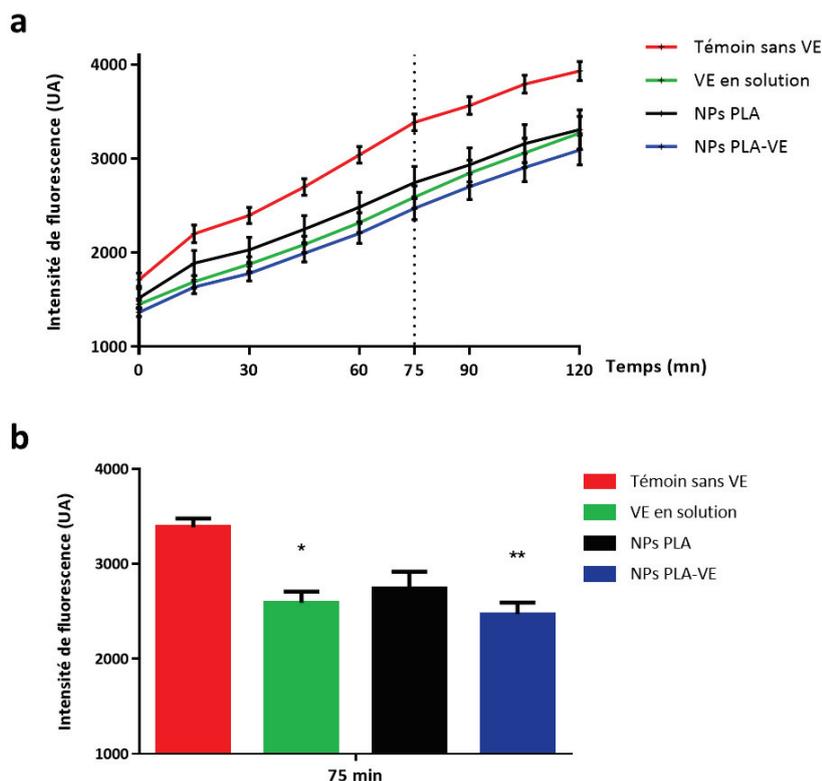


Figure 25 : Dosage des ROS intracellulaire dans les cellules NIH3T3. Les cellules ont été prétraitées pendant 16 h par de la VE en solution (courbe/barre vertes), encapsulée à $2,5 \mu\text{M}$ (courbe/barre bleues) ou par des nanoparticules de PLA nues ($130 \mu\text{g/mL}$) (courbe/barre noires) ou sans traitement (courbe/barre rouges) ($n = 11$). Elles ont ensuite été incubées pendant 2 h en présence de PMA (1 ng/mL). (a) Les résultats sont représentés comme étant la moyenne d'intensité de fluorescence (UA) \pm la SEM. (b) La production de ROS intracellulaire après 75 min de stimulation au PMA a été représentée dans l'histogramme. Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. ** diffère significativement ($P \leq 0.01$), * diffère significativement ($P \leq 0.05$).

L'intensité de fluorescence associée aux cellules prétraitées par de la VE libre, ou encapsulée ou par des NP de PLA nues, est toujours inférieure à l'intensité de fluorescence des cellules témoins également stressées par du PMA mais non traitées (courbe rouge) (**Figure 25**).

Résultat I. Encapsulation de vitamine E dans des NP de PLA et évaluation de leur potentiel *in vitro*

A partir de 60 min de stimulation PMA, l'intensité moyenne de fluorescence des cellules traitées avec des NP de PLA-VE est significativement plus faible que l'intensité moyenne de fluorescence des cellules non traitées ($2206,3 \pm 106,3$ UA vs $3040,7 \pm 88,0$ UA, $P \leq 0.05$). L'intensité moyenne de fluorescence des cellules traitées avec des NP de PLA et de la VE libre ne diffère pas significativement de l'intensité moyenne de fluorescence des cellules non traitées ($2483,2 \pm 157,7$ UA et $2319,5 \pm 106,5$ vs $3040,7 \pm 88,0$ UA, respectivement). Après 75 min de stimulation PMA, la production de ROS intracellulaire est diminuée significativement lorsque les fibroblastes sont prétraités avec de la VE libre ($2590,2 \pm 119,7$ UA) ou des NP de PLA-VE ($2471,7 \pm 121,9$ UA) ($P \leq 0.05$ et $P \leq 0.01$, respectivement) comparé aux cellules non prétraitées ($3386,7 \pm 90,1$ UA) (**Figure 25b**). L'intensité moyenne de fluorescence après prétraitement des fibroblastes avec des NP de PLA reste non significativement différente de celle obtenue avec des cellules non prétraitées. Ensuite, de 90 min à 120 min, seul l'intensité moyenne de fluorescence des fibroblastes traités avec des NP de PLA-VE reste significativement plus faible que l'intensité moyenne de fluorescence des fibroblastes non traités ($P \leq 0.05$).

III. Résumé des résultats I

Nous avons préparé des NP de PLA-VE par nanoprécipitation sans ajout de tensioactifs avec un rendement d'encapsulation moyen de 84% et une taille moyenne de 216 nm. La méthode de nanoprécipitation est appropriée pour encapsuler de la VE car elle n'entraîne pas de modifications significatives des caractéristiques physico-chimiques (taille, I_p et potentiel zêta), comparativement à celles des NP de PLA nues. L'encapsulation de la VE dans NP de PLA améliore la solubilité et la stabilité de la VE. Ainsi, certaines limitations à l'utilisation de la VE libre ont été surmontées par son encapsulation dans les NP de PLA. Les NP de PLA-VE sont stables aux trois températures de stockage étudiées, et cela pendant environ un mois au moins notamment à 4°C, la température de stockage à long terme pour ce type de NP. Nous avons montré qu'elles étaient également stables à 27°C et 37°C, températures proches respectivement de la TA (25°C) et de la température corporelle (37°C).

Le relargage *in vitro* de la VE des NP de PLA-VE dans un système biphasique (eau/hexane) est relargage progressif. Un premier « burst » de 31% de VE libérée des NP de PLA-VE est obtenue en 5 h, suivi d'un plateau jusqu'à 24 h et d'une libération cumulée de 60% en 48 h, cumulant à 75% de VE libérée des NP de PLA-VE avant le troisième jour. Dans un système monophasique à pH acide en présence de Tween, le relargage de VE des NP de PLA-VE est accéléré (« burst »), avec environ 90% de VE libérée en 30 min. Ensuite, on observe une libération cumulée de 94% après 1 h puis un plateau est atteint (jusqu'à 24 h).

La cytotoxicité des NP de PLA-VE à 5 μ M et 10 μ M est analysée avec le test LDH sur des fibroblastes NHDF. Ce test n'a mis en évidence aucune cytotoxicité des NP de PLA-VE, une très faible cytotoxicité est observée avec la VE libre à 5 μ M et 10 μ M et avec des NP de PLA à 300 μ g/mL. L'activité antioxydante de la VE est quant à elle maintenue après encapsulation dans des NP de PLA. La méthode de nanoprécipitation ne modifie donc pas l'activité biologique de la VE. En effet, après 120 min de stimulation avec du PMA, les cellules prétraitées par des NP de PLA-VE ont une diminution significative de 21% de la production de ROS intracellulaires, supérieure à la diminution constatée avec de la VE libre (17%) et des NP de PLA nues (16%).

Résultat I. Encapsulation de vitamine E dans des NP de PLA et évaluation de leur potentiel *in vitro*

Cette étude a montré qu'il est possible d'encapsuler de la VE dans des NP de PLA. Ces systèmes de délivrance sont stables dans le temps et ne présentent pas de cytotoxicité. De plus, ces nanovecteurs permettent de libérer très rapidement de la VE dans la plaie pour diminuer la réponse inflammatoire, notamment en diminuant l'activité oxydante, impliquée dans le processus de cicatrisation.

***Résultat II. Adsorption de FGF2 sur des NP de PLA et
évaluation de leur activité in vitro***

Résultat II. Adsorption de FGF2 sur des NP de PLA et évaluation de leur activité in vitro

Introduction

En raison de leurs multiples fonctions biologiques, les FGFs sont de potentiels « candidat médicaments » susceptibles d'induire la régénération d'un large spectre de tissus, incluant la peau, les vaisseaux sanguins, les muscles, le cartilage... En effet, des études ont évalué les effets positifs de l'administration directe de FGFs dans le lit de la plaie. Cependant, le FGF2 libre en solution est instable en raison de sa sensibilité à la température, au pH, et aux enzymes situées dans la plaie... [98] [99] [100]. Le FGF2 libre a une demi-vie de quelques heures ($\approx 7-8$ heures) dans l'organisme conduisant à une rapide perte d'activité biologique [101]. Ainsi, pour obtenir des effets positifs, une grande quantité de FGF2 doit être administrée en continu. Ainsi, augmenter la stabilité du FGF2 est nécessaire pour une administration efficace de FGF2 dans le traitement des plaies.

Pour améliorer la stabilité du FGF2 dans la plaie, notre stratégie a été de vectoriser le FGF2 par des NP de PLA, ce qui permet une libération prolongée et optimise l'efficacité du traitement en diminuant les doses administrées.

L'objectif principal de la présente étude a donc été de développer une nouvelle formulation à base de FGF2 adsorbé à la surface des NP de PLA. Après synthèse de NP de PLA nues par nanopréciipitation, le FGF2 a été adsorbé par adsorption passive à la surface des NP. Ces formulations ont été caractérisées physico-chimiquement et leur potentiel d'efficacité sur la cicatrisation des plaies a été évalué par des méthodes *in vitro*. Ainsi, la cytotoxicité des NP de PLA-FGF2 et leur action sur la prolifération et la migration cellulaire ont été évaluées sur des fibroblastes issus de cultures primaires et de lignées cellulaires.

I. Matériels et méthodes

a. Adsorption passive du FGF2 à la surface des NP de PLA

La protéine recombinante de souris FGF2 (Cell sciences, CRF021C) diluée dans du tampon trishydroxyméthylaminométhane (TRIS) 20 mM à pH 9 à une concentration théorique de 50 µg/mL, a été ajoutée volume à volume aux NP de PLA nues diluées à 5 mg/mL en eau stérile. La réaction d'adsorption a été incubée sous agitation circulaire pendant 16 h à TA.

b. Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-FGF2

1. Diamètre, indice de polydispersité et potentiel zêta des NP

Identique au protocole décrit dans la partie matériels et méthodes, section **I.b.1**.

2. Efficacité d'adsorption du FGF2 sur les NP

La protéine FGF2 non adsorbée à la surface des NP de PLA a été dosée dans le surnageant des NP de PLA-FGF2, après centrifugation à 16 896 x g pendant 30 min, à l'aide d'un kit micro-BCA (Micro BCA Protein Assay Kit, Thermo scientific, 23235). Une gamme de calibration avec de la protéine FGF2 a été réalisée. L'absorbance des échantillons a été mesurée à 562 nm sur un spectrophotomètre (Thermo Scientific™ Multiskan™ FC). Connaissant la quantité initiale de protéine introduite et la quantité résiduelle, il est alors possible de calculer le rendement d'adsorption (%) et le taux de chargement (mg/g) de FGF2 à la surface des NP de PLA :

a = concentration initiale de FGF2 (g/l)

Dosée par µBCA

b = concentration de FGF2 dans le surnageant (g/l)

Dosée par µBCA

c = concentration de FGF2 adsorbé (g/l)

$$c = a - b$$

d = rendement d'adsorption (%)

$$d = \frac{c \times 100}{a}$$

e = FGF2 adsorbé (mg/g)

$$e = \frac{c \times V_f}{ts \times V_p} \times 100$$

Vf : volume final (mL)

ts : taux de solide (%)

Vp : volume de particules (mL)

f = FGF2 adsorbé (mg/m²)

$$f = \frac{(e \times d \times Dz)}{6000}$$

d : densité du polymère (1,25 dm³/kg)

Dz : diamètre (nm)

c. Tests d'efficacité *in vitro*

1. Etude de cytotoxicité des NP de PLA-FGF2

La cytotoxicité des formulations a été évaluée sur les cellules NHDF et NIH3T3 à l'aide du « Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH) » (Roche, 04 744 934 001). Le protocole est identique au protocole décrit dans la section matériels et méthodes des Résultats I sur les NP de PLA-VE (**I.e.2**). Les cellules sont traitées par 300 µL de milieu de culture (+ 1% SVF, + pyruvate, sans antibiotiques) contenant soit du FGF2 libre à 100 ng/mL, soit des NP de PLA-FGF2 (à la même concentration en FGF2 que le libre) ou des NP de PLA nues à 15 µg/mL pendant 24 h, 48 h et 72 h. Trois expériences indépendantes (N=3, n=3-5) avec les deux cellulaires ont été réalisées.

2. Test de prolifération

Les cellules NIH3T3 et NHDF (3000 cellules/puits) sontensemencées en milieu de culture complet dans des plaques de 96 puits et incubées à 37°C pendant 24 h ou 30 h, respectivement. Après lavage par du PBS 1X, les cellules ont été incubées avec du milieu incomplet (sans antibiotiques, 1% SVF pour les NHDF et 2% SVF pour les NIH 3T3) contenant soit 100 ng/mL de FGF2, soit des NP de PLA-FGF2 à 100 ng/mL de FGF2 ou 15 µg/mL de NP de PLA. Un contrôle avec des cellules non traitées a été effectué. Les cellules traitées ont été incubées pendant 24 h, 48 h, ou 72 h à 37°C avec 5% CO₂. À chaque temps, le milieu de culture a été éliminé et les cellules ont été congelées à -80°C. Après décongélation, l'ADN double brin contenu dans les cellules a été mesuré avec le kit CyQUANT® Cell Prolifération Assay Kit (C7026, Invitrogen). Pour cela, les cellules ont été incubées avec 200 µL de la solution « CyQUANT® GR dye/cell-lysis » pendant 2 min à TA et à l'abri de la lumière. Une gamme de calibration en ADN de bactériophage λ allant de 10 à 1000 ng/mL a été réalisée. La fluorescence a été mesurée à λ ex : 480 nm et λ em : 520 nm à l'aide d'un fluorimètre (Infinite 1100, Tecan). Trois expériences indépendantes (N=3, n=3-5) avec les deux cellulaires ont été réalisées.

3. Test de prolifération et migration : scratch test

Des inserts de culture IBIDI (80209, Biovalley) ont été placés en plaque de 24 puits. Les cellules NIH3T3 et NHDF (15 000 cellules dans 80 μ L de milieu /côté de l'insert) ont étéensemencées en milieu complet (10% de SVF + antibiotiques) jusqu'à confluence (30 h pour les NHDF et 24 h pour les NIH3T3). Après avoir enlevé les inserts, deux lavages ont été effectués avec du milieu complet pour éliminer les débris cellulaires. Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture incomplet (1% et 2% SVF pour les NHDF et NIH3T3, respectivement) contenant du FGF2 libre en solution à 100 ng/mL, des NP de PLA-FGF2 à 100 ng/mL de FGF2, et des NP de PLA nues à 15 μ g/mL et dans des puits non traités servant de contrôle. Des photographies de la plaie ont été prises à T0, 14 h, 24 h et 48 h avec un microscope inverse Nikon Ti E. La largeur de la brèche a été mesurée à l'aide du logiciel Image J. Quatre expériences indépendantes ont été réalisées avec les cellules NIH3T3 (N=4, n=3) et trois expériences indépendantes ont été réalisées avec les cellules NHDF (N=3, n=3-4).

II. Résultats

a. Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-FGF2

Des NP de PLA-FGF2 ont été élaborées par adsorption passive de FGF2 à la surface de NP de PLA préalablement synthétisées par nanopréciptation. Ces NP de PLA-FGF2 ont été caractérisées selon les protocoles décrits dans les sections **I.b.1** et **I.b.2** de la partie matériels et méthodes. Le diamètre, l'Ip et la charge de surface de NP de PLA (n=3) et des NP de PLA-FGF2 (n=5) ont été déterminés par DLS. Le rendement d'adsorption (%), la concentration de FGF2 adsorbé (µg/mL) et le taux de chargement sont résumés dans le **Tableau 7**.

Nom	Diamètre (nm)	Indice de polydispersité	Potentiel zêta (mV)	Rendement d'adsorption (%)	FGF2 adsorbé (µg/mL)	Taux de chargement (FGF2 mg / g de PLA)
NPs de PLA-FGF2	200,7 ± 14,7	0,179 ± 0,064	-49,6 ± 8,4	74,1 ± 7,8	11,4 ± 1,7	4,6 ± 0,7
NPs de PLA	192,6 ± 11,4	0,040 ± 0,030	-57,6 ± 3,0	-	-	-

Tableau 7 : Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-FGF2 et des NP de PLA nues (n=5 et n=3, respectivement). Le diamètre (nm), l'indice de polydispersité et le potentiel zêta (mV) sont obtenus par DLS. Le rendement d'adsorption (%), la concentration en FGF2 adsorbé (µg/mL) et le taux de chargement (mg de FGF2 / g de PLA) sont déterminés par µBCA. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne ± SD de cinq mesures pour les NP de PLA-FGF2 et de 3 mesures pour les NP de PLA nues.

Les NP de PLA-FGF2 produites ont un diamètre moyen de 200,7 ± 14,7 nm, supérieur à celui des NP de PLA nues (192,6 ± 11,6 nm). L'indice de polydispersité moyen des NP de PLA-FGF2 est plus élevée que celui des NP de PLA nues (0,179 ± 0,064 vs 0,040 ± 0,030; respectivement). Les NP sont chargées négativement avec des potentiels zêta semblables, -49,6 ± 8,4 mV pour les NP-VE et -57,6 ± 3,0 mV pour les NP de PLA nues. Cependant les différences observées entre les NP de PLA-FGF2 et NP de PLA nues ne sont pas statistiquement significatives.

La concentration en FGF2 adsorbé à la surface des NP de PLA a été déterminée par µBCA, elle est en moyenne de 11,4 ± 1,7 µg/mL. Le rendement d'adsorption de FGF2 est en moyenne de 74,1 ± 7,8%, avec un taux de chargement moyen de 4,6 ± 0,7%.

b. Tests d'efficacité *in vitro*

Les fibroblastes issus de culture primaire (NHDF) et de lignée (NIH3T3) ont été mis en culture dans du milieu de culture appauvri en SVF contenant soit du FGF2 en solution (100 ng/mL),

Résultat II. Adsorption de FGF2 sur des NP de PLA et évaluation de leur potentiel *in vitro*

soit des NP de PLA-FGF2 (100 ng/mL en FGF2) ou des NP de PLA nues (15 µg/mL). Des tests ont été réalisés pour évaluer la cytotoxicité, la prolifération, et la migration/prolifération.

1. Etude de cytotoxicité des NP de PLA-FGF2

La cytotoxicité du FGF2 libre, des NP de PLA et des NP de PLA-FGF2 a été évaluée à l'aide du test LDH sur des cellules NHDF durant 72 h (**Figure 26**). Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les pourcentages de cytotoxicité des cellules traitées, avec du FGF2 libre, ou avec des NP de PLA ou des NP de PLA-FGF2 et celui des cellules témoins NT. Par conséquent, ni le FGF2 libre, ni les NP de PLA avec ou sans FGF2 n'induisent de cytotoxicité dans les cellules NHDF. Des résultats similaires ont été observés sur la lignée de fibroblastes NIH3T3, ceux-ci sont présentés dans la **Figure 37** en annexe.

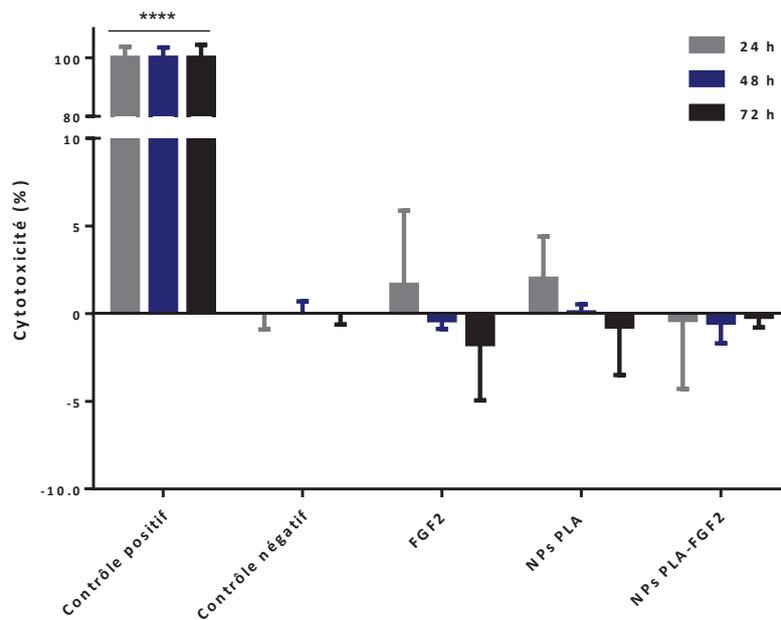


Figure 26 : Effet cytotoxique du FGF2 (100 ng/mL), des NP de PLA nues (15 µg/mL) et des NP de PLA-FGF2 (100 ng/mL en FGF2) sur des fibroblastes NHDF. Les résultats sont exprimés comme le pourcentage de cytotoxicité. Les résultats sont représentés comme étant la moyenne \pm la SD ($N=3$, Contrôle positif $n=3-4$, Contrôle négatif, FGF2, NP de PLA et NP de PLA-FGF2 $n=5$). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. Les différences significatives sont représentées par rapport à la condition témoin NT, **** diffère très significativement ($P \leq 0.0001$).

2. Test de prolifération

Après 24 h, 48 h et 72 h d'incubation avec du FGF2 libre, ou des NP de PLA, ou des NP de PLA-FGF2, l'ADN des cellules NIH3T3 et NHDF a été quantifié (**Figure 27**).

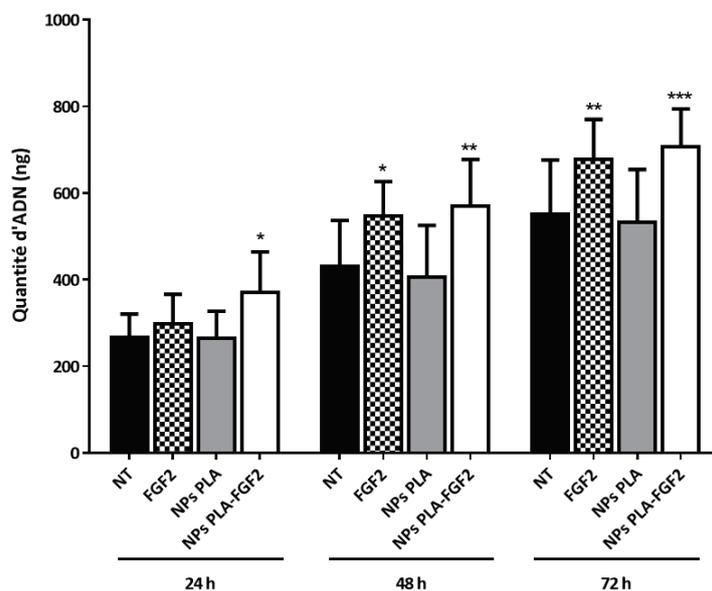


Figure 27 : Effet du FGF2 (100 ng/mL), des NP de PLA nues (15 µg/mL) et des NP de PLA-FGF2 (100 ng/mL en FGF2) sur la prolifération des fibroblastes NIH3T3. Les résultats sont exprimés en fonction de la quantité d'ADN (ng) contenue dans les cellules. Les résultats sont représentés comme étant la moyenne \pm la SD ($N=3$, NT et NP de PLA $n=4$, FGF2 $n=3-4$, NP de PLA-FGF2 $n=3-5$). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. Les différences significatives sont représentées par rapport au condition NT, *** diffère significativement ($P \leq 0.001$), ** diffère significativement ($P \leq 0.01$), * diffère significativement ($P \leq 0.05$).

Les NP de PLA-FGF2 ont un effet stimulant significatif sur la prolifération aux trois temps d'incubation comparativement aux cellules NT. Après 24 h, 48 h et 72 h d'incubation, les quantités moyennes d'ADN en présence de NP de PLA-FGF2 sont respectivement de $370,3 \pm 94,0$ ng ; $569,6 \pm 107,9$ ng ; $707,0 \pm 87,3$ ng comparées à celles des cellules NT qui sont de $266,9 \pm 53,7$ ng ; $431,4 \pm 105,3$ ng ou $551,6 \pm 124,9$ ng respectivement. Le FGF2 libre quant à lui induit une augmentation significativement plus élevée de la quantité d'ADN uniquement dans les cellules NT après 48 h et 72 h d'incubation ($547,7 \pm 79,0$ ng et $678,0 \pm 92,0$ ng vs $431,4 \pm 105,3$ ng et $551,6 \pm 124,9$ ng respectivement), alors que les NP de PLA nues n'ont aucun effet.

Résultat II. Adsorption de FGF2 sur des NP de PLA et évaluation de leur potentiel *in vitro*

Ce même test réalisé sur des cellules NHDF, a montré une augmentation significative de la quantité d'ADN après 72 h de traitement par des NP de PLA-FGF2 ou du FGF2 libre comparativement aux cellules NT ($349,1 \pm 88,1$ ng et $343,2 \pm 123,1$ ng respectivement vs $150,1 \pm 39,1$ ng ; $P \leq 0.0001$). Ces résultats sont présentés en annexe (**Figure 38**).

3. Test de prolifération et migration : scratch test

Les effets du FGF2 libre, des NP de PLA nues ou des NP de PLA-FGF2 sur la migration et prolifération des fibroblastes NHDF ont été déterminés par leur capacité d'induire la fermeture d'une « plaie » *in vitro*. La fermeture de la plaie sur une couche de fibroblastes confluente a été suivie par microscopie pendant 38 h (Figure 28).

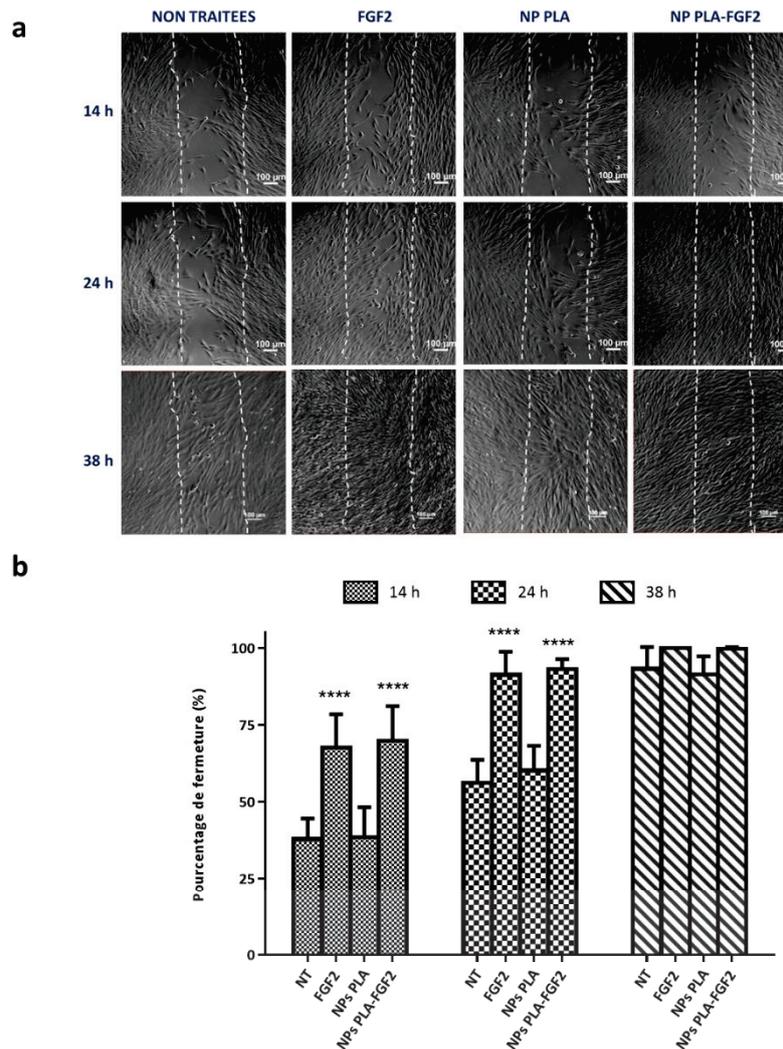


Figure 28 : Effet du FGF2 (100 ng/mL), des NP de PLA nues (15 µg/mL) et des NP de PLA-FGF2 (100 ng/mL en FGF2) sur la migration et la prolifération des fibroblastes NHDF. (a) observations microscopiques après 14 h, 24 h et 38 h de traitements, (b) Les résultats sont exprimés comme le pourcentage de fermeture par rapport à la surface de la plaie initiale. Les résultats sont représentés comme étant la moyenne ± la SD (N=3, n=3-4). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. Les différences significatives sont représentées par rapport au condition NT, **** diffère très significativement ($P \leq 0.0001$).

Résultat II. Adsorption de FGF2 sur des NP de PLA et évaluation de leur potentiel *in vitro*

Les résultats présentés ci-dessus représentent la moyenne de 11 mesures issues de trois expériences indépendantes.

Après 14 h de traitement, les pourcentages moyens de fermeture de la plaie en présence de FGF2 libre et de NP de PLA-FGF2 sont similaires, de l'ordre de $67,7 \pm 10,7\%$ et de $70,0 \pm 11,2\%$, respectivement. Ces traitements induisent une fermeture significativement plus rapide de la plaie que celle observée sur des fibroblastes non traités ($37,9 \pm 6,7\%$, $P \leq 0.0001$), alors que les NP de PLA nues n'ont aucun effet.

De même après 24 h de traitement, les pourcentages moyens de fermeture de la plaie en présence de FGF2 libre et de NP de PLA-FGF2 sont semblables et induisent une accélération significative de la fermeture de la plaie comparée aux fibroblastes NT ($91,4 \pm 7,5\%$ et $93,1 \pm 3,3\%$ respectivement *vs* $56,2 \pm 7,5\%$, $P \leq 0.0001$) alors que les NP de PLA nues sont sans effet.

Pour finir, après 38 h de traitement, les % moyens de fermeture sont identiques en présence de FGF2 libre et de NP de PLA-FGF2 et de l'ordre de 100% ($100,0 \pm 0,0\%$ et $99,9 \pm 0,5\%$, respectivement), alors que les fibroblastes NT ou traités avec des NP nues ont des profils de fermeture plus ralenti avec des pourcentages moyens de fermeture respectifs de $93,3 \pm 7,1\%$ et de $91,4 \pm 5,6\%$.

Sur toute la durée de l'étude, aucune différence significative n'a été observée entre les pourcentages de fermeture des « plaies », obtenus après traitements avec du FGF2 libre ou avec du FGF2 adsorbé à la surface des NP. Ces résultats ont été reproduits sur la lignée de fibroblastes NIH3T3, les résultats sont présentés de manière succincte dans la **Figure 39** en annexe.

III. Résumé des résultats II

Nous avons préparé des NP de PLA-FGF2 par adsorption passive de FGF2 sur les NP de PLA préalablement synthétisées par nanopréciipitation. Ces NP de PLA-FGF2 ont un diamètre moyen de 201 nm, avec un rendement d'adsorption moyen de FGF2 de 74% correspondant à une concentration de FGF2 adsorbé de 11 µg/mL. L'indice de polydispersité des NP de PLA-FGF2 est de 0,18, il traduit une homogénéité en terme de taille dans le lot de NP.

Les NP de PLA-FGF2 à la concentration en FGF2 de 100 ng/mL n'ont aucune cytotoxicité vis-à-vis de fibroblastes NHDF et NIH3T3 (test LDH).

L'activité biologique du FGF2 n'est pas inhibée par l'adsorption de la molécule sur des NP de PLA. En effet, la capacité des fibroblastes à proliférer est augmentée significativement en présence des NP de PLA-FGF2 pendant 72 h comparées aux cellules non traitées. De même, la capacité du FGF2 d'induire la migration et prolifération cellulaire est aussi conservée lorsque celui-ci est adsorbé sur des NP de PLA.

Cette étude a montré qu'il est possible d'adsorber du FGF2 à la surface des NP de PLA sans modifier son activité biologique. Ce système de délivrance ne présente pas de cytotoxicité. Ce nanovecteur permet de stimuler la prolifération et la migration des fibroblastes, ce qui pourrait avoir comme effet d'accélérer la phase de prolifération du processus de cicatrisation.

***Résultat III. Développement de modèles expérimentaux
de plaies cutanées profondes pour l'étude in vivo de la
cicatrisation***

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux de plaies cutanées profondes pour l'étude in vivo de la cicatrisation

Introduction

Cette tâche a pour objectif de mettre en place plusieurs types de plaies cutanées profondes afin de pouvoir tester l'efficacité des NP de PLA fonctionnalisées, développées dans ce projet. Si la plaie d'excision représente le cas le plus fréquent de plaie cutanée, avec divers degrés de gravité (profondeur, surface de l'atteinte, atteinte osseuse...), la brûlure, qui lui est souvent associée, engendre des plaies souvent gravissimes et très destructrices des différentes couches de la peau, dont la réparation nécessitera souvent des greffes.

Dans ce contexte, deux modèles de plaies cutanées profondes ont été développés, sur souris SKH1 immunocompétente et sans poils. Cette souche de souris présente un avantage majeur car il n'est pas nécessaire de dépiler les animaux avec des crèmes dépilatoires pouvant engendrer des réactions physiologiques non contrôlées. Le modèle de plaie d'excision décrit par Galiano *et al.* (2004) a été adapté pour cette souche de souris [102]. Un protocole de brûlure thermique du 3^{ème} degré, décrit par Stevens *et al.* (1994) a également été adapté, sur la souris SKH1 [103]. La caractérisation de la brûlure thermique et son évolution vers un stade de 3^{ème} degré ont été documentées par suivi histologique et par analyse de la microcirculation sanguine cutanée. Le développement du modèle de brûlure thermique de 3^{ème} degré sur la souche SKH1 a été rédigé sous forme d'un article scientifique, soumis au journal *Wound Repair and Regeneration* comme Technical article (Article 1).

Pour pallier le fait que la souris saine a tendance à cicatriser spontanément sans traitement quelconque, un terrain diabétique entravant les processus de réparation-reconstruction tissulaire est opportun et pertinent pour tester l'efficacité de nos « NP fonctionnalisées » dans des conditions stringentes. La souris SKH1 n'est pas spontanément diabétique, il faut donc provoquer l'apparition de diabète. Il y a plusieurs manières d'induire un diabète expérimental. Selon la technique utilisée et/ou le protocole suivi, on induira un diabète de type 1 ou de type 2

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

[104] [105]. La première technique consiste à soumettre les animaux à un régime alimentaire hypercalorique riche en glucose, voire leur administrer du glucose pur *per os* (1 à 2 g/kg poids). L'hyperglycémie induite est transitoire (pas de dommages pancréatiques) et semble plus aléatoire que l'hyperglycémie chimiquement induite (42). Pour l'induction chimique expérimentale, l'injection, par voie IP, d'une dose unique et massive de streptozotocine (STZ, 150 à 200 mg/kg de poids pour une souris de 20-25 g) entraîne la destruction des cellules pancréatiques et induit un diabète de type 1, avec une hyperglycémie permanente, alors que des injections multiples de faibles doses (40-50 mg/kg) induisent des diabètes de type 2, même si la physiopathologie de ces diabètes n'est pas strictement analogue à celle des diabètes humains de type 1 et 2. La susceptibilité des rongeurs à la STZ semble varier selon les espèces, les souches et l'âge des animaux. La STZ est tumorigène, mais sa stabilité est supérieure à celle de l'alloxane (15 mn), elle provoque peu de cétooses létales et induit des hyperglycémies stables et durables. Nous avons donc utilisé la streptozotocine pour induire un diabète permanent chez des souris SKH1. Le processus de cicatrisation de ces deux modèles de plaies sur souris SKH1 saines et diabétiques a été caractérisé par un suivi macroscopique, microscopique et par analyse d'expression génique. La fonctionnalité du tissu en cours de cicatrisation et reconstruit a été évaluée par analyse physiologique de la microcirculation sanguine. Ces travaux ont donné lieu à la rédaction d'un deuxième article pour soumission au *Journal of Investigative Dermatology* (Article 2).

Article n°1 “Characterization and quantitative evaluation of wound healing on an experimental hairless mouse model of third degree skin burn injury”

L'objectif de notre travail a été de développer et de caractériser un modèle expérimental de brûlure thermique de 3^{ème} degré. Les souris SKH1 sans poils et immunocompétentes ont été soumises à une brûlure thermique, à l'aide d'une barre en laiton chauffée à 100 °C, pendant 3, 5, 10, 15, 20 et 25 secondes. Des échantillons de la zone brûlée ont été prélevés pour analyse histologique. Des colorations comme l'hématoxyline-éosine-safran et le trichrome de Masson Goldner ont été effectuées pour déterminer la profondeur et la progression de la brûlure dans la peau. La fermeture de la plaie, la réaction inflammatoire, la réépithélialisation de la peau et le remodelage de la matrice ont été examinés au fil du temps par des études macroscopiques et microscopiques après une brûlure de 3^{ème} degré provoquée par l'application du plot en laiton pendant une durée de 5 sec. Dans le but de compléter les observations histologiques sur la néoangiogenèse, la fonctionnalité des tissus brûlés en cours de cicatrisation a été testée par mesure du flux sanguin cutané par « laser speckle contrast analysis ». Nos résultats ont démontré qu'une durée d'application du plot de 3 secondes permet d'obtenir une brûlure cutanée de 3^{ème} degré. Deux heures après la brûlure, ces lésions impliquaient toutes les couches de la peau, en particulier l'hypoderme et après 72 heures, la couche de muscle intradermique était modifiée. Une brûlure de 3^{ème} degré a été observée après tous les temps d'application mentionnés ci-dessus, mais le niveau de gravité augmentait avec la durée. Pour la suite des études, le processus de cicatrisation a été caractérisé après induction d'une brûlure par application du plot sur la peau pendant 5 secondes. Ainsi, 7 jours après la brûlure les analyses histologiques ont révélé une réaction inflammatoire élevée, qui diminue dans le temps mais reste toujours plus élevée que dans les peaux témoins, jusqu'à 16 jours, après brûlure. Une réépithélialisation complète a été observée 14 jours après brûlure et après 16 jours, le tissu cicatrisé se trouve dans un stade de granulation tardif. La perfusion sanguine cutanée de la zone brûlée était considérablement diminuée entre les jours 1 et 3 après brûlure mais complètement restaurée à partir du 7^{ème} jour après brûlure. Nous décrivons dans cet article un modèle expérimental de brûlure thermique de 3^{ème} degré, reproductible et facile à mettre en œuvre pour évaluer de nouvelles thérapies de brûlures.

TECHNICAL ARTICLE

Characterization and quantitative evaluation of wound healing on an experimental hairless mouse model of third degree skin burn injury

Berthet-Clair M, PhD^{1,4}, Orea V, BSc¹, Pagnon-Minot A, PhD², Fromy B, PhD¹, Sigauco-Roussel D, PhD¹, Verrier B, PhD^{1,*}, Gauthier Y, PhD^{3,4,*}

¹Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique (LBTI), UMR 5305, Université Lyon1, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), Lyon, France.

²Novotec, Zac du Chêne- Europarc 11 rue Edison, Bron, France.

³Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Département des Maladies Infectieuses, Brétigny-sur-Orge, France.

*co-last authors

⁴These authors contributed equally to this work.

Corresponding authors: Berthet Morgane, LBTI UMR 5305-CNRS, UCBL, IBCP, Lyon, France.

E-mail : mberthet@ibcp.fr

Tel : +33(0)4-72-72-26-74

Fax: +33(0)4-72-72-26-04

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

ABSTRACT

The aim of experimental wound models is to mimic human wound healing for predicting therapeutic outcomes. The objective of our work was to characterize and quantitatively evaluate a third degree skin burn injury in a reliable experimental model. Hairless and immunocompetent SKH1mice were subjected to burn with a brass bar heated at 100°C for 3 to 25 sec. Skin samples from the burned area were taken at intervals after injury for histological analysis. Specific stainings were performed for determining the depth and progression of burn into skin layers. Our results demonstrated that a heat burn duration as low as 3 sec allowed to obtain a third degree thermal burn. Two hours after injury, the lesions involved all skin layers, particularly the hypodermis, and after 3 days the intradermal muscle layer was altered. The severity level increased with burn duration. Inflammation, skin reepithelialization, and matrix remodeling were monitored over time by histological and imaging studies after a burn duration of 5 sec that induced reproducible burn injuries. After a 5 sec burn, the healing process was characterized after 7 days by a high inflammatory reaction that decreased over time but stayed always higher than basal inflammation of control skin. A complete reepithelialization was achieved after 14 days, and at day 16 the healed tissue was in a late granulation tissue stage. In the aim of at once supplementing histological observations of neo-angiogenesis and testing functionality of healing burned tissues, the microvascular blood flow was measured over time using the laser speckle contrast analysis. The microvascular blood perfusion of the burned area decreased significantly between days 1 and 3, and started restoration at day 7. We describe a safe, reproducible, easy to implement experimental burn model to evaluate new therapies of burn injuries.

ECM: Extracellular Matrix

HES: Hematoxylin-Eosin-Saffron

MTG: Masson's Trichrome Goldner

Dx: Day x after burn injury

INTRODUCTION

Thermal injuries are a predominant worldwide burden, at social and financial levels, and are a matter of great concern to intensive care and burn unit centers. Despite advances in therapy, such as quick debridement and skin grafting, as well as the use of new generation antibiotics and topical administration of antimicrobials, infections remain leading causes of morbidity and mortality in burned patients (1). Burns are commonly classified according to the following grading scale: Ist degree (epidermal damage), superficial IInd degree (injury of the epidermis and papillary dermis), deep IInd degree (injury of the epidermis and reticular dermis) and IIIrd degree (full skin thickness burns).

The reconstruction of a functional skin after burn remains a huge challenge due to the complexity of both the pathophysiological events in burn wound and the physiological mechanisms controlling the healing process (2) (3). To investigate the therapeutic efficacy of new products on wound healing, it is necessary to develop easy to use and standardized experimental burn wounds models, allowing highly reproducible observations and the measurement of accurate data on wound healing. Despite various differences between animals and humans, the pig skin is anatomically and physiologically more similar to human skin than rodents skin (4) (5) (6). Furthermore, human and pig skin wounds mainly repair and close through a reepithelialization process (7). Consequently, because it resembles human skin, pig skin is an excellent animal model to study wound healing. Nevertheless, studies involving pigs are expensive and this animal is not easy to handle and need adapted facilities. As a result, the most striking limitation on the use of pigs is that large experimental groups are usually not possible and repeating the experiments is difficult.

The rodents are the most largely used animals for wound repair studies. The mouse skin is mobile and covered all over the body with hair. Its epidermis and dermis are thin, and a muscle, the *panniculus carnosus*, is present under the dermis. Moreover, the wound contraction is largely part of the wound closure process, while in humans, wound closure occurs mainly through granulation tissue formation and reepithelialization (6). Nevertheless, experimental artifices allow for new tissue formation observation in rodents. Despite all these drawbacks rodents remain a model of choice due to low prices, easy handling and easy housing and maintenance. They allow studies on large numbers of animals, leading to more reliable results compared with very small groups of animals used in the pig model. Furthermore, several transgenic mice models are available for studying the role of genes involved in the healing process (8) (9) (10). Existing pathological mice models, such as diabetes, can also be used for the study of impaired and delayed wound healing (9).

Various studies report thermal burn protocols, such as boiling hot water (11), flamed ethanol (12), gas flame (13) or heated bar (14) that have been used as referent models for many years. Protocols of 3rd degree heat burn wounds on hairless mice were established that remain rather delicate to organize and are not safely for experimenters. The benefits of using the outbred SKH1 hairless mouse are

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

multiple, the skin is ready to manipulate, unpigmented and the strain is immunocompetent compared to other hairless mouse strains that are immunosuppressed (Nude, e.g. the BALB/c-nude athymic mouse) (15). Hair removal associated inflammatory responses due to shave, depilatory cream or wax used with hair mice are avoided and the absence of hair regrowth does not obscure the skin regeneration (15) (16). The wound healing process of this strain under physiological or pathological conditions (ischemia, diabetes) is identical to that of haired mice (15). Furthermore, despite a relatively uncharacterized genetic background, the outbred status of this strain can be seen as an advantage for therapeutic studies.

In the present study, we describe the strategy developed to obtain a third degree skin burn on SKH1 mice with an easy standardized protocol. The burn wound healing is then characterized and evaluated by histological observations and by skin blood perfusion measures.

MATERIALS AND METHODS

Animals and ethical considerations

All experiments involving animals have been conducted in compliance with the guidelines of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS # 123), and followed the principles of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the US National Research Council (17). The animal procedures have been approved by both our institutional scientific board and by the I.B.C.P.'s institutional Animal Care and Use committee (# IBCP_2015_002). Female outbred SKH1 hairless mice were purchased from Charles River Laboratories France (69592, l'Arbresle, France) as SKH1-Elite mice (CrI:SKH1-Hrhr, strain code 477) and were used at 8 weeks of age (20-25 g). Animals were housed in ventilated cabins at a controlled room temperature of 22 ± 2 °C with a $50 \pm 10\%$ hygrometry. They received sterilized water and standard laboratory mouse food *ad libitum*.

General anesthesia, analgesia and euthanasia

Mice were anesthetized with an intra-peritoneal injection of ketamine (100 mg/kg, Imalgene 500®, Merial, France) and Xylazine (10 mg/kg, Rompun® 2%, Bayer, France). As anesthesia induced between two to three hours immobilization, mice were kept in ventral position on a controlled temperature heating mat until awakening to prevent hypothermia. Pain management of burn injury was as follows: subcutaneous analgesic injection of Buprenorphin (0.05 mg/kg, Buprecare®, Axience SAS, France), was made after anesthesia, and analgesia was continued for three days after burn infliction. Animals were checked every day for wound appearance, clinical signs of illness and morbidity. Body weight was recorded at intervals and a loss greater than 20% of initial weight and/or critical signs of pain or distress (hunched appearance, endless lethargy and immobility) were considered as endpoints

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

and led to animal euthanasia. At designed time points after injury, mice were killed by an intracardiac injection of an overdose of sodium pentobarbital (60 mg/kg, Ceva santé animale SA, la ballastiere, France), prior to taking of skin samples for histological analysis.

Thermal burn injury

Burn wounds were inflicted with the following developed device (**Fig. 1a**): Brass bars with a cylindrical head of 8 mm of diameter, weighing 21.11 ± 0.04 g ($n = 13$), (manufactured by LSPG society, Montbonnot Saint Martin, France) were heated up to 100°C in a dry bath (DRYTEMP, Dominique Dutscher SAS, France, 582010) filled with steel beads (Dominique Dutscher SAS, France, 582001). The temperature was monitored with a digital thermometer (CHECKTEMP 1, Dominique Dutscher SAS, France, 052026B). After sedation achievement, the skin was disinfected with a 70% isopropyl alcohol pad. Location of unilateral burn was marked on the dorsal surface with a surgical skin marker with the wound center located at 3.5 cm cranial from the tail head and 1 cm lateral from the spinal column. The mouse was positioned on the left back side to obtain a flat surface. The heated brass bar was held in vertical position, perpendicularly to the skin surface, under the only effect of its own weight, for either 3 or 5, 10, 15, 20 or 25 sec (14) (18). For every additional 5 seconds contact, the bar was removed after the first 5 seconds and a new heated bar was applied for another 5 sec, and so forth, to maintain the desired temperature. Immediately after injury, 0.1 ml of sterile saline was subcutaneously administrated under the site of burn. Mice were analgesized for three days after injury as described above. At D4 post burn, a surgical debridement of the wound was made with a microsurgical knife (**Fig. 1b**) (Microsurgical Knife, 15deg, 3mm blade, 13.5, 500249, World Precision Instruments, Sarasota, FL), on animals under anesthesia and analgesia. Donut-shaped splints (10 mm inner diameter and 18 mm outer diameter) made from a 0.5 mm thick silicone sheet (Folioxane® silicon sheet, FU050M, NOVATECH SA, La Ciotat, France) were placed around the wound and stuck with a silicone adhesive glue (Kwik-Sil, World Precision Instruments). Four interrupted sutures (4-0 mersilene™ polyester fiber sutures, Ethicon L.L.C, Cornelia, GA) were made to reinforce the fixation and to prevent local skin contraction. The entire wound area including the surrounding silicone ring was covered with a sterile transparent dressing (Tegaderm™, Nexcare, 3M Health Care, St. Paul, MN). Mice were kept on a temperature controlled heating mat until they recovered fully from anesthesia. At day 6 post burn, all silicone rings were removed from all mice to avoid the disrupting of blood perfusion measurement.

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

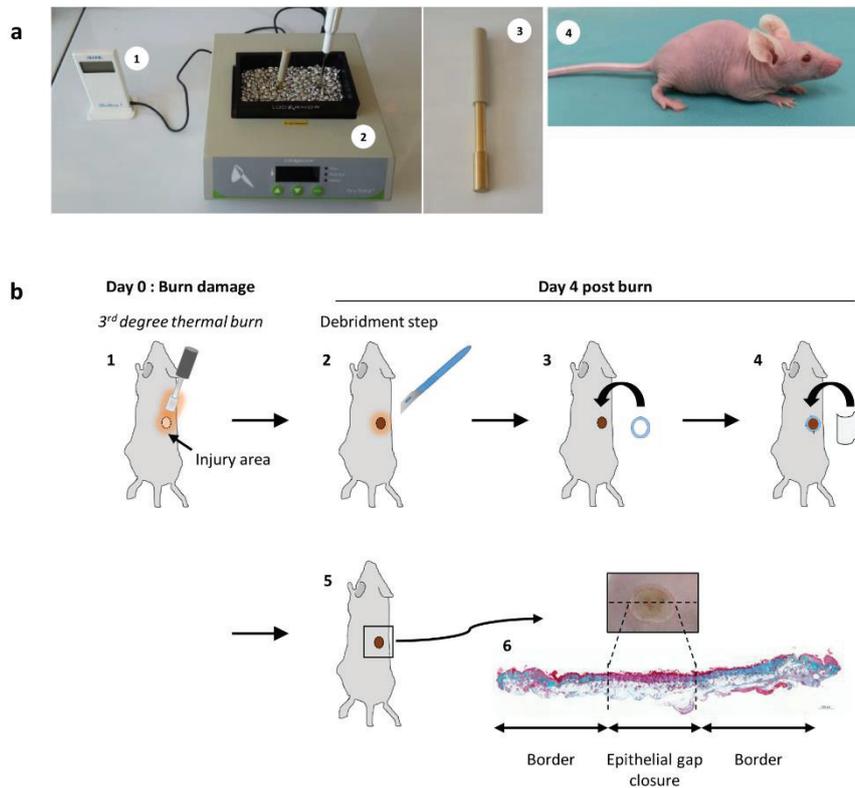


Figure 1. Experimental design of third degree thermal burn injury in hairless SKH1 mouse.

(a) Devices. A 8 mm Ø brass bar (3) was used to create thermal skin injury in SKH1 hairless mouse (4). The brass bar was heated to 100°C in a digital thermometer (1) monitored dry bath (2). (b) Schematic representation of burn study. (1) A heated brass bar is used to create the wound on the right mouse dorsum. At day 4 post burn, (2) a surgical debridement step was performed with a microsurgical knife, then (3) a silicone splint was centered on the wound and fixed with adhesive glue and (4) with four interrupted sutures and finally covered with a transparent dressing. (5) At the desired time mice were euthanatized and the entire wound with skin margins were excised and collected for (6) histological investigations.

Wound area assessment

The wounds were photographed (Pentax digital camera K-r with a Pentax 100 Macro WR lens, C.R.Kennedy & Co., Victoria, Australia) at days 0, 4, 6, 8, 10, 14 and 16 after burn. Time for completing closure was defined as the time necessary to observe a fully closed wound bed with new tissue. The extent of wound closure was estimated at intervals by measuring the wound area using image analysis software (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

The percentage of wound closure at each time points was calculated according to the given equation:

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

$$\text{Wound closure (\%)} = \frac{(\text{Wound area on day 4} - \text{Wound area on day "x"})}{(\text{Wound area on day 4})} \times 100$$

A wound was considered totally closed when the percentage of wound closure is equal to 100%.

Histological observations

At D0_{2h}, D1, D2, D3 post burn for all burn durations and at D7, D14, D16 after a 5 sec burn, mice were killed and the entire wound with skin margins was excised with a surgical scissors and collected for histological analysis of burn (**Fig. 1c**). Healthy tissue was also excised to obtain control skin samples. All tissues were fixed for 24h at 4 °C in freshly prepared cold 4% paraformaldehyde in PBS 1X and then dehydrated in ethanol, acetone and xylene, and embedded into paraffin. 5 µm thick slices were made using a microtome (MM 350 s FINESSE E, ThermoFisher) and were stained with either Hematoxylin-Eosin-Saffron (HES) or Masson's Trichrome Goldner (MTG) stainings for highlighting cells, extracellular matrix, collagen fibers and neovascularization respectively. Photos of stained samples were taken with a Leica DM2000 microscope and computerized with a digital camera managed by acquisition Leica Application Suite version 4 image software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Observations were made by two independent histologists. Criteria for evaluating the degree of burn extension were defined according to the "Société Française d'Etude et de Traitement des Brûlures" statements (www.sfetb.org). A semi quantitative evaluation of tissular integrity of epidermis and dermis, and the inflammatory reaction in both healed and healthy tissues were performed and based on a scoring according to the scales detailed in **Table 1**. The relative synthesis of ECM, the relative density of fibroblasts/myofibroblasts and neovessels were evaluated to determine the wound healing stage (hemostasis, inflammation, granulation tissue, remodeling).

Score	Tissular integrity of epidermis	Tissular integrity of dermis
0	Absence of epidermis	Absence of dermis
1	Incomplete re-epithelialization	Presence of granulation tissue: +++ blood vessels and +++ fibroblasts/myofibroblasts, - ECM synthesis
2	Complete reepithelialization with thick and non organized epidermis	Early remodeling stage: ++ blood vessels and ++ fibroblasts/myofibroblasts, + thin ECM synthesis
3	Complete reepithelialization with thick and organized epidermis	Late remodeling stage: + blood vessels and ++ fibroblasts/myofibroblasts, ++/+++ thin ECM synthesis
4	Complete reepithelialization with thin and organized epidermis	Normal : + blood vessels and + fibroblasts/myofibroblasts, thick ECM synthesis
Score	Inflammatory reaction	
0	Absence of inflammatory reaction	
1-6	Limited	
7-12	Reduced	
13-18	Marked	
19-24	Severe	

Table 1. Histological score of tissular integrity and inflammatory reaction.

Tissular morphology of epidermis and dermis was evaluated at D0 before burn and at D7, D14 and D16 post burn by histological analyses with HES staining of wound sections. The epidermal and dermal tissular integrity

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

were scored according to the following scale: from 0 absence of epidermis or dermis, to 4 complete reepithelialization with thin and organized epidermis or normal dermis.

Inflammatory response at D0 before burn and at D7, D14 and D16 post burn was evaluated by histological analyses with HES stainings of wound sections. The inflammatory reaction was evaluated from 0 (absence) to 19-24 (severe) through the density and nature of inflammatory cells (polynuclears, lymphocytes, macrophages, giant cells).

Assessment of skin perfusion

At D0 before burn and at D1, D2, D3, D4, D7, D10 and D14 after burn injury each mouse underwent inhalation anesthesia in side position. A blood perfusion imager based on Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA) technology was performed with the PeriCam PSI Normal Resolution (Perimed, Sweden) (19). When the skin temperature was stable, at around 35 ± 0.5 °C, skin blood flow measure was performed. Laser wavelength was 785 nm and measurement area was 12 cm². Contrast images were processed to produce a scaled color-coded live flux image (red equaled high perfusion and blue equaled low perfusion), which correlated with the blood flow velocity in the tissue. Blood perfusion was expressed in arbitrary Perfusion Units (PU). Data were analyzed with signal processing PimSoft version 1.5 software (Perimed, Sweden). Two regions of interest (ROI) were defined: a control skin near the burned zone and the current wound area. At each time point, the mean perfusion in each ROI was calculated on 1 min recording time. The results have been represented according to the given equation: Ratio of blood flow = $\frac{\text{Blood flow of burned ROI (PU)}}{\text{Blood flow of control ROI (PU)}}$

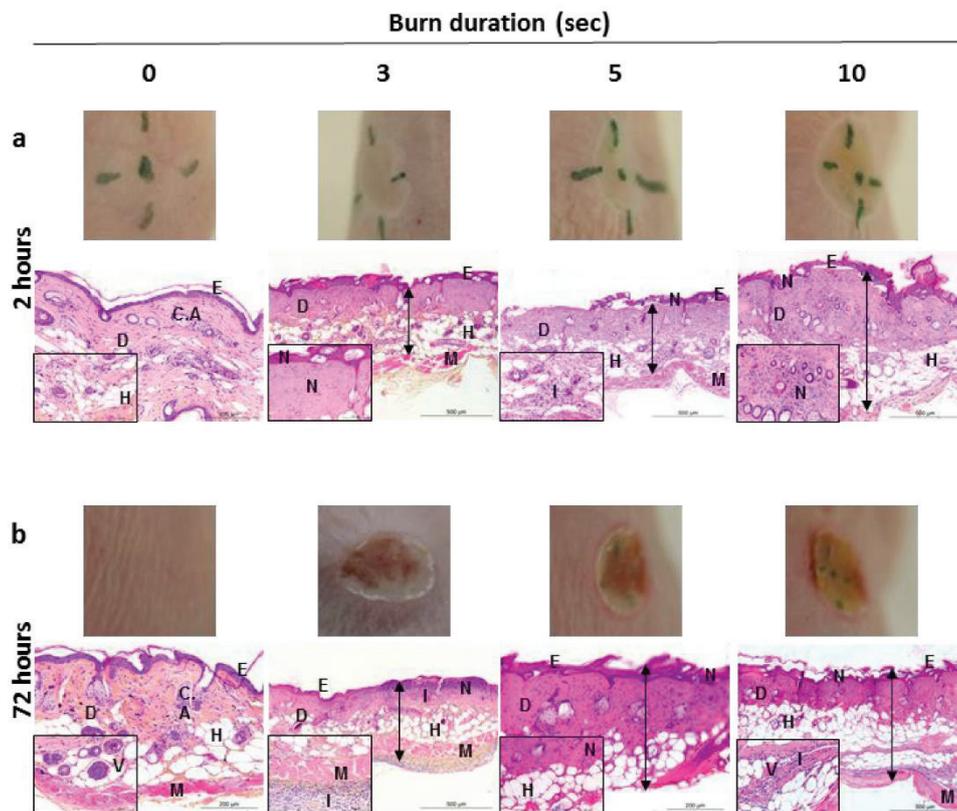
Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) in graphs and bar charts. All graphs and analyses were performed using GraphPad Prism Version 6.07 for Windows (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA). Differences in the wound sizes were evaluated using a paired two-tailed t-test. Regarding data from the wound closure, the blood flow measures and the histological scores of inflammatory responses, the differences were analyzed using a One-way ANOVA with Bonferroni's post-test. Differences in the histological scores of either the tissular integrity, the relative synthesis of ECM or the relative density of fibroblasts/myofibroblasts and neovessels were calculated using a Two-way ANOVA with Bonferroni's post-test. Data were considered significantly different if *p* values were inferior to 0.05. *P* values appear in the legends of figures where applicable.

RESULTS

Macroscopic evaluation of burn wound after application of a heated brass bar

For each burn duration from 3 to 25 sec, four injuries were created on four different mice. A tissue ischemia appeared straight after heated brass bar application. The burn areas were circular and homogeneous in size with a ± 8 mm diameter (*ie* 50.24 mm²). Within two hours after injury (D0_{2h}) 3 and 5 sec burns resulted in circular and pale wounds (Fig. 2a). After a ten seconds burn duration, burns were circular with a well-marked margin in a yellow brown color appearing instantaneously at the time of injury (*idem* for 15, 20, 25 sec / data not shown). A gradual coloration of wounds was observed over the time between D1 and D3 post injury for each burn duration (Fig. 2b). For any injury at any time, no blister was observed. In all cases, the wound shape was modified at D3 and a wound contraction was observed.



Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

Fig 2. Depth of thermal burn injury: Induced macroscopic evolution and modifications at the histological level.

Skin burn injury was induced as described in § Material and Methods. Briefly, a brass bar heated at 100°C was laid on the back of mice for different times, ranging from 3 to 10 seconds. At various times after injury skin samples were removed from the back of killed mice and treated for histological observation. The samples were formalin fixed and embedded into paraffin. Then, 5 µm thick slices were colored with HES as described in § Material and Methods. (a) Histological and macroscopic aspects of mouse skin two hours after burn injury. (b) Histological and macroscopic aspects of mouse skin three days after burn injury (n=4). E : epidermis, D : dermis, H : hypodermis, C.A : cutaneous annexe, I : inflammation, N : necrosis, M : muscle, V : vessel, black arrow : depth of burn.

Histological study of skin burn wound

Two hours after a 3 sec burn injury, the skin presented a necrotic epidermis and a dermal inflammation with a degraded ECM (**Fig. 2a**). Alterations of cutaneous appendages, hypodermis with inter-adipocytes septa fibrosis and moderate inflammation were also observed. Three days after burn, the epidermis was necrotic; the inflammatory reaction was significant into the dermis and the cutaneous appendages were deteriorated. The fibrillary matrix into the hypodermis was degraded and blood vessels were very dilated and deteriorated. The muscular bundles were inflammatory and degraded (**Fig. 2b**). Two hours after a 5 seconds burn, the epidermis was necrotic and sometimes teared off from the cutaneous surface (**Fig. 2a and Fig. 3a**). The papillary and reticular dermis presented a coagulated ECM with cellular debris and no blood vessels. Few macrophages and polynuclears around altered hair follicles were present into the hypodermis. Twenty-four hours after burn, the epidermis and the dermis were necrotic (**Fig. 3b**). Large quantities of cellular debris and an alteration of vascular integrity were observed in the ECM. The hypodermal and muscular layers were modified through an important inflammation reaction which remained over time, with dilated and hemorrhagic blood vessels and the presence of circulating polynuclears. At D2 and D3 the histological modifications remained the same, but the inflammation was increased, particularly into the dermis with numerous macrophages and polynuclears at the interface of the reticular dermis and hypodermis (**Fig. 3c**). The hypodermis was characterized by a degraded ECM with dilated and hemorrhagic blood vessels. Numerous polynuclears were infiltrated between muscle fibers, and dilated blood vessels (**Fig. 2b and Fig. 3d**). Similar tissular alterations were observed two hours or three days after a 10 sec burn duration (**Fig. 2a/b**). Burn durations of 15, 20 and 25 sec (data not shown), led to huge and deep modifications of skin with intensive and extensive necrosis. According to these observations, despite a 3 sec burn could induce a 3rd degree burn, a burn duration of 5 sec was used for all following experiments on wound healing to ensure reproducible burns.

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

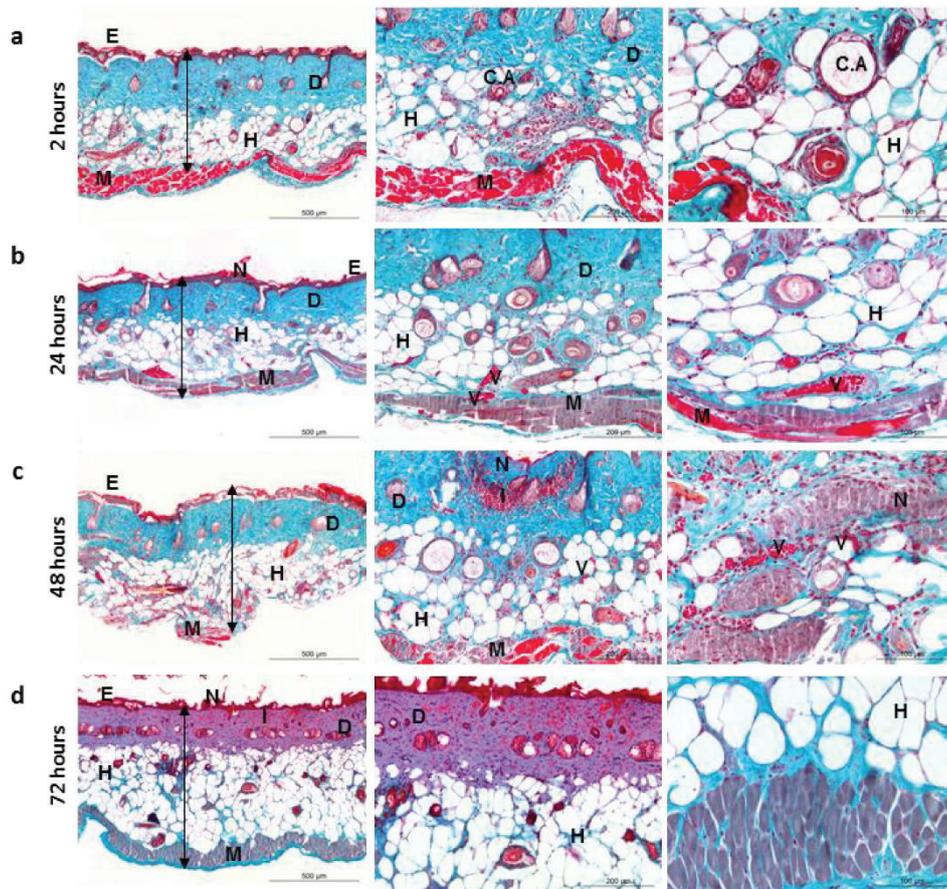


Figure 3. Microscopic modifications of burned mouse skin during the first three days following thermal injury.

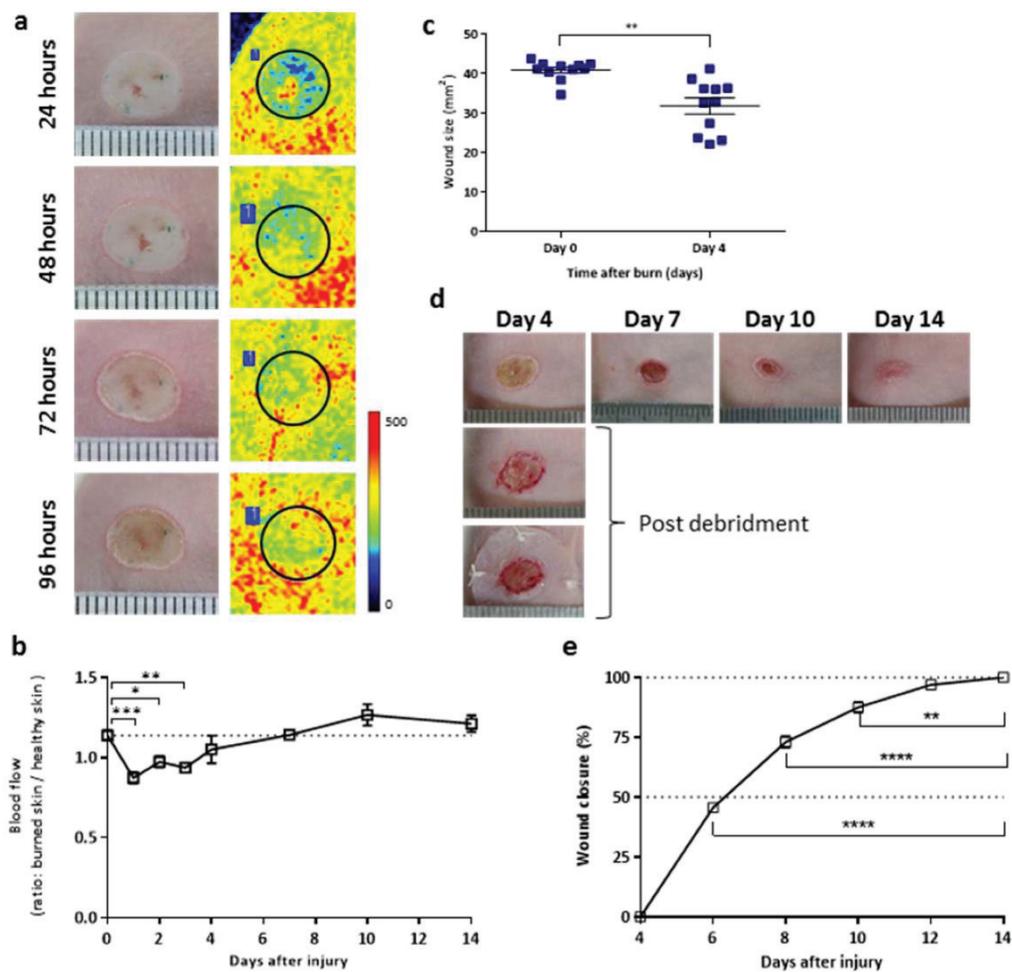
A third degree burn injury was induced by heated brass bar application on the back of mice for 5 seconds. Skin samples were removed and treated as described above (Fig. 2). A MTG coloration was performed as described in § Material and Methods for histological analysis after two hours (a), one days (b), two days (c) and three days (d) after injury (n=4). E : epidermis, D : dermis, H : hypodermis, C.A : cutaneous annexe, I : inflammation, N : necrosis, M : muscle, V : vessel, black arrow : depth of burn.

Macroscopic evaluation of a third degree burn wound healing process.

After a skin burn duration of 5 sec, the average wound size at D0_{2h} was 40.90 mm² (34.70 mm² minimum to, 43.81 mm² maximum / SEM, 0.74 / n=11). Immediately after injury the wound had a pale appearance, then the skin reddened in the periphery of the burn after 24h. At D4 after burn, a burn eschar was observed and the average wound size was significantly decreased to 31.89 mm² ($p = 0.0028$, **Fig. 4c**). A bleeding area was also observed after removal of the devitalized tissue (**Fig. 4d**).

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

Wound size is a commonly used parameter for wound closure follow up. The kinetics of closure of a 5 sec skin burn wound, was studied using skin surface photos (Fig. 4d) analyzed by ImageJ software at time intervals after wounding (n=8) (Fig. 4e). As shown on figure 4e, a 100% wound closure was observed at D14 post burn injury. At D6, D8 and D10 post burn (two, four and six days respectively after the surgical debridement step) the wound closures were $45.65\% \pm 1.57$, $73.01\% \pm 2.48$ and $87.53\% \pm 2.15$ respectively. All these percentages of closure were significantly different from the D14 complete closure (D6 and D8 $p < 0.0001$, D10 $p < 0.01$) and from D6 to D12 they increased significantly (D6 < D8 $p < 0.001$, D8 < D10 $p < 0.0001$ and D10 < D12 $p < 0.01$). Finally, after twelve days the wounds were healed at $96.96\% \pm 0.90$, which was not significantly different from the D14 percentage of closure.



12

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

Figure 4. Macroscopic and laser speckle perfusion images modifications of a burned mouse skin.

A third degree burn injury was induced by 5 sec heated brass bar application on the back of mice. (a) Laser speckle contrast images of blood flow and their corresponding macroscopic photos during the first 4 days following thermal injury. The color scale illustrates variations in perfusion from maximum (red) to minimum (blue), PU, arbitrary perfusion units. $n = 4-11$. (b) Quantification of blood flow in burned skin over a time course of 14 days. The ratio of the burned skin area blood flow to the adjacent healthy skin blood flow was calculated. $n = 3-19$. Black asterisks indicate a significant difference between the ratio of blood flow before wound ($n = 8$) and after wound over time (D1-D2-D3 $n = 11$, D4 $n = 4$, D7 $n = 19$, D10 $n = 3$, D14 $n = 8$). Data as mean \pm SEM, $n = 3-19$, significance levels were set at $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. (c) The wound size (mm^2) was measured at D0_{2h} and at D4 after burn. Black asterisks indicate a significant difference between the wound size at D0_{2h} and at D4 post burn. Data are given as mean \pm SEM, $n = 11$. Significance levels were set at $**p < 0.01$. (d) Representative images of wound closure in SKH1 mice after third thermal burn injury. Ruler units are in mm. (e) Wound closure over time was expressed as a percentage of final total wound closure. Kinetics of wound closure were represented as function of time (days after injury). Black asterisks indicate a significant difference between the closure at day 14 (complete wound closure) and the closure at previous days. Data as mean \pm SEM, $n=8$, significance levels were set at $**p < 0.01$, $****p < 0.0001$.

Blood perfusion follow up in healing skin burn wounds

The pathophysiological modifications of skin induced by a 5 sec thermal injury was also evidenced by the reduction in blood flow, resulting from severe damages to blood vessels. The results of blood perfusion measures were represented with perfusion images (**Fig. 4a**). At D1 post burn, the perfusion images showed a blue circular area that corresponded to the burn on the picture. The blood perfusion at D1 post burn was significantly lower than at day 0 before injury ($183.7 \text{ PU} \pm 7.4$ vs $261.7 \text{ PU} \pm 8.6$ at day 0). The blue area progressively decreased and turned to a yellow area between D1 and D4. Blood flow analysis confirmed a significant reduction in blood flow at D1 with a ratio (blood flow of burned ROI/blood flow of control ROI) of 0.873 ± 0.036 vs 1.138 ± 0.032 before the D0 burn ($p < 0.001$). The damage to microvascularization into the injured dermis was still evident at days 2 and 3 after burn, with blood flows significantly lower than control flow (0.973 ± 0.036 , $p < 0.05$ and 0.936 ± 0.031 , $p < 0.01$ respectively vs 1.138 ± 0.032). Nevertheless, a progressive increase in blood flow was observed from D3-D4 to D10 post injury, and then the flow value did plateau. (**Fig. 4b**).

Histological analysis of skin burn wound healing

The wound healing process was characterized on a third degree skin burn induced by a 5 sec application of a heated brass bar.

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

The inflammatory response to the 3rd degree heat burn.

The inflammatory reaction in the burn area has been analyzed by histological observations based on the presence of inflammatory cells (macrophages, polynuclears and, lymphocytes) that are morphologically distinguishable after HES staining. At D7 post burn (3 days after surgical debridement) the inflammatory response was significantly increased compared to control skin, as shown by an increased number of macrophages and polynuclears ($12,750 \pm 0,25$ vs 4.25 ± 0.48 , $p < 0.0001$) (**Fig. 5a and Fig. 6a**). After 14 days of healing, the inflammatory reaction did not decreased significantly (10.50 ± 0.87) compared to D7, with a similar inflammatory cell population in the scar tissue (**Fig. 6b**). Between D14 and D16 post burn, no significant differences appeared, and the inflammation stayed constant with an inflammation score of 8.67 ± 0.67 (**Fig. 6c**). However, at these days the inflammation was significantly more important than skin control (D0 vs D14 $p < 0.001$ and D0 vs D16 $p < 0.01$).

Reepithelialization.

In the non-burned control skin, the epidermis layer was thin and organized. At D7 post burn (3 days after surgical debridement), the reepithelialization of the burned skin was not complete, as shown by the presence of necrotic hypodermis and by the keratinocyte migration from the wound edges (**Fig. 5a**). After 14 days of healing, the scar tissue was covered with a thick and non-organized neo-epidermis (**Fig. 5b**). The tissular integrity score of this neo-epidermis was significantly lower (2.00 ± 0.00) than control skin epidermis (4.00 ± 0.00) ($p < 0.0001$, **Fig. 6b**). After 16 days, the neo-epidermis was thick with an organized structure but the integrity score (3.33 ± 0.33) remained still lower than skin control epidermis ($p < 0.05$, **Fig. 5c, Fig. 6b**). However, it was significantly increased compared with score at D14 ($p < 0.01$).

Remodeling.

Dermal integrity score takes into account the synthesis of ECM, the density of fibroblasts/myofibroblasts and neovessels which are key parameters of wound healing stages. At the kinetic point of view, at D7 post burn (3 days after surgical debridement), the burn area showed no scar tissue but a necrotic, inflammatory and sometimes hemorrhagic zone and was covered by a thick fibrin scab (**Fig. 5a**). After 14 days of healing, a scar tissue was observed with limited neosynthesis of collagen (1.00 ± 0.00 , $p < 0.0001$) and a significant increase of fibroblasts/myofibroblasts density (4.00 ± 0.00 , $p < 0.0001$) compared to control skin (**Fig. 5b, Fig. 6d/e**). After 16 days of healing, the matrix remodeling was incomplete as suggested by the limited cohesion between epidermis and dermis (**Fig. 5c**) and by the histological score of ECM synthesis that remained significantly lower than in skin control (1.33 ± 0.33 vs 4.00 ± 0.00 , $p < 0.0001$) (**Fig. 6d**). No significant differences in the relative ECM synthesis were observed between D14 and D16 (1.00 ± 0.00 and 1.33 ± 0.33 ; respectively) (**Fig. 6d**). The relative density of fibroblasts/myofibroblasts was significantly decreased at D16 compared

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

to control skin (1.33 ± 0.33 and 2.00 ± 0.00 ; respectively, $p < 0.05$, **Fig. 6e**) and the neoangiogenesis was significantly increased between D14 and D16 (2.00 ± 0.41 and 3.00 ± 0.58 ; respectively, $p < 0.01$) and compared with D7 ($p < 0.0001$, **Fig. 6f**). According to these observations, the healed tissue was in a late granulation stage, *i.e.* the remodeling was initiated but was significantly incomplete compared to control skin as shown by the dermal integrity score (2.00 ± 0.00 vs 4.00 ± 0.00 , $p < 0.0001$, **Fig. 6e**).

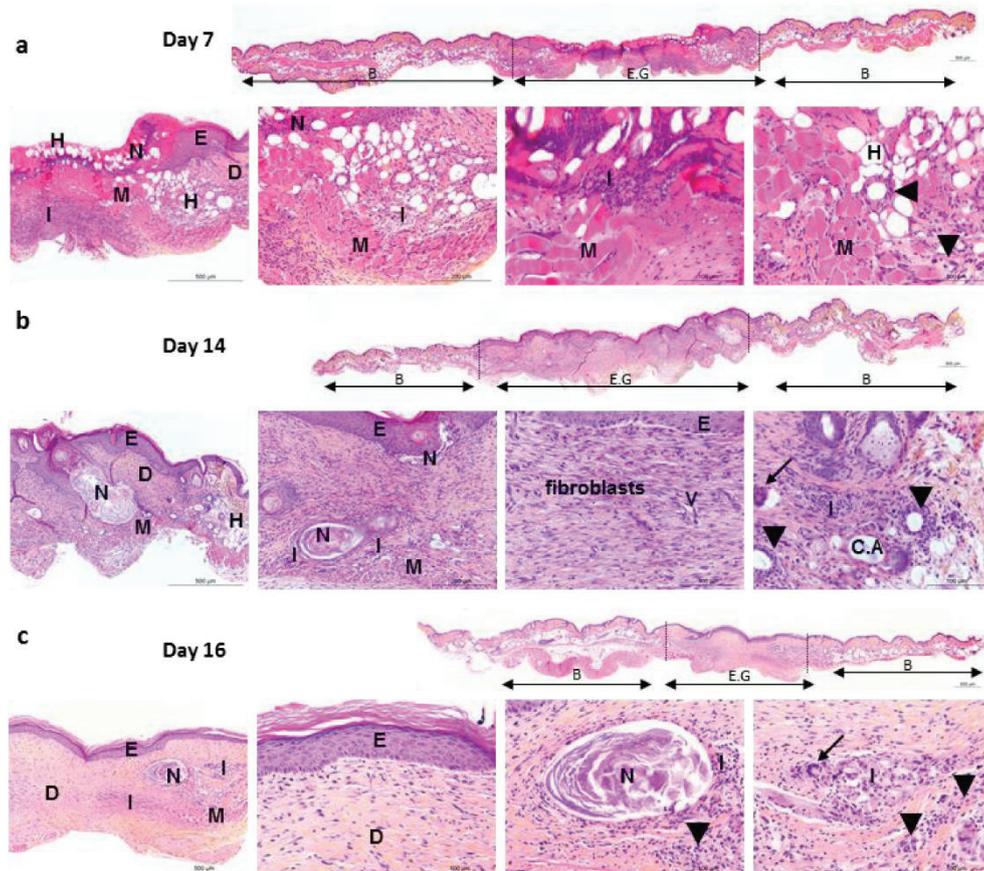


Figure 5. Histological modifications of wounds over time after a 5 sec of burn duration.

Representative images of HES stainings of burned skin at different times, D7 (a), D14 (b) and D16 post burn (c). $n = 3-4$. The entire area with the epithelial gap and associated rims were represented. Black arrows indicate giant cells and black triangles show macrophages. E : epidermis, D : dermis, H : hypodermis, C.A : cutaneous annexe, I : inflammation, N : necrosis, M : muscle, V : vessel.

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

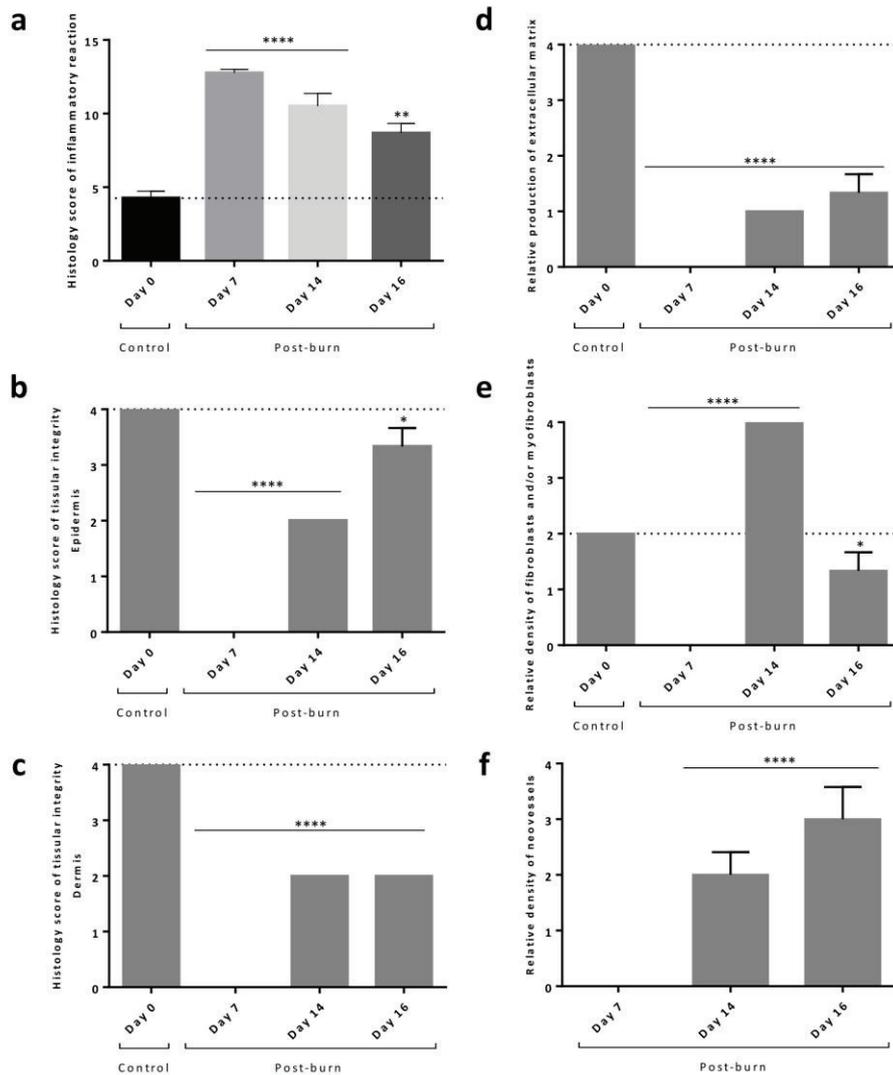


Figure 6. Histological scoring data from 0, 7, 14 and 16 days post-burn wounds.

Histological scoring data from 0 to 16 days wounds. Third-degree thermal burns were created by application of a heated brass bar during 5 sec. Inflammatory reaction (a), epidermis (b) and dermis (c) tissular integrity were evaluated. The dermis tissular integrity (c) was calculated from the relative production of ECM (d), the relative density of fibroblasts and/or myofibroblasts (e) and neovessels (f). Black asterisks indicate a significant difference between the control skin score at D0 (before burn) and the tissue scores at the following days, except for the relative density of neovessels where the black asterisks indicate a significant difference between the skin

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

at D7 and at D14, D16. Data as mean \pm SEM, D0 n = 4, D7 n = 4, D14 n = 4 and D16 n = 3, significance levels were set at *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001.

DISCUSSION

The primary goal of this study was to develop an experimental model of a third degree thermal skin burn in the SKH1 hairless mouse for evaluating the biological effects of new therapeutic agents. There are currently no models of wound healing in the rodent species that adequately reflect the mechanisms by which humans heal wounds. One of the major barriers in extrapolating experimental findings to humans is that, owing to ethical and financial constraints, researchers rarely utilize large animal models like pigs that are more clinically relevant. Therefore, observations gleaned from studies with small animals such as mice, will help to identify novel treatment strategies that may be translated into the clinical scenario. We must bear in mind the difference between human and mice wound process, but this protocol on mice can be used as “first protocol” to validate the efficacy of therapeutic drugs before to perform this burn protocol on pigs which are expensive and not easy to handle and need adapted facilities. As mentioned in the rodent excisional wound healing model the contraction is the major mechanism of wound closure, leading to rapid closure of defects (6). However, to minimize skin contraction and allow wound healing through granulation and re-epithelialization process, a splinting ring can be fixed to the skin around the wound (20) (21) (22). The maintenance of splint has already shown the reproducibility of wound sizes (23). In addition, the wound healing process of this hairless strain under physiological or pathological conditions (ischemia, diabetes) is identical to that of haired mice (15). Furthermore, despite a relatively uncharacterized genetic background, the outbred status of this strain can be seen as an advantage for therapeutic studies. Various protocols have been described in the literature, and the brass bar heated in a dry bath is a good alternative to the boiling water or the flamed alcohol burn approaches. The brass has a high thermal capacity and the heat transfer by conduction is efficient. In addition to be safe for experimenters, this method allows to create uniform burn wounds, in shape and size, contrary to the metal bar heated in water bath that transfers smears of boiling water on the skin. In published studies using the mouse, either a double or a single pre-heated brass block was used at different temperatures ranging from 92°C to 180°C, with a time of burn duration that varied from 5 sec to 60 sec (14) (18) (24) (25) (26) (27). In the aim of standardizing the third degree burn wound protocol on the hairless SKH1 mouse model, we tested different times of burn duration, ranging from 3 sec to 25 sec, with a brass bar heated at 100°C in a dry bath. In order to induce reproducible effects, the metal bar was applied on the skin using gravity only, *i.e.* that the pressure on the skin resulted from the weight of the bar only (mean weigh 21.1 g). Indeed, some studies have shown that the intensity of the applied pressure may affect the depth and extent of the burn (28). Our histological observations based on HES staining showed that a 3 sec burn resulted within two

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

hours in a full-thickness burn involving the entire dermis and subcutaneous tissue with moderate inflammation. The extent of tissue necrosis and inflammatory reaction increased when the contact duration between the heated brass bar and the skin was increased. Contact durations of 5 sec and 10 sec resulted in the involvement of the entire dermis and hypodermis with significant inflammation. It was also shown that a progressive tissue damage, for all times of burn duration, took place between D0_{2h} and D3 post burn. As evidenced by histological studies in human burned patients (29) (30) (31) (32) and in animal burn models such as pigs (31) burn is a dynamic process that peaks at about 3 days post injury. As observations after burn durations of 5 and 10 sec were similar, and to make sure of obtaining more reproducible effects than with a too short time (3 sec), the healing process was characterized using a burn duration of 5 sec. The pale coloration of the burn area observed straight after burn was correlated with tissue ischemia and consequently with the loss of blood perfusion. The progressive yellow/ brown coloration of the skin observed from day 0 to day 4 was correlated with the eschar formation. We underline that our model is based on clinical care guidelines for the management of third degree burn wound in humans. Indeed, at D4 post burn we made a surgical debridement which consists in the removal of the necrotic tissue by excision. As mentioned in various studies using murine models, the best way of preventing post-burn deleterious inflammatory responses is early burn wound debridement (33) (34). Indeed, it has been demonstrated in rats that the main pro-inflammatory cytokines at D5 after burn were significantly lower in rats subjected to surgical debridement 24 hours after burn than in rats without debridement (33). Similar results have been obtained in mice (34). These, and our, observations illustrate the benefit of prompt eschar excision after burn. Nevertheless, based on the above observations that burn is a progressive pathology that peaks 3 days after injury, we decided to make debridement at D4 rather D1 to avoid leaving some excess damaged tissue in the wound. It was difficult to correlate our results on wound closure of an experimental 3rd degree skin burn with published studies using mice models, because most of them did not mention surgical debridement. In our study, the wound was completely closed after 14 days of healing (ten days post debridement), whereas in a published study of a deep second degree burn in mice, without debridement, the wound was not yet closed after 14 days post burn (35). Even though histological analysis is frequently considered as the 'gold standard' of burn depth assessment, this investigation technique has some limitations, as i) the observed structural damages may not systematically be associated with a loss of tissular functionalities and ii) the progressivity of damages due to burn wound makes interpretations of early biopsies difficult (36). Due to the close relationship between burn depth and dermal blood flow, the skin blood perfusion is used to strengthen histological analysis (29). Our results on microvascular functionalities showed a significant decrease of blood flow in the deep dermal burn during the first three days after burn compared to blood flow in the unburned skin. Despite a dilated and hemorrhagic appearance of blood vessels between D1 and D3 post burn, as shown by

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

histological observations, there was a loss of microvascular functionality highlighted by a significant decrease of the blood flow that suggested vascular damages. The blood flow consistently stayed below baseline values until D4 post burn and recovered values of the healthy skin (D0) at D7 post burn. These results are corroborated by observations from Langer et al. (37) who showed that the venular as well as the arterial blood flow increased immediately after burn injury, decreased after 1 day and reached baseline values at D3. In the present study, some of our observations based on HES staining 7 days after burn demonstrated the establishment of a neo-epidermis, as shown by the migration of keratinocytes from the edges of the wound. As mentioned in histological studies (hematoxylin and eosin) from Galiano and al., wound contraction is markedly reduced by silicone rings, and the wound cavity fills with granulation tissue and a migratory epidermis (21). Moreover, Davidson et al. also demonstrated the importance of splinting strategies to overcome confounding wound contraction using histological studies (22). At end point of this study (D16), the wound healing process was in a late granulation tissue stage and the inflammatory reaction was still significantly important in the healed tissue. These histological results suggested a wound closure process through granulation tissue formation and reepithelialization as in humans.

CONCLUSION

Our study establishes a robust model of third degree thermal skin burn in the hairless and immunocompetent SKH1 mouse. After a burn duration of 5 sec, microvascular damages were evidenced by morphological alterations of vessels and a loss of blood perfusion from D1 to D3 post injury. Furthermore, it was shown that after 16 days, the healed tissue was still inflammatory and in an early remodeling stage. In summary, our burn model provides semi-quantitative assessment of the dynamic of microcirculatory and morphological disturbances induced by thermal burn. Moreover, due to improved experimental characteristics such as mouse characteristics or easy topical application of therapeutic agents directly into the wound bed, our model will allow more accurate and reliable studies of burn pathology and healing. In conclusion, our study differs from other published mouse contact burn models because it gathers together several improvements: 1) The advantage of the hairless and immunocompetent SKH1 mouse over all other models generally used for burn studies that are either immunosuppressed (nude) or haired (C57BL/6) needing depilation with uncontrolled effects. 2) The advantage of using a dry bath that allows reproducible burn areas, in shape and size, because of the absence of smears of boiling water, 3) Furthermore, it is a safely model for experimenters.

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to acknowledge the NOVOTEC company for histological services and analysis, with special thanks to Aurélie Nallet who conscientiously performed most of histological preparations and observations. Finally, we thank Britany Guillaumin for technical assistance.

Source of Funding: M.B is supported by a doctoral fellowship from Direction Générale de l'Armement (DGA). B.V and Y.G are supported by a grant from an ANR ASTRID (ANR-14-ASTR-0030).

Author Contributions: MB and YG conceived and designed the study. MB, YG, VO and A P-M performed the experiments. MB, YG, VO, A P-M, BF, BV, DS-R analysed the data. MB and YG wrote the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

REFERENCES

1. Murray CK. Infections in burns. *The Journal of trauma*. 2007;62(6 Suppl):S73. doi: 10.1097/TA.0b013e318065af1a. PubMed PMID: 17556989.
2. Jackson DM. [The diagnosis of the depth of burning]. *The British journal of surgery*. 1953;40(164):588-96. PubMed PMID: 13059343.
3. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453(7193):314-21. doi: 10.1038/nature07039. PubMed PMID: 18480812.
4. Gaines C, Poranki D, Du W, Clark RA, Van Dyke M. Development of a porcine deep partial thickness burn model. *Burns*. 2013;39(2):311-9. doi: 10.1016/j.burns.2012.06.011. PubMed PMID: 22981797.
5. Middelkoop E, van den Bogaerdt AJ, Lamme EN, Hoekstra MJ, Brandsma K, Ulrich MM. Porcine wound models for skin substitution and burn treatment. *Biomaterials*. 2004;25(9):1559-67. PubMed PMID: 14697858.
6. Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011:969618. doi: 10.1155/2011/969618. PubMed PMID: 21151647; PubMed Central PMCID: PMC2995912.
7. Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2001;9(2):66-76. PubMed PMID: 11350644.
8. Grose R, Werner S. Wound healing studies in transgenic and knockout mice. A review. *Methods in molecular medicine*. 2003;78:191-216. doi: 10.1385/1-59259-332-1:191. PubMed PMID: 12825272.

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

9. Fang RC, Mustoe TA. Animal models of wound healing: utility in transgenic mice. *Journal of biomaterials science Polymer edition*. 2008;19(8):989-1005. doi: 10.1163/156856208784909327. PubMed PMID: 18644226.
10. David M. Ansell, Kirsty A. Holden, Hardman MJ. Animal models of wound repair: Are they cutting it? *Experimental Dermatology: Viewpoint*. 2012;21:581–5.
11. Rumbaugh KP, Hamood AN, Griswold JA. Cytokine induction by the *P. aeruginosa* quorum sensing system during thermal injury. *The Journal of surgical research*. 2004;116(1):137-44. PubMed PMID: 14732360.
12. Neely AN, Hoover DL, Holder IA, Cross AS. Circulating levels of tumour necrosis factor, interleukin 6 and proteolytic activity in a murine model of burn and infection. *Burns*. 1996;22(7):524-30. PubMed PMID: 8909752.
13. Katakura T, Yoshida T, Kobayashi M, Herndon DN, Suzuki F. Immunological control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in an immunodeficient murine model of thermal injuries. *Clinical and experimental immunology*. 2005;142(3):419-25. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02944.x. PubMed PMID: 16297152; PubMed Central PMCID: PMC1809536.
14. Dai T, Kharkwal GB, Tanaka M, Huang YY, Bil de Arce VJ, Hamblin MR. Animal models of external traumatic wound infections. *Virulence*. 2011;2(4):296-315. PubMed PMID: 21701256; PubMed Central PMCID: PMC3173676.
15. Benavides F, Oberyszyn TM, VanBuskirk AM, Reeve VE, Kusewitt DF. The hairless mouse in skin research. *J Dermatol Sci*. 2009;53(1):10-8. doi: 10.1016/j.jdermsci.2008.08.012. PubMed PMID: 18938063; PubMed Central PMCID: PMC2646590.
16. Konger RL, Derr-Yellin E, Hojati D, Lutz C, Sundberg JP. Comparison of the acute ultraviolet photoresponse in congenic albino hairless C57BL/6J mice relative to outbred SKH1 hairless mice. *Experimental dermatology*. 2016;25(9):688-93. doi: 10.1111/exd.13034. PubMed PMID: 27095432; PubMed Central PMCID: PMC5002239.
17. NRC. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. In: Press NA, editor. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. 8th ed. Washington (DC)2011.
18. Lambrechts SA, Demidova TN, Aalders MC, Hasan T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2005;4(7):503-9. doi: 10.1039/b502125a. PubMed PMID: 15986057; PubMed Central PMCID: PMC3071043.
19. Roustit M, Cracowski JL. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation*. 2012;19(1):47-64. doi: 10.1111/j.1549-8719.2011.00129.x. PubMed PMID: 21883640.

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

20. Wang X, Ge J, Tredget EE, Wu Y. The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. *Nature protocols*. 2013;8(2):302-9. doi: 10.1038/nprot.2013.002. PubMed PMID: 23329003.
21. Galiano RD, Michaels Jt, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2004;12(4):485-92. doi: 10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x. PubMed PMID: 15260814.
22. Davidson JM, Yu F, Opalenik SR. Splinting Strategies to Overcome Confounding Wound Contraction in Experimental Animal Models. *Advances in wound care*. 2013;2(4):142-8. doi: 10.1089/wound.2012.0424. PubMed PMID: 24527337; PubMed Central PMCID: PMC3656626.
23. Park SA, Covert J, Teixeira L, Motta MJ, DeRemer SL, Abbott NL, et al. Importance of defining experimental conditions in a mouse excisional wound model. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2015;23(2):251-61. doi: 10.1111/wrr.12272. PubMed PMID: 25703258.
24. Krausz AE, Adler BL, Landriscina A, Rosen JM, Musaev T, Nosanchuk JD, et al. Biafine topical emulsion accelerates excisional and burn wound healing in mice. *Archives of dermatological research*. 2015;307(7):583-94. doi: 10.1007/s00403-015-1559-x. PubMed PMID: 25794496.
25. Huang L, Dai T, Xuan Y, Tegos GP, Hamblin MR. Synergistic combination of chitosan acetate with nanoparticle silver as a topical antimicrobial: efficacy against bacterial burn infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(7):3432-8. doi: 10.1128/AAC.01803-10. PubMed PMID: 21502618; PubMed Central PMCID: PMC3122390.
26. Chu CY, Peng FC, Chiu YF, Lee HC, Chen CW, Wei JC, et al. Nanohybrids of silver particles immobilized on silicate platelet for infected wound healing. *PloS one*. 2012;7(6):e38360. doi: 10.1371/journal.pone.0038360. PubMed PMID: 22693632; PubMed Central PMCID: PMC3367909.
27. Stevens EJ, Ryan CM, Friedberg JS, Barnhill RL, Yarmush ML, Tompkins RG. A quantitative model of invasive *Pseudomonas* infection in burn injury. *The Journal of burn care & rehabilitation*. 1994;15(3):232-5. PubMed PMID: 8056812.
28. Singer AJ, Taira BR, Anderson R, McClain SA, Rosenberg L. Does pressure matter in creating burns in a porcine model? *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association*. 2010;31(4):646-51. doi: 10.1097/BCR.0b013e3181e4ca73. PubMed PMID: 20616654.
29. Monstrey S, Hoeksema H, Verbelen J, Pirayesh A, Blondeel P. Assessment of burn depth and burn wound healing potential. *Burns*. 2008;34(6):761-9. doi: 10.1016/j.burns.2008.01.009. PubMed PMID: 18511202.
30. Evers LH, Bhavsar D, Mailander P. The biology of burn injury. *Experimental dermatology*. 2010;19(9):777-83. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01105.x. PubMed PMID: 20629737.

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

31. Papp A, Kiraly K, Harma M, Lahtinen T, Uusaro A, Alhava E. The progression of burn depth in experimental burns: a histological and methodological study. *Burns*. 2004;30(7):684-90. doi: 10.1016/j.burns.2004.03.021. PubMed PMID: 15475143.
32. Watts AM, Tyler MP, Perry ME, Roberts AH, McGrouther DA. Burn depth and its histological measurement. *Burns*. 2001;27(2):154-60. PubMed PMID: 11226654.
33. Chang KC, Ma H, Liao WC, Lee CK, Lin CY, Chen CC. The optimal time for early burn wound excision to reduce pro-inflammatory cytokine production in a murine burn injury model. *Burns*. 2010;36(7):1059-66. doi: 10.1016/j.burns.2010.02.004. PubMed PMID: 20471756.
34. Fear VS, Poh WP, Valvis S, Waithman JC, Foley B, Wood FM, et al. Timing of excision after a non-severe burn has a significant impact on the subsequent immune response in a murine model. *Burns*. 2016;42(4):815-24. doi: 10.1016/j.burns.2016.01.013. PubMed PMID: 26880298.
35. Lee JA, Jeong HJ, Park HJ, Jeon S, Hong SU. Acupuncture accelerates wound healing in burn-injured mice. *Burns*. 2011;37(1):117-25. doi: 10.1016/j.burns.2010.07.005. PubMed PMID: 20692770.
36. Robson MC, Kucan JO, Paik KI, Eriksson E. Prevention of dermal ischemia after thermal injury. *Archives of surgery*. 1978;113(5):621-5. PubMed PMID: 646624.
37. Langer S, Goertz O, Steinstraesser L, Kuhnen C, Steinau HU, Homann HH. New model for *in vivo* investigation after microvascular breakdown in burns: use of intravital fluorescent microscopy. *Burns*. 2005;31(2):168-74. doi: 10.1016/j.burns.2004.09.014. PubMed PMID: 15683687.

Article n°2 “Experimental models of full-thickness skin wounds in the hairless SKH1 mouse for quantitative evaluation of normal or delayed wound healing”

Experimental models of full-thickness skin wounds in the hairless SKH1 mouse for quantitative evaluation of normal or delayed wound healing

Berthet-Clair M^{1,4,†}, Lacroix-Gimon C^{1,†}, Josset-Lamaugarny A¹, Orea V¹, Pagnon-Minot A², Sigaudou-Roussel D¹, Verrier B^{1,*}, Gauthier Y^{3,4,*}

¹Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique (LBTI), UMR 5305, Université Lyon1, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), Lyon, France.

²Novotec, Zac du Chêne- Europarc 11 rue Edison, Bron, France.

³Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Département des Maladies Infectieuses, Brétigny-sur-Orge, France.

[†]co-first authors.

^{*}co-last authors.

⁴These authors contributed equally to this work.

Corresponding authors : Berthet Morgane, LBTI UMR 5305-CNRS, IBCP, Lyon, France. E-mail: mberthet@ibcp.fr and Gauthier Yves, IRBA, Département des maladies infectieuses, Brétigny –sur-Orge, France. E-mail: y_gauthier_crssa@yahoo.fr

INTRODUCTION

Cutaneous wound healing is a predominant worldwide burden, at social and financial levels, and is a matter of great concern to intensive care and burn unit centers. The reconstruction of a functional skin remains a huge challenge due to the complexity of physiological mechanisms controlling the healing process (Gurtner et al., 2008). In certain circumstances, this process is substantially impaired, leading to chronic wounds. The mechanisms underlying poor cutaneous regeneration and delayed wound healing are not fully understood. Consequently, the challenge of improving the wound healing process is accentuated. Moreover, nowadays, in a hostile social climate where the number of war wounds is growing, it is necessary for both civilian and military medicines to develop new strategies of treatments that would improve cutaneous wound healing and tissue reconstruction in terms of rapidity and functionality.

To answer these demands, it is necessary to develop easy, stable and standardized experimental models, allowing highly reproducible observations and the measurement of accurate data on wound healing. The aim of animal models is to use an integrated and elaborated biological system for predicting therapeutic outcomes in humans. Currently, the rodent species are largely used, due to low cost, high availability and easy handling.

Many experimental wound models has been described in the literature, like incisional or excisional injury and thermal burn (Dai et al., 2011). Various studies have reported thermal burn protocols, but in most cases, materials are costly, the protocol is difficult to organize and there are safety issues for experimenters. Boiling hot water (Rumbaugh et al., 2004), flamed ethanol (Stieritz and Holder, 1975) (Neely et al., 1996) or gas flame (Katakura et al., 2005) have been used as referent models for many years. Regarding rodent excisional injury, this model has been extensively used to study wound healing, cutaneous regeneration, stem cell or tissue transplantation and therapeutic drugs effects. However, compared to humans, rodent have limitations due to differences in architecture, biomechanical properties and skin composition. The major wound healing process in the mouse consists in skin contraction without generation of new tissue. In humans, the process includes both granulation tissue formation and re-epithelialization with production of new tissues. To overcome this discrepancy, a splinting ring has been attached around the wound of the mouse skin, to prevent a wound closure resulting from skin contraction. This system allows wounds to heal through granulation and re-epithelialization, a process similar to that observed in humans. The outbred SKH1 hairless mouse is the most widely used in dermatological research. Benefits are multiple, the skin is ready to manipulate, unpigmented and the strain is immunocompetent. The hair removal associated inflammatory responses due to shave, depilatory cream or wax used with hair mice are avoided and hair regrowth does not obscure the skin regeneration (Benavides et al., 2009) (Konger et al., 2016). As in haired mice, wound healing process in hairless mice, includes three overlapping but distinct stages: inflammation, proliferation and tissue formation, and remodeling.

In this present study, we describe two characterized models of cutaneous deep wounds, a third degree thermal burn model and an excisional model on the SKH1 hairless mouse. We first examined at three time points (day 0 before injury, day 7 and day 14 after injuries) the structural modifications of skin through

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

histologic studies. We also measured skin blood perfusion modifications and analyzed the wound healing gene profile. With the aim of studying the efficacy of various therapeutic treatments, all investigations were done in parallel in an established mouse model of type I diabetes.

ECM: Extracellular Matrix

HES: Hematoxylin-Eosin-Saffron

Dx: Day x after burn injury

STZ: Streptozotocin

RESULTS

Body weight and blood glucose levels.

After two weeks of diabetes a threefold elevation of blood glucose compared with control mice was observed, showing long-lasting hyper-glycaemia ($p < 0.0001$) (Table 1). At the time of experimentation, the weight of diabetic mice was 11 % inferior to control mice weight ($p < 0.01$).

Animals	Body weight (g)	Blood glucose (mg/dl)
Control (n= 10)	23.3 ± 0.6	169 ± 6
Diabetic (n= 10)	20.7 ± 0.5 **	581 ± 8****

Table 1. Body weight and blood glucose level in healthy and diabetic mice. n=10 and ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ vs control.

Wound closure of third degree thermal burn and excisional injuries

The kinetics of closure of a 5 sec skin burn wound and an excisional wound in healthy and diabetic mice, were studied using skin surface photos (**Fig. 1a/d**) analyzed by ImageJ software at time intervals after wounding (**Fig. 1b/e**). As shown on **figure 1a/b** for thermal burn model, at D6, D8 and D10 post burn (two, four and six days respectively after the surgical debridement step) the wound closure percentages in healthy and diabetic mice were $47.3\% \pm 1.7$ vs $20.3\% \pm 1.0$, $77.5\% \pm 2.4$ vs $37.3\% \pm 4.1$ and $91.7\% \pm 1.5$ vs $73.5\% \pm 3.3$ respectively. Fourteen-days post burn the wound was completely close in healthy mice whereas in diabetic mice the percentage of wound closure was $91.3\% \pm 1.6$. At all these time points, the wound closure was significantly accelerated in healthy mice compared to diabetic mice (D6, D8, D10 $p < 0.0001$ and D14 $p < 0.01$). At D16 and D18 after burn in diabetic mice the wound closure percentage was $97.6\% \pm 1.0$ and $99.9\% \pm 0.1$, respectively. As shown on **figure 1d/e** for excisional model, at D6, D8 and D10 post excision the wound closure percentages in healthy and diabetic mice were $65.3\% \pm 4.4$ vs $21.9\% \pm 7.6$; $88.0\% \pm 0.9$ vs $71.8\% \pm 3.7$ and $96.6\% \pm 1.0$ vs $82.2\% \pm 4.5$, respectively. The percentages of wound closure in diabetic mice were significantly lower than in healthy mice. At D6, D8 $p < 0.0001$ and D10 $p < 0.001$). After twelve days, no significant differences remained and wounds were at $98.9\% \pm 0.9$ healed in healthy mice and $93.7\% \pm 1.5$ in diabetic mice. Finally, at D14 the wounds of both healthy and diabetic mice were completely closed.

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

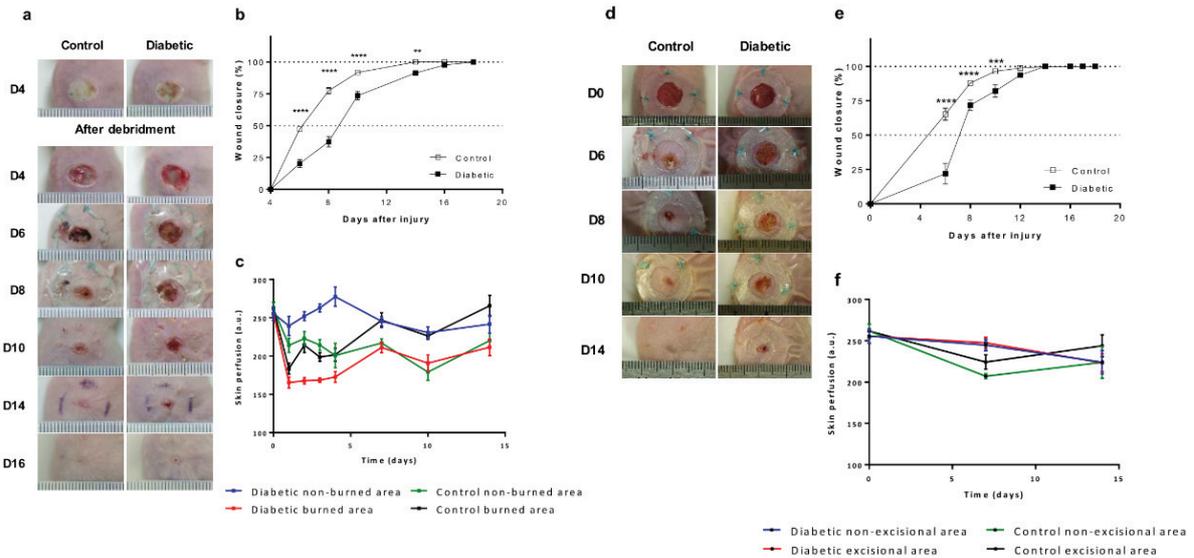


Figure 1. Characterization of healing of third degree thermal burn and excisional wound in type I diabetes SKH1 mice vs healthy SKH1 mice. Representative images of wound closure in healthy and diabetic SKH1 mice after third thermal burn injury (a) and excisional wound (d). Ruler units are in mm. (b/e) Wound closure over time was expressed as a percentage of final total wound closure in the third degree thermal burn model and in the excisional wound model. (b) Kinetics of wound closure of burn injury were represented as function of time (days after injury) for control (n=11) and diabetic mice (n=6). (e) Kinetics of wound closure of excisional wound were represented as function of time (days after injury) between control mice (healthy mice) (n=15) and diabetic mice (n=6). Black asterisks indicate a significant difference between the closure in control mice (healthy mice) and the closure in diabetic mice at the same day. Data as mean \pm SEM, significance levels were set at $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$. (c/f) Quantification of blood flow in burned skin (healthy and diabetic mice, n = 3-19) (c) and in excisional skin (healthy and diabetic mice, n = 4-18) (f) over a time course of 14 days. Data as mean \pm SEM.

Skin blood flow in the third degree thermal burn and the excisional wound models

At D0 before wound the blood flows were similar in control (healthy mice) and diabetic mice (261.7 ± 8.6 a.u. vs 255.6 ± 8.7 a.u., respectively) (Fig. 1c/f).

After a third degree thermal burn in control non-diabetic mice, the blood flows in non-burned and burned area were not significantly different from D1 to D4 post burn (Fig. 1c). However, blood flow analysis confirmed a significant increase of the blood perfusion at D7 and D14 post burn in the burned area compared the non-burned area (Table 2).

Skin blood perfusion (a.u.)	Day 7	Day 14
Non-burned area	217.1 ± 5.5	220.2 ± 9.8
Burned area	$247.0 \pm 9.6^{**}$	$265.7 \pm 13.6^*$

Table 2. Skin blood perfusion in non-diabetic mice. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ vs Non-burned area.

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

In diabetic mice, the blood flow from D1 to D10 post burn in the burned area was significantly lower than the blood flow in the non-burned area (**Table 3**).

Skin blood perfusion (a.u.)	Day 1	Day 10
Non-burned area	239.5 ± 12.5	230.7 ± 7.6
Burned area	165.4 ± 7.3 ****	190.8 ± 10.6 **

Table 3. Skin blood perfusion in diabetic mice. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ vs Non-burned area.

The blood perfusion in burned area of diabetic mice was significantly lower than in control mice at D2, D7 and D14 post burn (167.8 ± 4.2 a.u. vs 214.2 ± 9.8 a.u., $p < 0.001$ at D2 ; 211.3 ± 6.8 a.u. vs 247.0 ± 9.6 a.u., $p < 0.01$ at D7 and 211.6 ± 10.8 a.u. vs 265.7 ± 13.6 a.u., $p < 0.01$ at D14). In the non-burned area of diabetic mice, the blood flow was significantly higher than control mice from D3 to D10 post burn (262.9 ± 5.3 a.u. vs 214.5 ± 7.1 a.u., $p < 0.001$ at D3 and 230.7 ± 7.6 a.u. vs 179.1 ± 10.9 a.u., $p < 0.05$ at D10).

In the excisional wound in control mice, at D7 to D14 the blood flow in non-excisional wound area was not significantly different of injured area (**Fig. 1f**). No significant difference in the blood flow appeared in diabetic mice at D7 and D14 post injury in non-excisional wound area and injured area. Similar blood flow in injured area was observed in control and diabetic mice at D7 and D14. However, the blood perfusion in non-excisional wound area in diabetic mice was significantly higher than in control mice at D7 post injury (244.8 ± 6.7 a.u. vs 207.2 ± 3.1 a.u., $p < 0.05$).

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

Histological characterization of healing of third degree thermal burn and excisional wound in type I diabetes SKH1 mice vs healthy SKH1 mice.

Seven days after a 5 sec burn injury, histological observations have shown similar structural damages in healthy and diabetic mice (**Fig. 2a/b**). Indeed, a necrotic epidermis was observed as well as an inflammatory and highly vascularized aponeurosis composed of degraded ECM in both cases. The muscular bundles were inflammatory and degraded. At D14 after burn, reepithelialization was complete in both healthy and diabetic mice (**Fig. 2c/d**). However, the epidermis in healthy mice was pluristratified and non-linear. Long epidermal ridges were observed as well as hair follicles (**Fig. 2c**). In diabetic mice, a pluristratified and linear epidermis was observed, but it was not complete as shown by the absence of epidermal ridges and hair follicles (**Fig. 2d**). In both, diabetic and healthy mice, the under adjacent tissue was similar with a high-density of fibroblasts, myofibroblasts and neovessels into the granulation tissue.

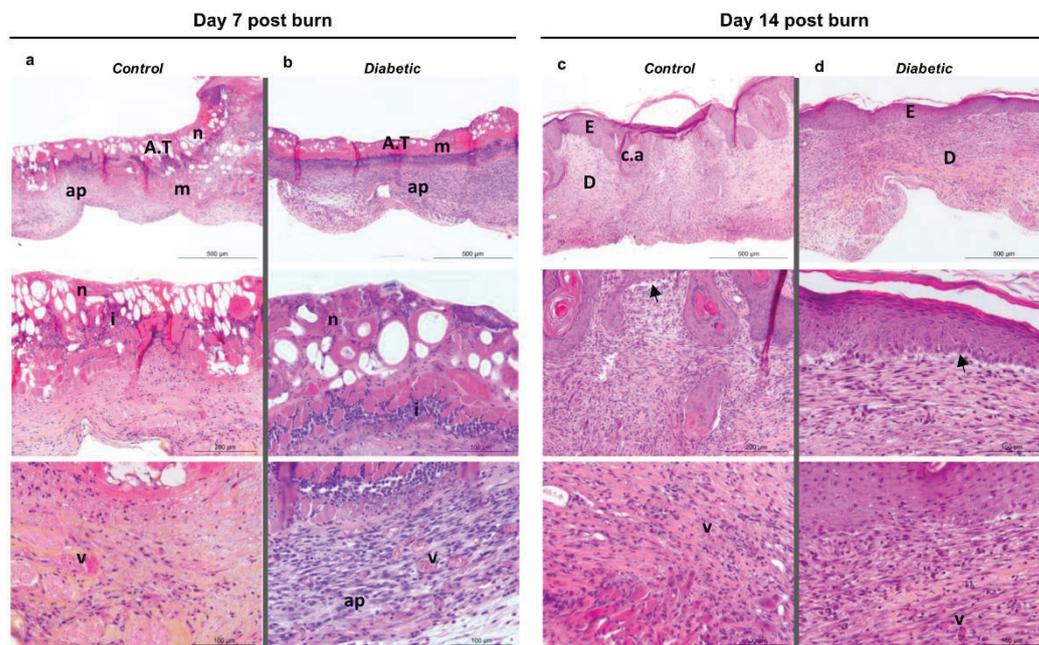


Figure 2. Histological modifications of wounds over time after a 5 sec of burn duration in healthy and diabetic mice. Representative images of HES stainings of burned skin at different times, D7 in healthy (a) and diabetic mice (b), D14 in healthy (c) and diabetic mice (d). n = 4. Black arrows indicate epidermal-dermal junction. Abbreviations: ap: aponeurosis ; A.T: adipose tissue ; c.a: cutaneous annexe ; D: dermis, E: epidermis ; i: inflammation ; n: necrosis ; m: muscle ; v: vessel.

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

Seven days after an excisional wound, histological analyses highlighted the same structural damages like in healthy and diabetic mice seven days after burn injury (**Fig. 3a/b**). A beginning of reepithelialization from the wound edges was observed in healthy mice (**Fig. 3c**). Then, at D14 a neoepidermis recovered the scar tissue like at D14 post burn (**Fig. 2c/d and Fig. 3c/d**). The epidermis was pluristratified and not complete, with an under adjacent tissue composed of a high-density of fibroblasts, myofibroblasts and neovessels that reflected an early granulation tissue stage (**Fig. 3c/d**).

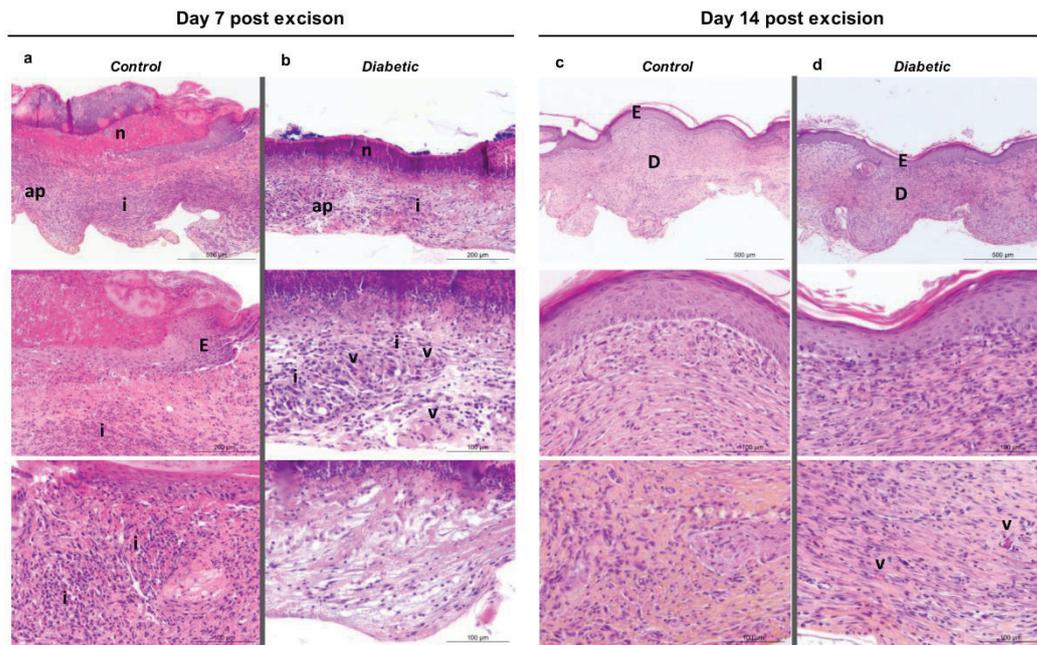


Figure 3. Histological modifications of excisional wounds over time in healthy and diabetic mice.

Representative images of HES stainings of excisional wound skin at different times, D7 in healthy (a) and diabetic mice (b), D14 in healthy (c) and diabetic mice (d). n = 4. Black arrows indicate epidermal-dermal junction. Abbreviations: ap: aponeurosis ; D: dermis ; E: epidermis ; i: inflammation ; n: necrosis ; v : vessel.

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

Gene expression in the third degree thermal burn and the excisional wound models

To further characterize wound healing in the third degree thermal burn and the excisional wound, in healthy and diabetic mice, gene array analysis were performed on control skin and injured skins on day 14 after injuries (Fig. 4). The results were expressed as an over or under expression of gene compared the genes expression in control skin (healthy mice before wound). As represented on the graphs, above the red line (150% mRNA expression) gene was overexpressed compared control skin and below the green line (50% mRNA expression) gene was underexpressed compared control skin.

ECM structural constituents such as *Col1a1/2*, *Col3a1* and *Col5a1/2* were significantly overexpressed in control and diabetic excisional wound mice and in control burned mice (Fig. 4a). *Col14a1* and ECM remodeling enzymes such as *Ctsk* and *Mmp2* were significantly overexpressed in diabetic excisional wound mice (Fig. 4a/b). Genes for cell adhesion molecules such as *Itga3* were overexpressed in control burned mice (Fig. 4c). Cytoskeleton regulators such as *Act1* was significantly overexpressed in control and diabetic excisional wound mice and in control burned mice (Fig. 4d). Genes coding for growth factors (GFs) such as *Igf1* were significantly overexpressed in control and diabetic excisional wound mice and in control burned mice (Fig. 4e). In addition to this previous GFs, the *Hgf* and *Ctdf* genes were overexpressed in diabetic excisional wound mice and the *Tnf* gene was underexpressed in control burned mice. Inflammatory chemokines such as *Cxcl3* was underexpressed in control and diabetic excisional wound mice and in control burned mice and *Cxcl5* was overexpressed in control excisional wound mice and in control burned mice (Fig. 4f). Finally, *Wisp1* gene involved in the signal transduction was overexpressed in control and diabetic excisional wound mice and in control burned mice (Fig. 4g). In addition to this previous gene, *Ptgs2* was also overexpressed in diabetic excisional wound mice.

In addition, the gene analysis revealed significant increase of *Col14a1* gene expression in control excisional wound mice compared gene expression in control and diabetic burned mice (499% mRNA expression vs 192%, $p < 0.01$ and 234% mRNA expression, $p < 0.05$). In control excisional wound mice *Mmp9* gene expression was significantly decreased compared gene expression in diabetic burned mice (106% mRNA expression vs 373%, $p < 0.05$). And the *Ctgf* gene expression in diabetic excisional wound mice was significantly increased compared gene expression in control and diabetic burned mice (287% mRNA expression vs 82% and 107% mRNA expression, $p < 0.05$, respectively).

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

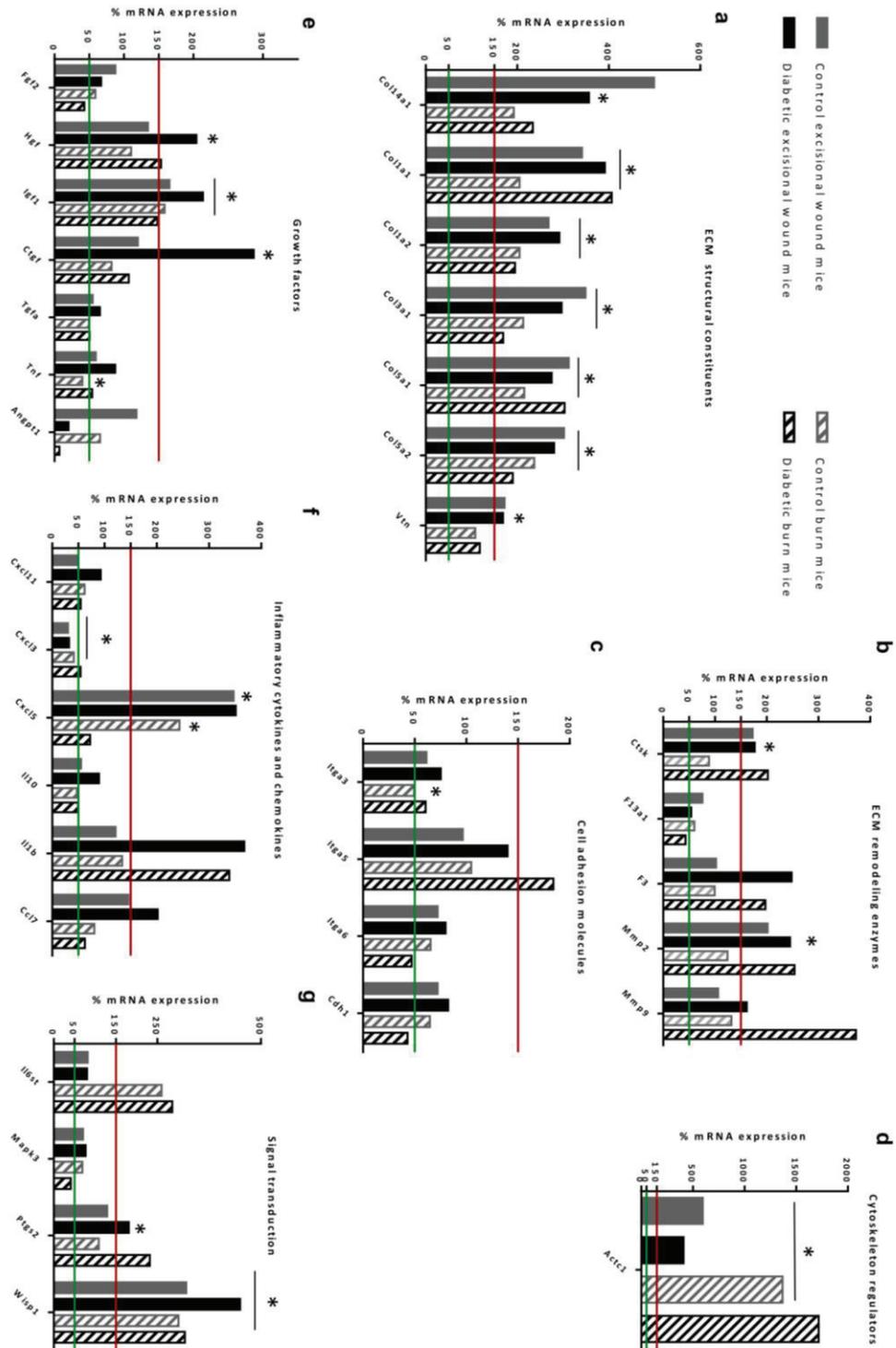


Figure 4. Expression of genes involved in wound healing in burn and excisional wound models.

Histogram representations of relative expression of genes at day 0 (control skin, n=3) and day 14 (n=3) after injury as determined by quantitative RT-PCR. The values were normalized to the relative expression of gusb mRNA (β -Glucuronidase) in each sample. Gene expression were classified by : (a) extracellular matrix (ECM) structural constituents, (b) ECM remodeling enzymes, (c) cell adhesion molecules, (d) cytoskeleton regulators, (e) growth factors, (f) inflammation cytokines and chemokines, (g) signal transduction. The asterisk indicates statistically significant compared with skin in control mice (* $p < 0.05$), except for diabetic burned mice group where no statistic were performed due to a low amount of samples.

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

Abbreviations: ECM structural constituents: *Col14a1*: Collagen, type XIV, alpha 1 ; *Col1a1*: Collagen, type I, alpha 1 ; *Col1a2*: Collagen, type I, alpha 2 ; *Col3a1*: Collagen, type III, alpha 1 ; *Col5a1*: Collagen, type V, alpha 1 ; *Col5a2*: Collagen, type V, alpha 2 ; *Vtn*: Vitronectin ; ECM remodeling enzymes: *Ctsk*: Cathepsin K ; *F13a1*: Coagulation factor XIII, A1 subunit ; *F3*: Coagulation factor III ; *Mmp2*: Matrix metalloproteinase 2 ; *Mmp9*: Matrix metalloproteinase 9 ; Cell adhesion molecules: *Itga3*: Integrin alpha 3 ; *Itga5*: Integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha) ; *Itga6*: Integrin alpha 6 ; *Cdh1*: Cadherin 1 ; Cytoskeleton regulators: *Actc1*: Actin alpha, cardiac muscle 1 ; Growth factors: *Fgf2*: Fibroblast growth factor 2 ; *Hgf*: Hepatocyte growth factor ; *Igf1*: Insulin-like growth factor 1 ; *Ctgf*: Connective tissue growth factor ; *Tgfa*: Transforming growth factor alpha ; *Tnf*: Tumor necrosis factor ; *Angpt1*: Angiopoietin 1 ; Inflammatory cytokines and chemokines: *Cxcl1*: Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 ; *Cxcl3*: Chemokine (C-X-C motif) ligand 3 ; *Cxcl5*: Chemokine (C-X-C motif) ligand 5 ; *Il10*: Interleukin 10 ; *Il1b*: Interleukin 1 beta ; *Ccl7*: Chemokine (C-C motif) ligand 7 ; Signal transduction: *Il6st*: Interleukin 6 signal transducer ; *Mapk3*: Mitogen-activated protein kinase 3 ; *Ptgs2*: Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 ; *Wisp1*: WNT1 inducible signaling pathway protein 1.

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

Assessment of PIV.

LDF baseline values were significantly increased in diabetic groups (DB 246 ± 19 a.u.; DB post-burn 262 ± 52 a.u.; DB post-excision 256 ± 31 a.u.) compared to respective control mice (CTL 158 ± 19 a.u.; CTL post-burn 153 ± 21 a.u.; CTL post-excision 146 ± 19 a.u.) ($p < 0.05$). Systolic blood pressure at rest were not different between diabetic (DB 75 ± 2 mmHg.; DB post-burn 74 ± 2 mmHg ; DB post-excision 70 ± 1 mmHg) and their respective control mice (CTL 71 ± 3 mmHg; CTL post-burn 72 ± 2 mmHg.; CTL post-excision 71 ± 3 mmHg).

Cutaneous temperature and systolic blood pressure (SABP) were stable throughout the experiment. In the healthy skin group, the mean of the maximal vasodilation percentage was significantly decreased in diabetic mice compared with control mice ($16 \pm 4\%$ vs $40 \pm 8\%$, $p < 0.05$) (Fig. 5a). In the post-burned group, no significant differences were observed in the mean of the maximal vasodilation percentage between control and diabetic mice. However, the mean of the maximal vasodilation percentage in the post excisional wound was largely attenuated in diabetic mice ($-2 \pm 6\%$) compared with control mice ($46 \pm 13\%$, $p < 0.01$). In addition, in diabetic mice, we observed that the mean of the maximal vasodilation percentage of the post excisional wound group ($-2 \pm 6\%$) was significantly lower than post burned in diabetic mice ($33 \pm 9\%$, $p < 0.01$).

Endothelium-dependent and -independent responses.

SNP and Ach iontophoresis produced a significant endothelium-independent and dependent vasodilation in all the groups (Fig. 5b/c). For each pharmacological stimulation, there was no significant difference between all the diabetic groups and their respective control group.

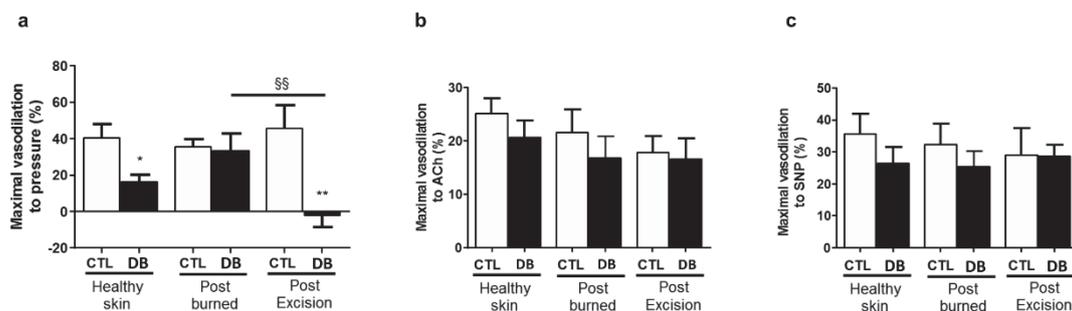


Figure 5. Modification of cutaneous microvascular flow after burned and excisional wound in healthy and diabetic mice.

(a) Percentage of maximal vasodilation after Ach iontophoresis in healthy skin group (before wound) in control (CTL, n=16) and diabetic mice (DB, n=17); in post burned skin group in CTL (n=11) and DB mice (n=6) and in post excisional skin group in CTL (n=14) and DB mice (n=6). (b) Percentage of maximal vasodilation after SNP iontophoresis in healthy skin group (before wound) in CTL (n=8) and DB mice (n=7); in post burned skin group in CTL (n=6) and DB mice (n=4) and in post excisional skin group in CTL (n=7) and DB mice (n=5). (c) Maximal vasodilation to pressure (%) (PIV) in healthy skin group (before wound) in CTL (n=9) and DB mice (n=9); in post burned skin group in CTL (n=5) and DB mice (n=3) and in post excisional skin group in CTL (n=4) and DB mice (n=6). * $p < 0.05$ vs associated control group and ** $p < 0.01$ post burned group in DB mice vs post excisional group in DB mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experiments involving animals have been conducted in compliance with the guidelines of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS # 123), and followed the principles of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the US National Research Council (NRC, 2011). The animal procedures have been approved by both our institutional scientific board and by the I.B.C.P.'s institutional Animal Care and Use committee (# IBCP_2015_002). Female outbred SKH1 hairless mice were purchased from Charles River Laboratories France (69592, l'Arbresle, France) as SKH1-Elite mice (CrI:SKH1-Hrhr, strain code 477) and were used at 8 weeks of age (20-25 g). Animals were housed in ventilated cabins at a controlled room temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$ with a $50 \pm 10\%$ hygrometry. They received sterilized water and standard laboratory mouse food *ad libitum*.

General anesthesia, analgesia and euthanasia

Mice were anesthetized with an intra-peritoneal injection of ketamine (100 mg/kg, Imalgene 500®, Merial, France) and Xylazine (10 mg/kg, Rompun® 2%, Bayer, France). As anesthesia induced between two to three hours immobilization, mice were kept in ventral position on a controlled temperature heating mat until awakening to prevent hypothermia. Pain management of burn injury was as follows: subcutaneous analgesic injection of Buprenorphin (0.05 mg/kg, Buprecare®, Axience SAS, France), was made after anesthesia, and analgesia was continued for three days after burn infliction. Animals were checked every day for wound appearance, clinical signs of illness and morbidity. Body weight was recorded at intervals and a loss greater than 20% of initial weight and/or critical signs of pain or distress (hunched appearance, endless lethargy and immobility) were considered as endpoints and led to animal euthanasia. At designed time points after injury, mice were killed by an intracardiac injection of an overdose of sodium pentobarbital (60 mg/kg, Ceva santé animale SA, la ballastiere, France), prior to the taking of skin samples for histological analysis and after assessment of cutaneous microcirculation.

Full-thickness burn and skin excision protocols

Ten-weeks-old healthy or diabetic female SKH1 mice were inflicted either a full-thickness 8 mm diameter burn injury (healthy n=11, diabetic n=6) or a full-thickness 8 mm diameter excision. (healthy n=15, diabetic n=6).

Briefly, after sedation achievement the thermal burn injury was inflicted, by application of a brass bar heated at 100°C and held in vertical position, perpendicularly to the skin surface, under the only effect of its own weight, for 5 sec. Immediately after injury, 0.1 ml of sterile saline was subcutaneously administrated under the site of burn. Mice were analgesized for three days after injury as described above. At D4 post burn, a surgical debridement of the wound was made with a microsurgical knife, on animals under anesthesia and analgesia. Donut-shaped silicone splints (10 mm inner diameter and 18 mm outer diameter) were placed around the wound and stuck with a silicone adhesive glue (Kwik-Sil, World Precision Instruments). Four

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

interrupted sutures (4-0 mersilene™ polyester fiber sutures, Ethicon L.L.C, Cornelia, GA) were made to reinforce the fixation and to prevent local skin contraction. The entire wound area including the surrounding silicone ring was covered with a sterile transparent dressing (Tegaderm™, Nexcare, 3M Health Care, St. Paul, MN). Regarding skin excision, at day 0 naïve mice were exposed to isoflurane and a full thickness wound was created on the exposed dorsal skin using a sterile biopsy punch of 8 mm Ø (Kai Medical, Germany) (Wang et al., 2013) (Galiano et al., 2004) (Tepper et al., 2010). The same procedure as described above using a silicone splint was carried out to prevent local skin contraction. On day 6 post surgery for both types of wounds, the Tegaderm™ covering was removed.

Type I diabetes mouse model

A type I diabetes was induced in 8-weeks-old mice by a single intraperitoneal (IP) injection of streptozotocin (STZ; 195 mg.kg⁻¹; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) in citrate buffer (pH 4.5) after a 6 hours fasting period (Williamson E.M et al., 1996) (Paik et al., 1980). Non-diabetic control mice received equivalent doses of citrate buffer solution. Hyperglycemia generally occurred within 3 days after STZ injection and was monitored with BG STAR glucometer (Sanofi, Paris, France). Three days after STZ injection, mice with blood glucose levels reaching values ≥ 300 mg/dl were considered having an hyperglycaemia and were included in the diabetic assay group. Hyperglycemic animals were maintained for 12 days to allow diabetes stabilization before skin injury.

Wound area assessment

The wounds were photographed (Pentax digital camera K-r with a Pentax 100 Macro WR lens, C.R.Kennedy & Co. ,Victoria, Australia) on days 4, 6, 8, 10, 14 and 16 after burn and on days 0, 6, 8, 10, 14 after excisional wound. Time for completing closure was defined as the time necessary to observe a fully closed wound bed with new tissue. The extent of wound closure was estimated at intervals by measuring the wound area using image analysis software (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD). The percentage of wound closure at each time points was calculated according to the given equation:

$$\text{Wound closure (\%)} = \frac{(\text{Wound area on day "y"} - \text{Wound area on day "x"})}{(\text{Wound area on day "y"})} \times 100$$

Where day “y” represents day 4 post burn and day 0 for excisional wound model.

A wound was considered totally closed when the percentage of wound closure is equal to 100%.

Histological investigations

At D7, D14 after burn and at D7, D14 after excisional injury mice were killed and the entire wound with skin margins was excised with surgical scissors and collected for histological analysis (**Fig. 1c**). Healthy tissue was also excised to obtain control skin samples. All tissues were fixed for 24h at 4 °C in freshly prepared cold 4% paraformaldehyde in PBS 1X and then dehydrated in ethanol, acetone and xylene, and embedded into paraffin. 5 µm thick slices were made using a microtome (MM 350 s FINESSE E, ThermoFisher) and were stained

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

with either Hematoxylin-Eosin-Saffron (HES) stainings for highlighting cells, extracellular matrix, collagen fibers and neovascularization respectively. Photos of stained samples were taken with a Leica DM2000 microscope and computerized with a digital camera managed by acquisition Leica Application Suite version 4 image software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Observations were made by two independent histologists.

Gene expression profile of wound healing

Skin biopsies (n=3) were put in a RNA later solution at 4 °C immediately after sampling. The skin samples were kept at 4°C for 24h, and then stored at -80°C. RNA extraction was performed using the QIAGEN "RNesay fibrous tissue mini kit " (ref 74704). RNA concentrations were determined by using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop 2000, thermo Scientific) and RNA quality was analysed using microfluidic analysis (Agilent bioanalyser). The mean of the RIN obtained for all the RNA samples was 6,9 +/- 1,1. 400 ng of mRNA samples were converted into first strand cDNA. cDNA templates were mixed with ready-to-use RT2 qPCR Master (QIAGEN RT² First Strand Kit) and aliquoted into each well (2,83 ng) of the same plate containing pre-dispensed gene specific primer sets (RT² Profiler™ Mouse Wound Healing PCR Array (PAMM121Z)). qPCR relative expression was then determined according to the ddCt method (GeneGlobe Data Analysis Center).

Assessment of cutaneous microcirculation

Assessment of skin perfusion

At day 0 before burn and at days 0, 1, 2, 3, 4 after burn and at days 7 and 14 after burn and excisional wound, each mouse underwent inhalation anesthesia in side position (Ganapathy et al., 2014) (Pape et al., 2012) (Monstrey et al., 2012). A blood perfusion imager based on Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA) technology was performed with the PeriCam PSI Normal Resolution (Perimed, Sweden). This method allows continuous assessment of skin perfusion over wide areas, by combining the advantages of laser Doppler flowmetry and laser Doppler imaging (Roustit and Cracowski, 2012). Laser wavelength was 785 nm and processing frequency bandwidth was 50 Hz. The laser head was placed 14 cm above skin surface. The measurement area was 4 cm². The skin blood perfusion was visualized in real time with a resolution of 100 µm/pixel. When skin temperature was stabilized at around 35 ± 0.5 °C, skin blood flow measurement was performed. Contrast images were processed to produce a scaled color-coded live flux image (red equaled high perfusion and blue equaled low perfusion), which correlated with the blood flow velocity in the tissue. Blood perfusion was expressed in the arbitrary units (a.u.). Data were analyzed off-line with signal processing PimSoft version 1.5 software (Perimed, Sweden). For each examined time point, 2 images/sec were acquired for 1.3 min. Two regions of interest (ROI) were defined: a skin control area (beside the wound) and a injured area. The first 30 seconds of recording allowed to stabilize the skin blood flow signal. At each time point, the mean perfusion in each ROI was calculated on 1 min of recording time.

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

Assessment of pressure-induced vasodilation

Before all experiments of PIV measurement, animals were anesthetized by ip injection of sodium pentobarbital (60 mg/kg, Ceva santé animale SA, la ballastiere, France). Mice, in prone position, were rested in an incubator for 20-min to stabilize the non-invasive blood pressure (XBP-1000, Kent scientific, Torrington, CT) and cutaneous temperature (BAT-12, Physitemp instruments, Clifton, NJ). For all protocols, cutaneous temperature was $35.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and systolic arterial blood pressure remained stable throughout the experiment. Local pressure-induced LDF response was measured as previously described (Demiot et al., 2006a) (Demiot et al., 2006b). The probe was placed on the hairless healed skin of the mouse, and the external pressure was increased progressively at $0,5 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$ through the laser Doppler probe, using a syringe pump (Béregère Fromy et al., 2012).

Assessment of endothelium-dependent and independent vasodilation

Before these experiments, animals were anesthetized by ip injection of sodium pentobarbital (60 mg/kg, Ceva santé animale SA, la ballastiere, France). Mice, in prone position, were rested in an incubator for 20-min to stabilize the non-invasive blood pressure (XBP-1000, Kent scientific, Torrington, CT) and cutaneous temperature (BAT-12, Physitemp instruments, Clifton, NJ). For all protocols, cutaneous temperature was $35.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and systolic arterial blood pressure remained stable throughout the experiment. Laser Doppler flux (LDF) in response to acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP) (Saint Quentin Fallavier, France) iontophoresis was measured to assess skin microvascular reactivity. Endothelium-dependent response was assessed using anodal acetylcholine (ACh) iontophoresis (Sigma) (5.5 mM) with a current application of 100 μA during 20 s. Endothelium-independent response was assessed using cathodal sodium nitroprusside (SNP) iontophoresis (Nitriate, SERB, France) (67 mM) with a current application of 100 μA during 30 s (Demiot et al., 2006a) (Demiot et al., 2006b).

Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) in graphs and bar charts. All graphs and analyses were performed using GraphPad Prism Version 6.07 for Windows (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA). Differences in body weights and blood glucose levels between healthy and diabetic mice were evaluated using a paired two-tailed t-test. Regarding data of wound closure and blood flow measures (SPECKLE, PIV, ACh and SNP iontophoresis), the differences were analyzed using a Two-way ANOVA with Bonferroni's post-test. Data were considered significantly different if p values were inferior to 0.05. P values appear in the legends of figures where applicable.

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

REFERENCES

- Benavides F, Oberyshyn TM, VanBuskirk AM, Reeve VE, Kusewitt DF. The hairless mouse in skin research. *J Dermatol Sci* 2009;53(1):10-8.
- Bérenghère Fromy, Eric Lingueglia, Dominique Sigauco-Roussel, Jean Louis Saumet, Lazdunski M. Asic3 is a neuronal mechanosensor for pressure-induced vasodilation that protects against pressure ulcers. *Nature medicine* 2012;18(8):1205-10.
- Dai T, Kharkwal GB, Tanaka M, Huang YY, Bil de Arce VJ, Hamblin MR. Animal models of external traumatic wound infections. *Virulence* 2011;2(4):296-315.
- Demiot C, Fromy B, Saumet JL, Sigauco-Roussel D. Preservation of pressure-induced cutaneous vasodilation by limiting oxidative stress in short-term diabetic mice. *Cardiovascular research* 2006a;69(1):245-52.
- Demiot C, Tartas M, Fromy B, Abraham P, Saumet JL, Sigauco-Roussel D. Aldose reductase pathway inhibition improved vascular and C-fiber functions, allowing for pressure-induced vasodilation restoration during severe diabetic neuropathy. *Diabetes* 2006b;55(5):1478-83.
- Galiano RD, Michaels Jt, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2004;12(4):485-92.
- Ganapathy P, Tamminedi T, Qin Y, Nanney L, Cardwell N, Pollins A, et al. Dual-imaging system for burn depth diagnosis. *Burns* 2014;40(1):67-81.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008;453(7193):314-21.
- Katakura T, Yoshida T, Kobayashi M, Herndon DN, Suzuki F. Immunological control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in an immunodeficient murine model of thermal injuries. *Clinical and experimental immunology* 2005;142(3):419-25.
- Konger RL, Derr-Yellin E, Hojati D, Lutz C, Sundberg JP. Comparison of the acute ultraviolet photoresponse in congenic albino hairless C57BL/6J mice relative to outbred SKH1 hairless mice. *Experimental dermatology* 2016;25(9):688-93.
- Monstrey SM, Hoeksema H, Baker RD, Jeng J, Spence RS, Wilson D, et al. Reprint of: Burn wound healing time assessed by laser Doppler imaging. Part 2: Validation of a dedicated colour code for image interpretation. *Burns* 2012;38(2):195-202.
- Neely AN, Hoover DL, Holder IA, Cross AS. Circulating levels of tumour necrosis factor, interleukin 6 and proteolytic activity in a murine model of burn and infection. *Burns* 1996;22(7):524-30.
- NRC. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. In: Press NA, editor. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. 8th ed. Washington (DC); 2011.
- Paik SG, Fleischer N, Shin SI. Insulin-dependent diabetes mellitus induced by subdiabetogenic doses of streptozotocin: obligatory role of cell-mediated autoimmune processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980;77(10):6129-33.
- Pape SA, Baker RD, Wilson D, Hoeksema H, Jeng JC, Spence RJ, et al. Burn wound healing time assessed by laser Doppler imaging (LDI). Part 1: Derivation of a dedicated colour code for image interpretation. *Burns* 2012;38(2):187-94.

Résultat III. Développement de modèles expérimentaux *in vivo* pour étudier la cicatrisation

- Roustit M, Cracowski JL. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation* 2012;19(1):47-64.
- Rumbaugh KP, Hamood AN, Griswold JA. Cytokine induction by the *P. aeruginosa* quorum sensing system during thermal injury. *The Journal of surgical research* 2004;116(1):137-44.
- Stieritz DD, Holder IA. Experimental studies of the pathogenesis of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: description of a burned mouse model. *The Journal of infectious diseases* 1975;131(6):688-91.
- Tepper OM, Carr J, Allen RJ, Jr., Chang CC, Lin CD, Tanaka R, et al. Decreased circulating progenitor cell number and failed mechanisms of stromal cell-derived factor-1alpha mediated bone marrow mobilization impair diabetic tissue repair. *Diabetes* 2010;59(8):1974-83.
- Wang X, Ge J, Tredget EE, Wu Y. The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. *Nature protocols* 2013;8(2):302-9.
- Williamson E.M, Okpoko D.T, F.J E. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. Third Avenue, New York, USA1996. 155-67. p.

Résultat IV. Vers les études précliniques : expériences exploratoires

Résultat IV. Vers les études précliniques : expériences exploratoires

Introduction

Nous rapportons ici deux études exploratoires réalisées sur deux modèles de plaies cutanées profondes. Une 1^{ère} étude d'efficacité *in vivo* de NP de PLA fonctionnalisées sur des plaies cutanées chez la souris C57BL/6 avait été réalisée en fin de stage de Master 2 et avait permis d'obtenir des résultats préliminaires montrant un potentiel effet positif des NP de PLA-FGF2 et des NP de PLA nues sur la cinétique de fermeture de plaies d'excision (**Figure 29**) [102]. Dans une seconde étude exploratoire, nous avons suivi la biodistribution de NP de PLA fluorescentes au niveau de plaies cutanées chez la souris SKH1. Deux modèles de plaies cutanées profondes ont été utilisés pour cette dernière étude, la plaie d'excision et la brûlure thermique de 3^{ème} degré. Les expériences, menées en parallèle sur souris saines et diabétiques, ont consisté à suivre la pénétration tissulaire des NP en microscopie à fluorescence.

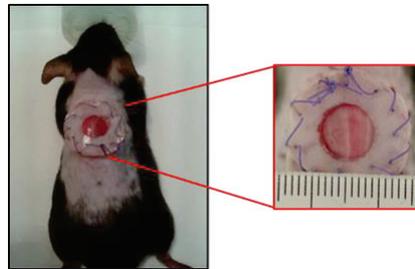


Figure 29 : Modèle de plaie excisionnelle sur la souris C57BL/6 adapté de Galiano et al. [102].

I. Matériels et méthodes

a. Évaluation *in vivo* de l'activité du FGF2 vectorisé par des NP de PLA dans la réparation tissulaire

Une étude préliminaire a été faite afin de voir s'il était possible de mettre en évidence un éventuel effet de nanoparticules de PLA fonctionnalisées sur un modèle expérimental de plaie cutanée. A cette fin, des NP ayant du facteur de croissance FGF2 adsorbé en surface ont été testées sur le modèle de plaie excisionnelle développé chez la souris par Galiano *et al.* [102]. Des biopsies de peau de 8 mm de diamètre ont été réalisées et un anneau de silicone a été fixé autour de la plaie pour éviter la fermeture précoce par contraction des bords de la plaie (**Figure 29**). Le plan de l'expérience est présenté dans la **Figure 30**.

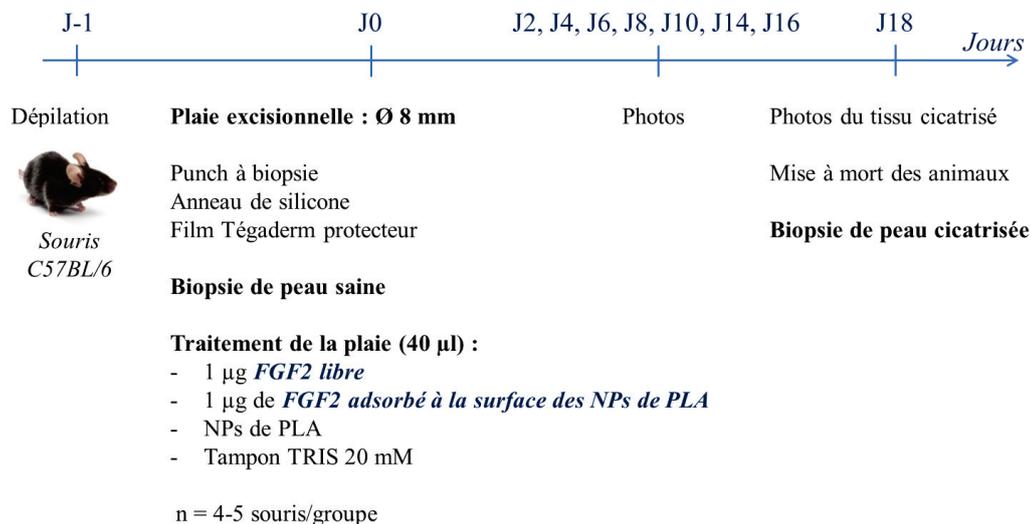


Figure 30 : Etapes du protocole de cicatrisation chez la souris C57BL/6.

b. Etude *in vivo* de la biodistribution de NP de PLA fluorescentes dans les plaies

1. Synthèse des NP de PLA fluorescentes

Des NP de PLA fluorescentes rouges à un taux de chargement de Bodipy de 0,04% (TR methyl ester Invitrogen, C34556) ont été élaborées par nanopréciipitation comme décrit dans la section du matériels et méthodes des résultats I. Les nanoparticules fluorescentes ont été caractérisées par DLS (diamètre, I_p , potentiel zêta) et par HPLC (rendement d'encapsulation et taux de chargement en bodipy).

Résultat IV. Vers les études précliniques : expériences exploratoires

2. Application des NP de PLA fluorescentes sur des plaies cutanées

Des brûlures thermiques de 3^{ème} degré et des plaies d'excision ont été réalisées sur des souris SKH1 saines et diabétiques comme décrit dans la section « Résultat III. Développement de modèles expérimentaux de plaies cutanées profondes pour l'étude *in vivo* de la cicatrisation ». L'anneau en silicone fixé autour de la plaie n'est pas requis pour cette expérience. Ainsi, à J0 après excision ou à J+4 après débridement de la peau brûlée, 50 µL de NP de PLA fluorescentes suspendues dans PBS 1X stérile (0,25% (m/m)) ont été appliquées sur les plaies à l'aide de micropipettes. Un film transparent a été utilisé pour recouvrir la plaie (Tegaderm™, 3M, 1626W/10).

3. Cryosections, marquages et microscopie à fluorescence

Aux temps 4 h, 6 h, 9 h et 24 h les souris ont été sacrifiées et des prélèvements de peau autour de la plaie ont été réalisés à l'aide de ciseaux chirurgicaux stériles. De la peau saine a été prélevée pour constituer un contrôle négatif. Les prélèvements de peau ont été lavés dans du PBS 1X puis congelés sur un bloc d'aluminium plongé dans du 2 méthyl-buthane (M32631, Sigma Aldrich) refroidi par de l'azote liquide. Des coupes de 7 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica CM3050 S).

Des marquages avec du DAPI (Euromedex 1050-a) et de la phalloïdine couplée à un fluorochrome vert (Phalloïdine Alexa fluor 488®, Thermo Scientific, 21833) ont été réalisés pour permettre de visualiser les noyaux cellulaires et l'actine F du cytosquelette. Les échantillons ont été observés au microscope à fluorescence (Axio imager ZI, Zeiss). La fluorescence du Bodipy est détectée après excitation à 598 nm et émission à 625 nm. Le marquage au DAPI est détecté après excitation à 365 nm et émission à environ 410 nm. Enfin, la fluorescence de la phalloïdine Alexa Fluor 488® est détectée après excitation à 495 nm et émission à 519 nm.

II. Résultats

a. Évaluation *in vivo* de l'effet de FGF2 vectorisé par des NP de PLA sur la cicatrisation

Durant tout le processus de cicatrisation, des photographies des plaies ont été réalisées régulièrement et calibrées avec une règle afin d'évaluer pour chaque animal la taille de la plaie à l'instant « t » et en déduire la vitesse de fermeture. On note que les vitesses de fermeture diffèrent faiblement en fonction du traitement appliqué sur la plaie (**Figure 31**). Ainsi, les plaies traitées avec soit le FGF2 vectorisé par des NP de PLA ou soit des NP de PLA nues se referment au bout de 12 jours. Cependant, les plaies traitées avec le FGF2 libre ou avec le tampon seul (témoin négatif) semblent plus lentes à cicatriser.

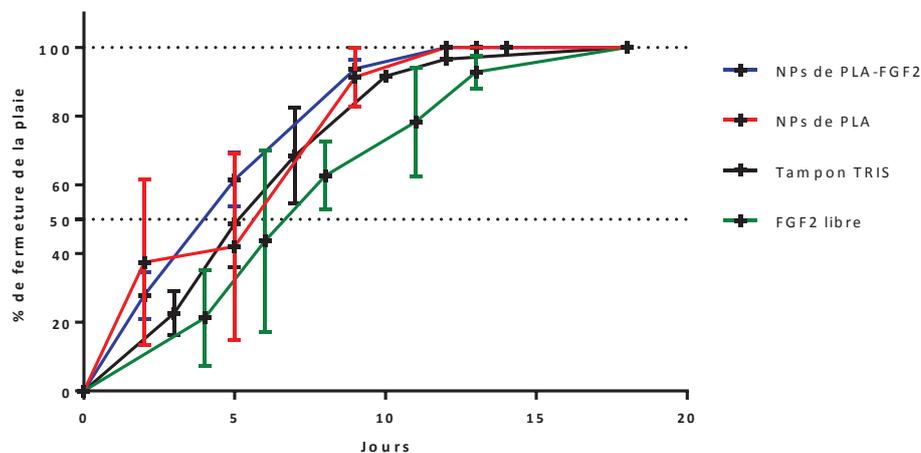


Figure 31 : Suivi de la fermeture des plaies, les souris ont été traitées avec des particules de PLA nues (contrôles négatifs, rouge), FGF2 adsorbé sur des particules de PLA (bleu), le FGF2 libre (contrôle positif, vert) et du tampon TRIS 20 mM (noir). La fermeture complète de la plaie est atteinte à 100%. Les données sont exprimées comme la moyenne \pm SD, (n = 4-5 souris/groupe).

b. Étude *in vivo* de la biodistribution de NP de PLA fluorescentes dans des plaies

Les NP de PLA fluorescentes obtenues avaient un diamètre moyen de 205 nm, un I_p de 0,04 et un potentiel zêta de -53 mV. Pour un taux de chargement en Bodipy de 0,04% le rendement d'encapsulation était de 99,8%, d'après le dosage HPLC.

Cette étude préliminaire sur la biodistribution des NP de PLA a été réalisée sur les deux types de plaies, sur souris SKH1 saines et diabétiques. Nous avons observé des profils de pénétration des NP de PLA fluorescentes similaires chez les souris saines (données non montrées) et diabétiques. Comme montré dans la **Figure 32a**, la peau contrôle de souris diabétiques ne montre aucune fluorescence rouge, contrairement aux images obtenues 4 h après avoir appliqué

Résultat IV. Vers les études précliniques : expériences exploratoires

les NP de PLA fluorescentes sur la brûlure (débridée au préalable) et sur la plaie d'excision, où de la fluorescence rouge est observée en surface de la plaie de brûlure (**Figure 32b**) et au niveau de la couche la plus interne de la peau pour la plaie d'excision (**Figure 32c**). Les prélèvements effectués aux temps 6 h, 9 h et 24 h (données non montrées) ont montré de la fluorescence rouge localisée au niveau des plaies, comme attesté par la **Figure 32d** montrant des amas de NP fluorescentes rouges en bordure de la plaie d'excision après 24 h d'applications.

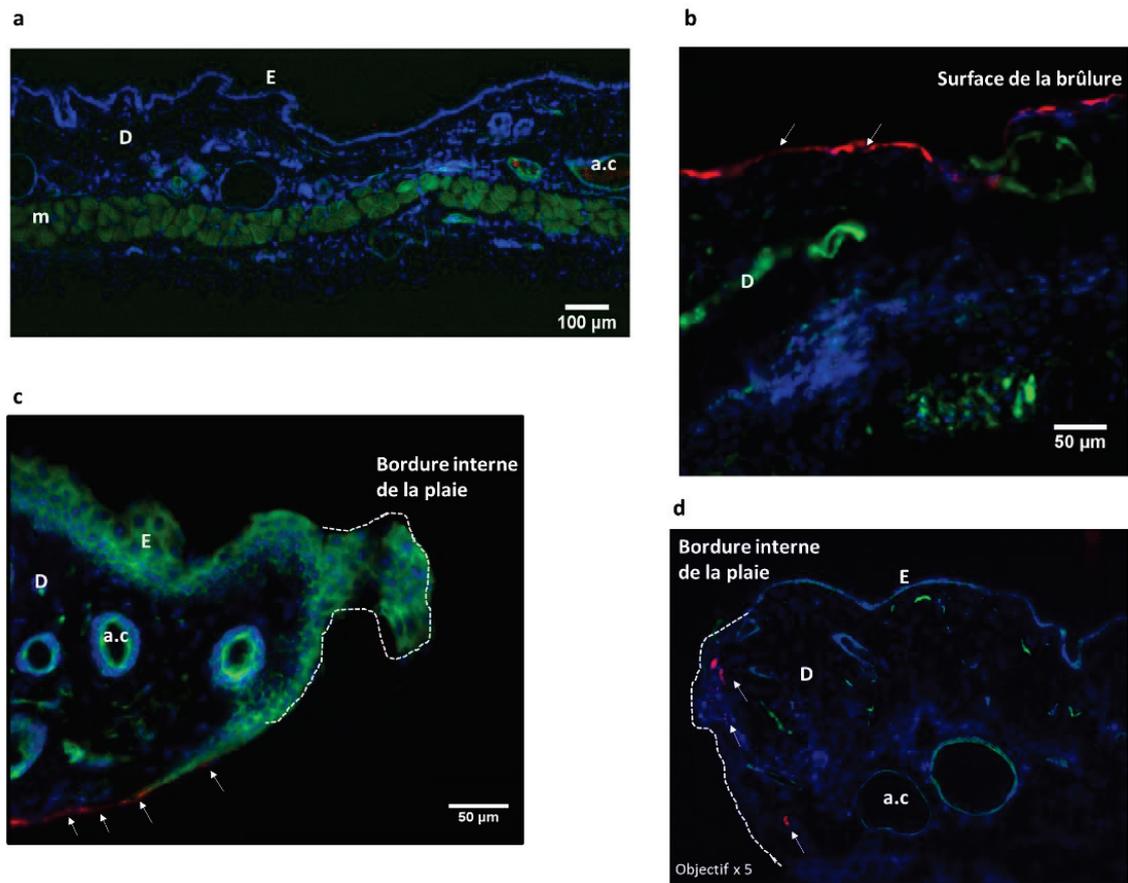


Figure 32 : Coupe transversale de peau de souris SKH1 diabétiques observée au microscope Axiolmager ZI, ZEISS. (a) peau contrôle, (b) peau brûlée 4 h après applications des NP de PLA fluorescentes rouges, (c) bordure de plaie d'excision 4 h après applications des NP de PLA fluorescentes rouges, (d) bordure de plaie d'excision 24 h après applications des NP de PLA fluorescentes rouges. En bleu (DAPI) le marquage des noyaux des cellules, en vert de l'actine (phalloïdine Alexafluor 488) et en rouge des NP de PLA fluorescentes.

III. Résumé des résultats IV

Pour résumer, ces observations précliniques préliminaires ont permis de mettre en évidence de faibles effets positifs des NP de PLA nues et des NP de PLA-FGF2 sur la vitesse de fermeture des plaies d'excision chez la souris C57BL/6 par rapport au FGF2 libre et au contrôle non traité. Ainsi, afin de mieux mettre en évidence les potentiels effets des NP de PLA fonctionnalisées il est intéressant d'utiliser un modèle de souris diabétique dans lequel la cicatrisation est ralentie.

L'étude de biodistribution de NP de PLA fluorescentes a été initiée par des essais exploratoires, et a montré que les NP sont toujours présentes au niveau de la plaie 24 h après application. La pénétration des NP de PLA fluorescentes est similaire chez les souris saines et diabétiques. Dans le modèle de brûlure nous avons remarqué que ces NP restent en surface de la brûlure alors que pour les plaies d'excision elles sont localisées sur les bordures de la plaie et dans les couches les plus profondes de la peau.

Résultat V. Etude d'un composite constitué d'un réseau de pectine oxydée et de gélatine pour accélérer la cicatrisation

Résultat V. Etude d'un composite constitué d'un réseau de pectine oxydée et de gélatine pour accélérer la cicatrisation

Introduction

En parallèle des recherches précliniques utilisant la bioingénierie, les thérapies à base de facteurs de croissance, les cellules souches, les acides nucléiques, les thérapies dites « traditionnelles » basées sur des composés d'origine naturelle, comme les extraits de plantes sont des alternatives intéressantes. En effet, elles ont montré leur relative efficacité et améliorent l'accès aux soins dans les pays en développement en contournant les obstacles d'accès aux thérapies modernes, notamment les coûts élevés.

Dans ce contexte de cicatrisation en présence de composites naturels, une collaboration avec le Dr Tummalapalli Mythili de l'équipe du Pr Bhuvanesh Gupta du laboratoire de bioingénierie de l'institut de technologie Indien (New Delhi) a été établie pour évaluer *in vitro* et *in vivo* l'efficacité de pansements à base de pectine oxydée et de gélatine (OP-Gel) contenant des principes actifs d'origine naturelle (curcumine et aloé vera) ou non (les particules d'argent (NS) et un antibiotique, la ciprofloxacine). Ces pansements sont composés d'une compresse de coton non tissé dans laquelle est incorporé un réseau de pectine oxydée et de gélatine. La pectine est un polysaccharide anionique issu des parois cellulaires des plantes. En plus d'être biocompatible et biodégradable, la pectine d'agrumes et ses dérivés présentent des effets anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, antimicrobiens. La gélatine est un mélange protéique d'origine animale, aux propriétés hémostatiques. Tout comme la pectine, la gélatine est favorable à l'adhésion, la prolifération et la migration cellulaire. Leurs propriétés intrinsèques et leur nature hydrocolloïde en font des biopolymères intéressants pour la fabrication des pansements.

Mon travail a consisté à concevoir et mettre en œuvre les expériences *in vitro* de cytotoxicité et les expériences *in vivo* d'efficacité, en utilisant le modèle murin de plaie d'excision précédemment présenté. L'histologie a été réalisée en collaboration avec la plateforme

Résultat V. Etude d'un composite constitué d'un réseau de pectine oxydée et de gélatine pour accélérer la cicatrisation

PrimaTiss (Naïma El Kholti). Les résultats obtenus ont mené à la publication de deux articles en deuxième auteur (articles 3 et 4).

Article 3 “Drug loaded composite oxidized pectin and gelatin networks for accelerated wound healing”

Tummalapalli M, Berthet M, Verrier B, Deopura BL, Alam MS, Gupta B.

International journal of pharmaceutics.

2016; 505(1-2):234-45. doi: 10.1016/j.ijpharm. 2016.04.007. PubMed PMID: 27063849.

Des biocomposites ont été fabriqués avec de la pectine oxydée (OP), de la gélatine et du tissu de coton non tissé. En raison de leurs propriétés, ces matrices peuvent influencer sur le processus de cicatrisation et la prolifération des cellules. La ciprofloxacine est un antibiotique à large spectre et les particules d'argent (NS) sont des agents antimicrobiens qui limitent le recours aux antibiotiques et sont efficaces contre plus de 200 souches de bactéries et de champignons. Un nouveau procédé de réduction *in situ* a été suivi pour synthétiser le pansement à base de particule d'argent (OP-Gel-NS). La ciprofloxacine a également été incorporée dans la matrice OP-Gel pour produire des pansements OP-Gel-Cipro.

Les effets *in vitro* et *in vivo* de ces pansements élaborés ont été évalués et comparés à celui d'un pansement commercialisé (Bactigras®). Les pansements ont été caractérisés selon leur morphologie et la quantité de ciprofloxacine et de NS relarguées des biocomposites. Leurs activités antibactériennes ont été mises en évidence, ainsi que la propriété antioxydante des pansements OP-Gel-NS. La toxicité de ces pansements a été mesurée *in vitro* sur des cellules NIH3T3. L'activité cicatrisante de ces pansements a été évaluée par suivi macroscopique de la fermeture de la plaie dans le temps sur un modèle de plaie d'excision sur souris C57BL/6J et par analyse histologique du tissu cicatrisé. Il a été montré que les pansements OP-Gel-NS ont une activité antimicrobienne de 100% à faible chargement en NS (3,75 mg/cm²) et que les pansements OP-Gel chargés à 1% de ciprofloxacine ont un pouvoir antimicrobien élevé. Une augmentation progressive de l'activité antioxydante des OP-Gel-NS est observée avec l'augmentation de la teneur en argent, l'activité antioxydante maximale est de 25% pour une teneur en argent de 10 mg/cm². Lorsque les pansements OP-Gel et OP-Gel-Cipro sont mis en culture avec des fibroblastes, ces derniers ont proliféré normalement alors que les pansements OP-Gel-NS induisent une cytotoxicité et le pansement Bactigras® induit une lyse complète des fibroblastes. Les pansements OP-Gel-NS ont entraîné une accélération du processus de cicatrisation, qui est complète dans les 12 jours, tandis que les plaies traitées avec des pansements OP-Gel-Cipro ont cicatrisé dans un temps similaire à celui du Bactigras®. L'analyse

Résultat V. Etude d'un composite constitué d'un réseau de pectine oxydée et de gélatine pour accélérer la cicatrisation

histologique des tissus cicatrisés a révélé que les traitements OP-Gel-NS et OP-Gel-Cipro ont entraîné un dépôt de collagènes organisés, une néovascularisation contrairement aux tissus cicatrisés spontanément ou avec les pansements Bactigras[®]. De plus, les pansements à base d'OP-Gel ont montré une faible toxicité et une forte capacité de cicatrisation. Les bénéfices de ces pansements sont supérieurs à ceux du pansement commercial, par conséquent ils pourraient être considérés comme de potentiels candidats pour le traitement efficace des plaies cutanées.



Drug loaded composite oxidized pectin and gelatin networks for accelerated wound healing



Mythili Tummalapalli^a, Morgane Berthet^b, Bernard Verrier^b, B.L. Deopura^a, M.S. Alam^c, Bhuvanesh Gupta^{a,*}

^a Bioengineering Lab, Department of Textile Technology, Indian Institute of Technology, New Delhi 16, India

^b Laboratory of Tissue Biology and Therapeutic Engineering, IBCP, UMR 5305 CNRS-UCBL-Lyon Cedex 07, France

^c Department of Chemistry, Jamia Hamdard, New Delhi 62, India

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 January 2016

Received in revised form 2 April 2016

Accepted 4 April 2016

Available online 5 April 2016

Keywords:

Oxidized pectin

Gelatin

Infection control

Cell compatibility

Wound healing

Biocomposite

ABSTRACT

Biocomposite interactive wound dressings have been designed and fabricated using oxidized pectin (OP), gelatin and nonwoven cotton fabric. Due to their inherent virtues of antimicrobial activity and cytocompatibility, these composite structures are capable of redirecting the healing cascade and influencing cell attachment and proliferation. A novel *in situ* reduction process has been followed to synthesize oxidized pectin-gelatin-nanosilver (OP-Gel-NS) flower like nanohydrocolloids. This encapsulation technology controls the diffusion and permeation of nanosilver into the surrounding biological tissues. Ciprofloxacin hydrochloride has also been incorporated into the OP-Gel matrix to produce OP-Gel-Cipro dressings. While OP-Gel-NS dressings exhibited 100% antimicrobial activity at extremely low loadings of 3.75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, OP-Gel-Cipro dressings were highly antimicrobial at 1% drug loading. While NIH3T3 mouse fibroblasts proliferated remarkably well when cultured with OP-Gel and OP-Gel-Cipro dressings, OP-Gel-NS hindered cell growth and Bactigras[®] induced complete lysis. Full thickness excisional wounds were created on C57BL/6J mice and the wound healing potential of the OP-Gel-NS dressings led to accelerated healing within 12 days, while OP-Gel-Cipro dressings healed wounds at a rate similar to that of Bactigras[®]. Histological examination revealed that OP-Gel-NS and OP-Gel-Cipro treatment led to organized collagen deposition, neovascularization and nuclei migration, unlike Bactigras[®]. Therefore, the OP-Gel-NS and OP-Gel-Cipro biocomposite dressings exhibiting good hydrophilicity, sustained antimicrobial nature, promote cell growth and proliferation, and lead to rapid healing, can be considered viable candidates for effective management.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The modern concept of interactive wound dressings envisages a wound healing process in which the bioactive components incorporated in the dressing influence the physiological processes and direct the healing cascade. It has been proved that healing under a wet environment is augmented through easy migration of the extracellular matrix proteins and enhanced activity and availability of growth factors (Eaglsstein, 2001; Balakrishnan et al., 2005). Hydrogels and hydrocolloids are being widely used in this respect to maintain a moist environment at the wound site and aid the healing process. Due to their high water contents, skin like consistency and biocompatibility, hydrogels are expected to

promote healing and enhance reepithelialization (Singh and Pal, 2008). Furthermore, such hydrophilic wound dressings would preclude trauma to the patient during ambulation or dressing removal. A hydrogel material that can influence the healing cascade and provide sustained antimicrobial activity is expected to lead to accelerated wound healing (Vowden and Vowden, 2014; Mogoşanu and Grumezescu, 2014; Broughton et al., 2006). Taking this as our objective, in the current study, we attempted to develop polysaccharide-protein network structures that can inherently influence the healing cascade and enhance the tissue regeneration process.

Pectin is an anionic polysaccharide obtained from the cell walls of terrestrial plants. In addition to being biocompatible, biodegradable and non-cytotoxic, pectin is a hydrocolloid in nature and therefore is suitable for wound healing applications. The presence of hydroxyl, carboxyl and carboxymethyl groups on the backbone chain renders it readily susceptible to functionalization and

* Corresponding author.

E-mail address: bgupta@textile.iitd.ernet.in (B. Gupta).

modification. Pectin and its derivatives are considered highly suitable for wound healing applications. The high level of esterified galacturonic acid residues in pectin is responsible for its strong anti-inflammatory effect leading to the suppression of inflammatory enzymes such as iNOS and COX-2 (Birch et al., 2015). Chemically sulfated citrus pectin fractions with good antithrombotic properties have been developed which could be used for wound care (Cipriani et al., 2009). The sulphated pectins directly inhibited α -thrombin even in the absence of heparin co-factor II and exhibited 100% effectiveness against venous thrombosis. When papain was immobilized in pectin and used for wound debridement, a 20% faster healing was observed in the first four days alone (Jáuregui et al., 2009). Oxidized pectin and carbonyl chitosan membranes were developed by *in situ* cross-linking were found to be non-hemolytic and cytocompatible (Fan et al., 2012). Pectin is a natural anti-glycation agent and has been used beneficially to treat healing impaired wounds. Aerosols of collagen-pectin microparticles were developed using an electro-spraying method for diabetic wound treatment and lung regeneration (Jayakumar et al., 2014). They exhibited high and sustained antimicrobial activity and good cell adhesion and proliferation. In our previous communication, we have reported the *in situ* synthesis of nanosilver within an oxidized pectin matrix (Tummalapalli et al., 2015). Such core-shell materials are expected to exhibit long term antimicrobial activity due to their controlled release behaviour. Therefore, these nanohydrocolloids have been used in the current study to synthesize nanosilver based wound dressings.

Gelatin, on the other hand, is a proteinaceous derivative deemed suitable for skin regeneration applications due to its non-immunogenicity, cell adhesion behaviour and blood coagulation characteristics. Gelatin sponges intended for rapid haemostasis in acute injury and surgical situations are available commercially. Hajosch et al. developed gelatin sponges capable of inducing haemostasis in less than a minute during surgeries (Hajosch et al., 2010). The haemostatic action is based on platelet damage at the contact of blood with gelatin, which activates the coagulation cascade. Gelatin has been used in combination with various natural and synthetic polymeric systems to fabricate wound dressings. Gelatin and gelatin-dendrimer nanofiber constructs were designed for drug delivery and wound care (Dongargaonkar et al., 2013). These networks were found to be capable of high antibacterial efficiency and anti-inflammatory effect. Gelatin-montmorillonite composite hydrogels were prepared in which ciprofloxacin was intercalated in the layered silicate structure (Kevadiya et al., 2014). The authors observed a sustained drug release profile from the nanocomposite structures and these hydrogels induced wound healing progression by enhanced cell migration and proliferation. Chitosan, honey and gelatin sheets were developed as burn dressings (Wang et al., 2012). Honey and chitosan were responsible for good antibacterial activity and low inflammation, while gelatin promoted cell migration and growth.

Polysaccharide-protein conjugates are expected to exert a synergistic effect on the mechanical properties, cytocompatibility and tissue regeneration features. Therefore, in the current study, we have developed *in situ* crosslinked oxidized pectin and gelatin (OP-Gel) matrices loaded with bioactive agents such as nanosilver or ciprofloxacin for accelerated wound healing. While ciprofloxacin is a broad spectrum antibiotic, nanosilver is an antimicrobial agent that precludes the issue of antibiotic resistance and is effective against more than 200 strains of bacteria, viruses and fungi (Madhumathi et al., 2010). These antimicrobial biopolymeric networks were then coated on nonwoven cotton to fabricate "biocomposite" wound dressings, where the cotton substrate acts as a support layer or reinforcement and the biopolymer coating is the matrix. The *in vitro* and *in vivo* behaviour of the dressings thus

designed has been compared against those of a commercially available dressing, Bactigras[®].

2. Experimental

2.1. Materials, cells and animals

Citrus pectin (Mw~30,000 g/mol, degree of esterification~72%) and ciprofloxacin hydrochloride were purchased from CDH Fine Chemicals, India. Gelatin, from porcine skin (high gel strength) was procured from Fluka Analytical, Germany. Periodic acid and silver nitrate were purchased from Merck Chemicals, India. Glycerol, nitric acid and isopropanol were obtained from Fisher Scientific, India. Luria broth and agar-agar, were obtained from Hi Media Laboratories, India. Bacterial strains of *Escherichia coli* (*E.coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) were provided by IIT Delhi. Ultra-pure water (18 M Ω cm) from Millipore Milli-Q system, India was used in all experiments. All chemicals were of analytical grade and used without further purification. Nonwoven cotton fabric (21.24 GSM and 67% porosity) was isolated from Surgipad dressings manufactured by Johnson & Johnson Limited, India. Bactigras[®], a commercial dressing containing chlorhexidine acetate, was procured from Smith & Nephew Healthcare Pvt. Ltd., India.

Mice NIH3T3 fibroblast cells were purchased from CelluloNet (Lyon, France). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with a solution of fetal bovine serum (10%, v/v, FBS) and antibiotics (penicillin and streptomycin, 5%, v/v) at 37°C under 5% CO₂. NIH3T3 were harvested with trypsin EDTA solution at 80% confluence.

Twenty-five C57BL/6J mice (male, age 10 weeks, 20–25 g) from Janvier Laboratories (Le Genest St Isle, France) were used in this study. The ambient temperature and relative humidity were maintained constant in the animal facility. Mice were acclimatized for one week before the experiments, and kept with free access to food and water. All animal experiments conducted at IBCP, Lyon were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the University of Lyon 1, France and complied with French legislation and ethics committee guidelines (Permission number BH2011-49, dated January 9, 2012).

2.2. Fabrication of biocomposite dressing

Periodate oxidized pectin (OP) of aldehyde content 2.101 mmol/g was synthesized according to our previously reported work (Gupta et al., 2013b). The OP thus synthesized was then crosslinked with gelatin at optimized reaction conditions to prepare OP-Gel matrices, as described in our previous study (Gupta et al., 2014). A 4% OP-Gel (70/30) crosslinked matrix was prepared according to the protocol for 16 h at 60°C, pH 6.4 and with 40% glycerol. Two different types of wound dressings were developed, with nanosilver or ciprofloxacin. Silver nitrate (1–4 wt%) was added to the OP-Gel solution at the end of 16 h and allowed to react for 5 min to obtain oxidized pectin-gelatin-nanosilver solutions (OP-Gel-NS). For the oxidized pectin-gelatin-ciprofloxacin dressings (OP-Gel-Cipro), ciprofloxacin hydrochloride (0.5–2.5 wt%) was added to the OP-Gel solution at the end of 16 h crosslinking time and allowed to react for 5 min. A nonwoven cotton fabric was dipped into the OP-Gel and OP-Gel-drug solutions, taken out and dried in the dark at room temperature to fabricate biocomposite structures.

2.3. High resolution transmission electron microscopy (HRTEM)

The HRTEM imaging of the OP-Gel-NS matrices was conducted on a TECNAI 200kV TEM (Fei, Electron Optics, Netherlands) machine. A few drops of the OP-Gel-NS solutions obtained at the

Résultat V. Etude d'un composite constitué d'un réseau de pectine oxydée et de gélatine pour accélérer la cicatrisation

236

M. Tummalapalli et al./International Journal of Pharmaceutics 505 (2016) 234–245

end of 5 min reduction time were cast onto a carbon coated copper mesh grid. The grids were subsequently stained with 0.1 M phosphotungstic acid and dried at 60°C in a vacuum oven. These grids were then used for imaging purposes.

2.4. Surface morphology of biocomposite dressings

The surface morphology of the uncoated cotton fabric, OP-Gel-NS and OP-Gel-Cipro dressings was studied under a Zeiss EVO Scanning Electron Microscope Model EVO 50 (Zeiss EVO, UK) after a thin coating of gold was deposited on the surface of the dressings using a BIO-RAD POLARON Sputter Coater. The changes in surface morphology after drug release from OP-Gel-NS and OP-Gel-Cipro were also monitored after keeping the dressings in contact with simulated body fluid (SBF) of pH 7.4 for 2 h at 37°C.

2.5. Antimicrobial properties of biocomposite dressings

Antibacterial studies of the dressings were carried out by colony count and zone inhibition methods, according to test method AATCC 100-1998 (Saxena et al., 2011). The antibacterial activity was monitored against a Gram-positive bacterial strain *S.aureus* and a Gram-negative bacterial strain *E.coli*. The antibacterial activity of OP-Gel-NS and OP-Gel-Cipro dressings was compared with that of a control dressing (unmodified nonwoven cotton fabric).

2.5.1. Zone of inhibition

Colonies of *S.aureus* and *E.coli* obtained from an overnight culture were suspended in Luria Broth and the turbidity was adjusted to 0.5 McFarland standards. 200 µL of this suspension was spread on Luria-Agar plates to obtain a semi-confluent growth. Control, OP-Gel-NS and OP-Gel-Cipro dressings were then placed on the inoculated medium and the plates were kept for incubation for 24 h at 37°C and subsequently, inhibition zones were observed.

2.5.2. Bacterial colony count method

Colonies of *S.aureus* and *E.coli* obtained from an overnight culture were suspended in Luria Broth and the turbidity was adjusted to 0.5 McFarland standards. The samples (~20 mg) were placed in contact with 6 mL bacterial suspension in Luria Broth having 10⁵ CFU mL⁻¹. All suspensions were vortexed and incubated at 37°C for 24 h. The suspensions were vortexed again and dilutions were prepared and colonies were counted by the spread plate method. The inoculum (200 µL) was uniformly spread on nutrient agar plate using a sterile cotton swab. Plates were incubated at 37°C and the colonies were counted after 24 h. All experiments were conducted under sterile conditions. Antibacterial efficiency (R) was calculated according to the following equation:

$$R(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

where, A is the number of bacteria recovered from the inoculated test specimen after 24 h incubation with control and B is the number of bacteria recovered after inoculation with test specimen.

2.6. Free radical scavenging potential of OP-Gel-NS dressings

The free radical scavenging activity of OP-Gel-NS dressings was determined according to the method prescribed by Lo Nostro et al. (Lo Nostro et al., 1999). Briefly, 20 mg of OP-Gel-NS dressings with varying NS content were incubated with diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) (10⁻⁴ mol/L in ethanol) for 20 min. After incubation, the absorbance of the DPPH solution was measured by using Shimadzu UV-2450 spectrophotometer (Shimadzu, Singapore) at 517 nm against ethanol as blank. Each experiment was repeated five times

to check the reproducibility. DPPH ethanol reagent without sample was used as control and the free radical scavenging activity was calculated as follows:

$$R(\%) = \left[\frac{A_0 - A_{20}}{A_0} \right] \times 100$$

where, R is the percentage free radical scavenging activity, A₀ and A₂₀ are the absorbance values of control sample and DPPH solution after incubation with the OP-Gel-NS dressings, respectively.

2.7. In vitro release behaviour

2.7.1. Silver release analysis

In vitro silver release studies were performed at 37°C using a Franz diffusion cell with separate donor and receptor compartments as described by Gupta et al. (2013a). The receptor compartment, which has a capacity of 30 mL, was filled with SBF of pH 7.4. A nylon net, upon which a thin egg shell membrane was mounted, was placed between the donor and receptor compartments. OP-Gel-NS dressing of 1 × 1 cm² size was placed over the egg shell membrane and nylon net so that it is in contact with the medium of the receptor compartment at all times. The silver release profile was obtained by sampling 3 mL aliquots from the receptor compartment solution at predetermined time intervals over a period of 48 h. The receptor compartment was replenished with an equal volume of SBF every time a sample was withdrawn. Each experiment was repeated three times. A graphite furnace atomic absorption analysis spectrometer (AAS) (Varian, Australia) was employed to detect the silver content in each aliquot. The cumulative amount of silver permeated per square centimeter of dressing was plotted against time. To derive the total amount of silver loading, 20 mg of OP-Gel-NS dressing was digested in 30 mL of 70% nitric acid at room temperature and a 3 mL aliquot of this solution was analyzed by AAS.

2.7.2. Ciprofloxacin release studies

To study the release of drug from OP-Gel-Cipro dressings, a Franz diffusion cell was once again utilized as described above. The absorbance maximum of each aliquot was measured at a wavelength of 268 nm using a Shimadzu UV-2450 spectrophotometer (Shimadzu, Singapore) against SBF as blank (Agarwal et al., 2013). Each experiment was repeated five times. The amount of drug released was then calculated according to a previously obtained calibration equation and the cumulative release was plotted against time.

2.8. In vitro cell viability analysis

The cytocompatibility of UV sterilized OP-Gel-drug dressings was evaluated on NIH3T3 mouse fibroblast cells using a MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay (Promega, Germany). NIH3T3 cells (5000/well) were seeded in a 96-well culture plate with culture medium consisting of DMEM medium (Gibco® by Life Technologies, USA) containing 10% fetal calf serum and antibiotics (1% penicillin and streptomycin) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The dressings (6 mm Ø) were added to experimental wells, and cells were incubated for 24 h, 48 h and 72 h respectively. The cell viability assay was carried out using a MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay using a fluorescent substrate according to the manufacturer's instructions. The fluorescent assay allows the measurement of the number of live cells in cell populations by measuring the live-cell protease activity. A fluorogenic, cell-permeant, peptide substrate (glycyl-phenylalanylaminofluoro coumarin, GF-AFC) enters intact cells, where it is cleaved by the live-cell protease activity to release AFC and generate a fluorescent signal that is proportional to the

number of living cells. For calculation of background fluorescence, control wells containing medium without cells were analyzed. Fluorescence was measured at 400 nm excitation and 505 nm emission wavelengths on an Infinite® M 1000 PRO Microplate reader (Tecan, Switzerland) equipped with a Quad 4 monochromator. The temperature was maintained in the range of 23–25°C. The shaking time and shaking amplitude (linear) were 30 s and 2 mm respectively.

2.9. Cell morphology studies

To analyze the effect of the dressings on the cell morphology, plates incubated for 24 h and 48 h were examined under a NIKON TE 300 Bright Field Inverted Microscope (Nikon, Japan). Wells containing cells without any medium were treated as the control.

2.10. Wound healing studies

24 h prior to the surgery, mice were anesthetized under isoflurane and the dorsal hair was removed using a depilatory cream, to avoid irritation. On day 0, the mice were exposed to isoflurane (Tepper et al., 2010; Jiang et al., 2013; Chereddy et al., 2014) and a full thickness wound was created on the exposed dorsal skin using a sterile biopsy punch of 8 mm Ø (Kai Medical, Germany). Immediately after wounding, a silicon splint of 8 mm inner diameter was placed around the wound and fixed with Ethicon™ Mersutures to prevent local skin contraction (Wang et al., 2013). Subsequently, UV sterilized circular dressings of 8 mm Ø (OP-Gel, OP-Gel-NS (3.75 µg/cm²), OP-Gel-Cipro (2.27 mg/cm²), Bactigras® (0.5% chlorhexidine acetate)) were placed on the wound. In the control group, the wounds were left untreated to observe spontaneous healing. The entire area including the surrounding silicone ring was covered with a Tegaderm™ (3M) sterile transparent dressing. On day 4 postsurgery, the Tegaderm™ covering and the dressing were removed and on day 8 the sutures were removed. The mice were checked periodically and photographs were once again taken on days 12 and 21. On day 21, the healed tissue was harvested after sacrifice of mice under anesthesia for histological examination. The extent of wound closure was estimated by measuring the wound area using ImageJ software and the percentage of wound contraction was calculated according to the given equation.

2.11. Histological examination

Healthy tissue and regenerated tissue were excised from the wound site on day 1 and day 21 respectively. These tissues were fixed in freshly prepared cold 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS) at 4°C overnight, and embedded in paraffin. 6 µm thick sections were cut using Leica CM3050 S cryostat (Leica GmbH, Germany) and were stained with Goldner Masson's Trichrome to identify collagen formation and neovascularization. Images were taken with a Leica DM7500 microscope (Leica GmbH, Germany).

2.12. Statistical analysis

The results were expressed as mean ± S.D. The significance of differences between average values of different experimental treatments and controls was assessed by the Student's *t*-test. *P* ≤ 0.05 was considered to be significant.

3. Results and discussion

Pectin is an anionic polysaccharide, poly(1,4-galacturonic acid), containing vicinal diols on its backbone chain. Upon reaction with periodic acid, these diols present on the C2 and C3 units of the glucopyranose ring undergo oxidation via the Malaprade mechanism to yield a dialdehyde structure (Kim et al., 2000; Li et al., 2009; Vicini et al., 2004). We conducted a comprehensive study on the influence of reaction parameters on the periodate oxidation of pectin and the results have been presented in our previous work (Gupta et al., 2013b). In the current study, pectin was oxidized by periodic acid to produce oxidized pectin (OP) with an aldehyde content of 2.101 mmol/g. The aldehyde groups thus generated play a dual role. When reacted with gelatin, an *in situ* crosslinking reaction occurs between the aldehyde groups in OP and the amino groups of lysine and hydroxylysine units of gelatin to form Schiff bases (Gao et al., 2012). A detailed study on the *in situ* crosslinking of OP and gelatin was presented in our earlier work (Gupta et al., 2014). On the other hand, the aldehyde moieties in OP are capable of reducing silver salts to nanosilver, similar to other sugars like glucose and fructose. Earlier, we showed that a large number of aldehyde functional groups are left unreacted even after crosslinking with gelatin (Gupta et al., 2014). Therefore, in our current

$$\text{Wound contraction (\%)} = \frac{\text{Wound area on day 0} - \text{Wound area on day } x'}{\text{Wound area on day 0}} \times 100$$

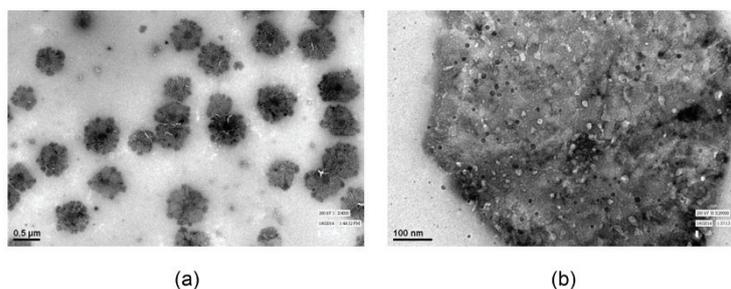


Fig. 1. HRTEM studies of OP-Gel-NS nanoparticles at (a) 0.5 µm resolution and (b) 100 nm resolution. Reaction time 5 min, reaction temperature 60°C, pH 6.4.

Résultat V. Etude d'un composite constitué d'un réseau de pectine oxydée et de gélatine pour accélérer la cicatrisation

238

M. Tummalapalli et al./International Journal of Pharmaceutics 505 (2016) 234–245

project, we have designed nanosilver incorporated biocomposite dressings by exploiting the reducing characteristics of the aldehyde groups left unreacted after crosslinking with gelatin.

In a recent study that we conducted on the reduction process of silver nitrate to nanosilver by OP, it was established that the reduction is instantaneous and within 5 min, OP-NS sheath-core structures with average particle size of 280 nm were formed; the average size of the nanosilver entities at the core was found to be 100 nm (Tummalapalli et al., 2015). Ergo, we have maintained a reaction time of 5 min to synthesize nanosilver particles in the OP-Gel matrix to form OP-Gel-NS solutions. The nanoparticles obtained were characterized by HRTEM and the results are presented in Fig. 1. It could be seen very clearly that the silver nanoparticles are once again embedded in an OP-Gel matrix, thus forming sheath-core structures. It seems as though flower like nanostructures are formed with nanosilver at the core with a surrounding polymeric halo. When a "petal" was examined at high resolutions, it was found that a large number of discrete nanoparticles were dispersed within the polymeric medium. The average size of the silver nanoparticles was observed to be in the range of 8–15 nm.

The schematic of the biocomposite dressing fabrication is shown in Fig. 2. Nonwoven cotton fabrics were chosen for this study due to their desirable features of excellent hydrophilicity and porosity. A dip coating method was adopted to develop the dressings. Initially, to understand the effect of polymer concentration on the add-on and rigidity of the cotton fabric, the OP-Gel content was varied from 2 to 8%. It was found that at a concentration of 4%, the add-on was 62.35% and the fabric retained a comfortable and flexible feel. That being the case, a 4% OP-Gel concentration was deemed to be optimum and drug loaded solutions were prepared. Along with physical adsorption of OP-Gel-drug colloidal solution on the fabric surface, hydrogen bonding and van der Waals interactions take place between the polymeric matrix and the functional groups on the backbone of cotton fibres, thus resulting in a cumulative adhesion of the OP-Gel-drug coating on the surface of the fabric.

The morphologies of the OP-Gel-NS and OP-Gel-Cipro dressings were studied using a scanning electron microscope. The images are portrayed in Fig. 3. Compared to the unmodified cotton fabric in Fig. 3(a), a uniform and smooth deposition of the polymeric matrix can be observed in Fig. 3(b) and (c), representing the OP-Gel-drug. No evidence of phase separation could be found, thus confirming the homogeneity of the composite dressing. To decipher the behaviour of the dressings when in contact with the exudating

wound, the OP-Gel-NS and OP-Gel-Cipro dressings were kept in contact with SBF for 2 h and subsequently, the morphologies were observed as shown in Fig. 3(d) and (e). A clear erosion of the OP-Gel-drug matrix was visible in both the cases. The changes in the morphological characteristics are extremely significant since they have a critical influence on the drug release mechanism from the polymeric matrices. Drug release from polymeric formulations is mostly controlled by one or more physical processes, including (a) hydration, (b) swelling & gel formation, (c) diffusion, and (d) erosion of the matrix (Maver et al., 2015). While most natural or synthetic wound dressings rely on a combination of one or two of the aforementioned drug release mechanisms, the current OP-Gel dressings are subject to all four. Due to their hydrophilic nature, OP-Gel hydrocolloids undergo hydration upon contact with SBF, followed by swelling and gel formation. Subsequently, the overlapping processes of drug diffusion and matrix erosion occur. Initially, the erosion takes place from the surface of the dressing; gradually, as the hydrocolloid swells, uncrosslinked chains from within the bulk of the gel slowly diffuse into the SBF and are solubilised, thus leading to a weight loss. At the same time, drug particles entrapped within the polymeric particle diffuse through the pores of the swollen matrix and interact with the milieu.

One of the major factors contributing to healing impairment is the generation of oxidative stresses at the wound site. Reactive oxygen species, including the superoxide radical species ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and the hydroxyl radical ($\bullet OH$) species, which are responsible for the pathogenesis of chronic wounds are generated and perpetuate inflammatory processes (Moseley et al., 2003; Schäfer and Werner, 2008). Therefore, it is necessary to develop an interactive wound care system that can function as an antioxidant and scavenge free radicals at the site of injury. In a study on green synthesized nanoparticles, it was proposed that nanosilver could function as a free radical scavenger (Reddy et al., 2014). Consequently, the free radical scavenging activity of OP-Gel-NS dressings of varying silver content was tested using DPPH, a stable free radical. The results of this study are presented in Fig. 4. A gradually increasing free radical scavenging activity was observed with an increase in the silver content, with a maximum of 25% activity at a silver content of $10 \mu g/cm^2$. Nanosilver, when it comes into contact with moisture, is ionized to Ag^+ and electrons released into the ambient surroundings are accepted by DPPH. Such potent antioxidant activity would aid and accelerate the wound healing process by inhibiting free radical generation.

To evaluate the antimicrobial efficacy of the developed OP-Gel-NS dressings, *in vitro* antibacterial tests were conducted using the

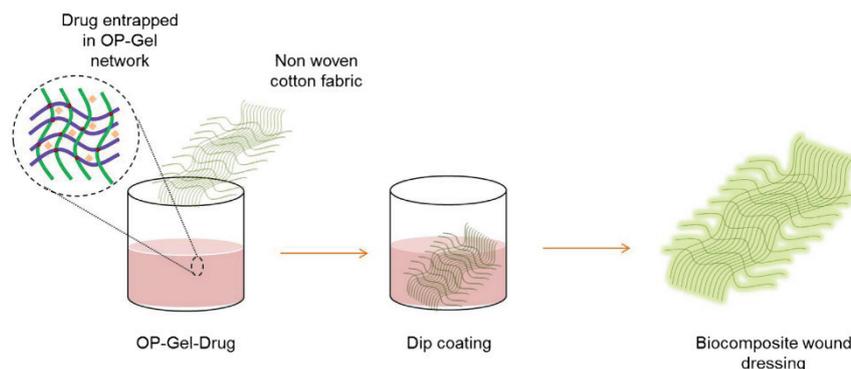


Fig. 2. Schematic of biocomposite dressing fabrication.

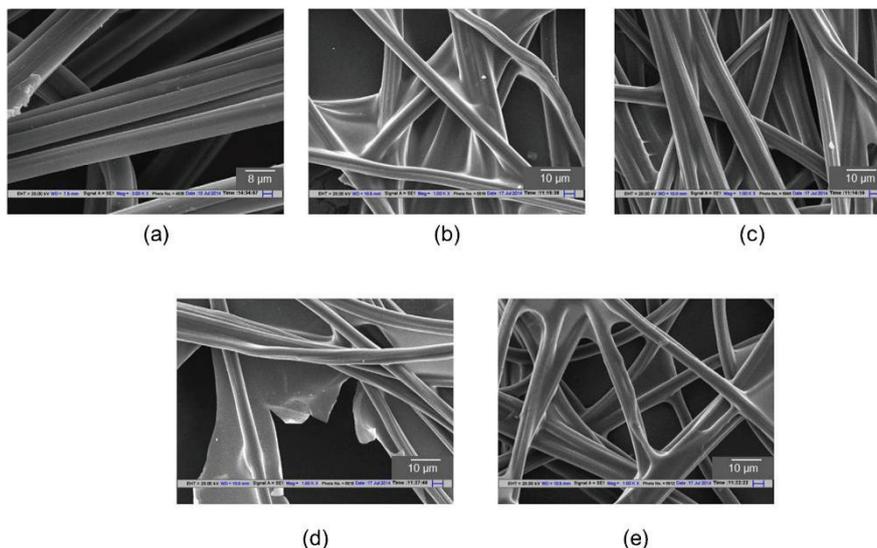


Fig. 3. Morphological analysis of dressings: (a) Unmodified fabric, (b) OP-Gel-NS prior to drug release, (c) OP-Gel-Cipro prior to drug release, (d) OP-Gel-NS after drug release and (e) OP-Gel-Cipro after drug release.

qualitative zone of inhibition method and the quantitative colony count method. The results are presented in Figs. 5 and 6. In the case of OP-Gel-NS dressings (Fig. 5 (a) and (b)), small zones of inhibition were observed at all concentrations from 3.75–10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ against *E.coli* as well as *S.aureus*. This may be due to the leaching of ionic silver retained in the system into the surrounding nutrient medium. From Fig. 6 (b) and (d), it can be clearly understood that the OP-Gel-NS dressings with 3.75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ loading exhibited 100% antibacterial activity. Antibacterial efficiency of OP-Gel-NS dressings with 8 and 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ silver loading have also been evaluated using the colony count method and the results are presented in the supplementary section (Supplementary Information). There are various theories proposed to explain the antibacterial nature of nanosilver. OP-Gel-NS core-shell particles undergo hydration followed by swelling immediately on contact with the moist wound fluid. The untethered silver nanoparticles entrapped within the crosslinked OP-Gel matrix diffuse through the pores of the swollen matrix and are converted from Ag^0 to Ag^+ upon contact with moisture. Subsequently, the Ag^+ ions interact with the thiol groups of requisite enzymes for bacterial respiration, thus leading to cell death (Shahverdi et al., 2007). Alternatively, the Ag^+ ions can interact with the negatively charged cell wall of the bacteria leading to disintegration of the cell membrane. Ag^+ may also interfere with DNA replication resulting in bacterial inhibition. Silver nanoparticles, if sufficiently small, can penetrate through the bacterial cell wall, causing leakage of the cell constituents and thus lead to cell death (Li et al., 2010; Morones et al., 2005).

The antibacterial efficiency of OP-Gel-Cipro dressings has also been evaluated using the same methodology. The zone of inhibition results are presented in Fig. 5(c) and (d), and the colony count formation results are shown in Fig. 6(c) and (f). Very large zones of inhibition are observed even at a low concentration of 0.5% against both types of bacteria. It was expected that the zones would be larger in the case of the Gram-positive *S.aureus* strain, since the Gram-negative *E.coli* strain has a relatively impermeable lipid based outer membrane which slows down the penetration of

the drug. However, contrary to our expectations, much larger zones of inhibition merging with one another were observed in the case of *E.coli* rather than *S.aureus*. From the nutrient-agar plates in Fig. 6(c) and (f), it could be deduced that OP-Gel-Cipro dressings with a drug loading of 1% were potent enough to Exhibit 100% antibacterial activity against both classes of bacteria. Antibacterial efficiency of OP-Gel-Cipro dressings with 0.5, 2 and 2.5% ciprofloxacin hydrochloride loading have also been evaluated using the colony count method and the results are presented in the supplementary section (Supplementary Information). Ciprofloxacin is a second generation fluoroquinolone antibiotic with a broad spectrum of activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria and is well known for its excellent tissue penetration (Jeong et al., 2008). Hence we concluded from the in

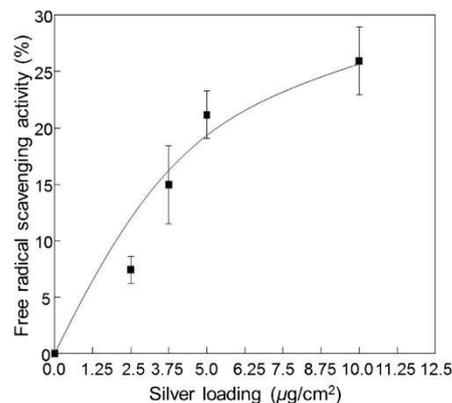


Fig. 4. Free radical scavenging activity of OP-Gel-NS dressings.

Résultat V. Etude d'un composite constitué d'un réseau de pectine oxydée et de gélatine pour accélérer la cicatrisation

240

M. Tummalapalli et al./International Journal of Pharmaceutics 505 (2016) 234–245

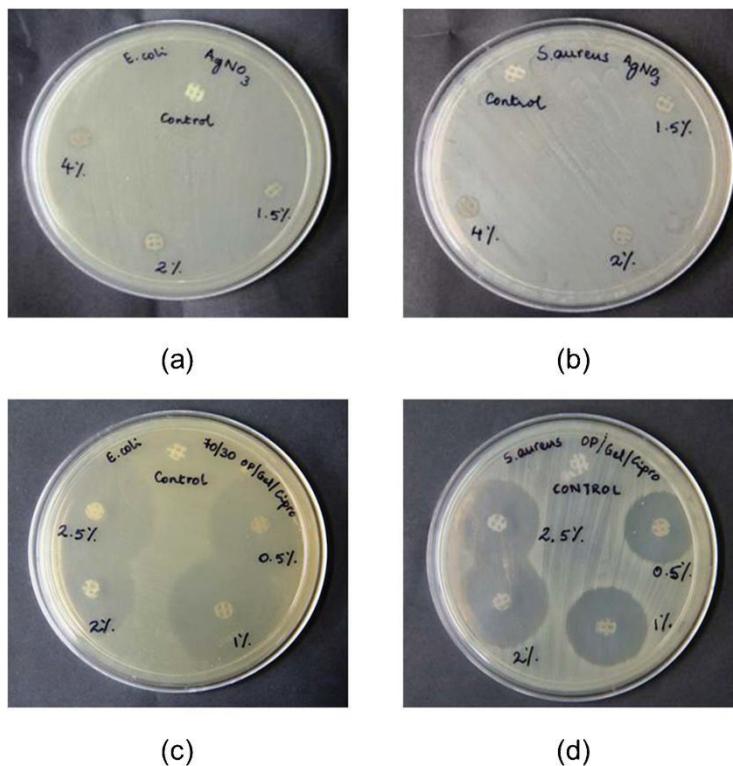


Fig. 5. Antimicrobial evaluation by zone of inhibition: (a) OP-Gel-NS against *E. coli*, (b) OP-Gel-NS against *S. aureus*, (c) OP-Gel-Cipro against *E. coli* and (d) OP-Gel-Cipro against *S. aureus*.

in vitro antibacterial studies that OP-Gel-NS dressings with a silver content of $3.75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and OP-Gel-Cipro dressings with 1% ciprofloxacin hydrochloride content showed excellent antibacterial activity and therefore these dressings were chosen for the *in vivo* animal and *in vitro* cytocompatibility studies.

The toxicity of nanosilver has been cited as a major impediment to widespread use of nanosilver in biomedical applications. In recent years, a lot of research has been devoted to understand the toxicological mechanisms of nanosilver; however, the study is still in its nascent stages. The action of nanosilver is not preferential. It can interact with both healthy human cells and bacterial cells, by releasing Ag^+ ions that act upon the DNA and lead to cell lysis (Lubick, 2008). A study has been conducted to analyze the cytotoxicity of silver nanoparticles of different sizes (Sotiriou and Pratsinis, 2010). They reported that the concentration of Ag^+ ions is higher when fine silver nanoparticles were utilized, while nanoparticles of bigger sizes released lesser quantities of Ag^+ ions. Thus a study regarding the release of silver from the OP-Gel-NS biocomposite dressing was considered imperative, and the release from the optimized OP-Gel-NS dressing containing $3.75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (as calculated by nitric acid digestion) was carried out under simulated physiological conditions. The release profile is shown in Fig. 7. A biphasic release mechanism (burst + sustained) was observed. Initially, a burst release was observed for 2 h and after this time period, a sustained release was noticed. The sustained

release is due to the gradual release of Ag^+ ions from the OP-Gel-NS dressing. However, even at the end of 48 h, only $0.08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ leached out of the system. Therefore, it can be surmised that bacterial infection could be controlled in the very early stages of wound infliction upon treatment with OP-Gel-NS dressings and the antibacterial activity continued for long periods of time. A survey was conducted on commercially available nanocrystalline silver based dressings (ACTICOAT™ Flex 3, ACTISORB® Silver 220, AQUACEL® Ag, Mepilex® Ag, and Silvel®) and it was discovered that the average loading in these dressings varied from 0.033–4.38 mg/cm^2 . Conversely, the optimized OP-Gel-NS dressing has only $3.75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ nanosilver content of which ~2% is released at the end of 2 days. We expect that OP-Gel-NS dressings exhibit diminished cytotoxicity as a consequence of such low levels of Ag^+ ions. This may be due to the entrapment of the silver particles in the polymeric matrix. Evidence based on literature suggests that the entrapment and encapsulation of nanoparticles in the polymer matrix is responsible for the controlled and sustained release phenomena (Li et al., 2015; Shahravan and Matsoukas, 2012). The release is due to a combination of drug diffusion through the matrix as well as erosion of the biopolymer as seen in Fig. 3(d). The release kinetics have been calculated and a non-Fickian diffusion model is predicted (Supplementary Information).

Cumulative drug release profiles were also constructed for OP-Gel-Cipro dressings. In a pattern similar to that of OP-Gel-NS

Résultat V. Etude d'un composite constitué d'un réseau de pectine oxydée et de gélatine pour accélérer la cicatrisation

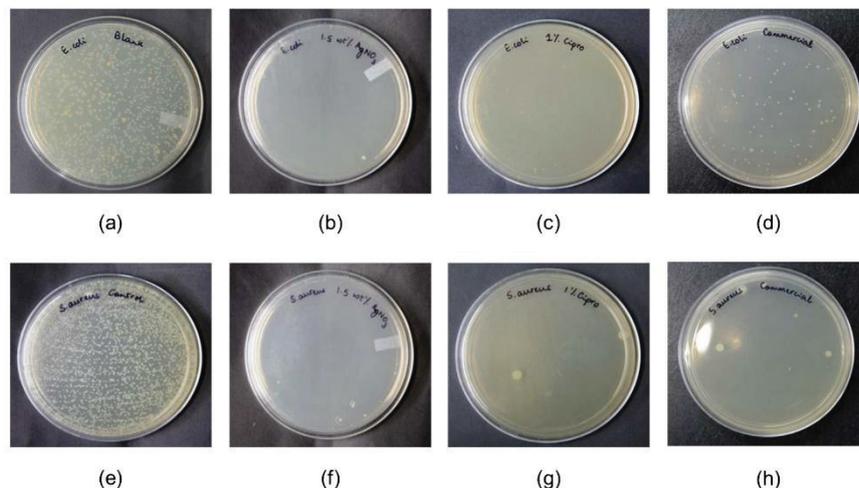


Fig. 6. Antimicrobial evaluation by colony count method against *E.coli*, (a) control fabric (b) OP-Gel-NS (c) OP-Gel-Cipro (d) Bactigras[®] and *S.aureus* (e) control fabric (f) OP-Gel-NS (g) OP-Gel-Cipro (h) Bactigras[®].

dressings, a burst release followed by a sustained release was observed at all loadings of ciprofloxacin hydrochloride, as shown in Fig. 8. However, the drug burst was evident for 6 h beyond which sustained release took place. The optimized OP-Gel-Cipro dressing with 1% ciprofloxacin hydrochloride released $\sim 10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. The release is due to a combination of drug diffusion as well as erosion of the as shown in Fig. 3(e). The drug release kinetics have been calculated for the 1% ciprofloxacin hydrochloride OP-Gel-Cipro dressing and a non-Fickian diffusion model was observed (Supplementary Information).

To analyze the effect of the biocomposite OP-Gel-NS and OP-Gel-Cipro dressings on the cell viability, *in vitro* cytocompatibility tests were conducted on NIH3T3 mouse fibroblasts. In addition to OP-Gel-NS and OP-Gel-Cipro, cells were also incubated with Bactigras[®] and OP-Gel; cells that were left untreated were considered as the control. The results of the cell viability test are shown in Fig. 9. The OP-Gel dressing was found to be amenable to cell growth; validating our earlier claim that *in situ* crosslinking leads to a reduction in the cytotoxicity. While the OP-Gel-NS dressing and Bactigras[®] exhibited severe toxicity, the OP-Gel-Cipro dressings showed good viability at all time periods. From the statistical analysis, it was found that all the groups were significantly different except for the OP-Gel-Cipro dressing treated cells when compared with pristine cells. Further, the changes in cell morphology were examined under a bright field inverted microscope (Supplementary Information). The OP-Gel biopolymeric matrix provided a good surface for cell adhesion and growth. Thus it could be inferred that OP-Gel dressings were extremely cell friendly and any toxicity that arises is due to the drug incorporation. The Bactigras[®] treated cells seemed to have undergone lysis at the end of 48 h. Although viable cells could be observed in OP-Gel-NS dressing treated cells after 24 h, their growth was hindered. At the end of 48 h, the population density of cells was greater; however, the growth hindrance factors persisted. It has been reported in literature that nanosilver induces apoptosis in NIH3T3 mouse fibroblast cells (Lee et al., 2014). A molecular mechanism by which nanosilver induces apoptosis has been proposed (Hsin et al., 2008). Exposure to nanosilver leads to the

release of cytochrome c into the cytosol and translocation of Bax into mitochondria. Bax promotes apoptosis by binding to and antagonizing the Bcl-2 protein.

On the other hand, OP-Gel-Cipro dressing treated fibroblasts appear to have achieved a semi-confluent growth at the end of 24 h. Their morphology was very similar to untreated fibroblasts. After a 48 h time period, the fibroblast population density was much higher and a confluent growth could be observed. In some regions, an ordered arrangement of the fibroblasts could be noticed. Therefore, it was concluded that the OP-Gel-Cipro dressings were capable of cell adhesion and promoted cell growth. A clear mechanism through which ciprofloxacin hydrochloride seems to aid cell growth is not yet known.

Upon confirming the cell viability potentials of the developed dressings, *in vivo* wound healing studies were conducted on C57BL/6J mice using an excisional wound splinting model. In a murine model, wound healing is largely due to contraction due to the

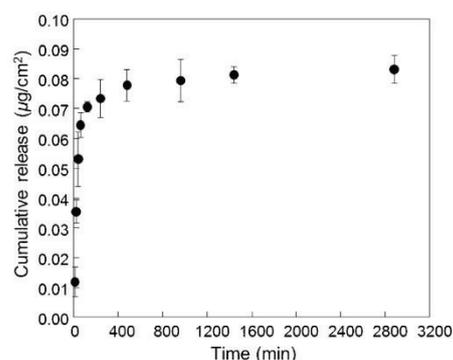


Fig. 7. Drug release profile of OP-Gel-NS dressing. Silver content in sample: $3.75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Release temperature 37°C , pH 7.4.

Résultat V. Etude d'un composite constitué d'un réseau de pectine oxydée et de gélatine pour accélérer la cicatrisation

242

M. Tummalapalli et al./International Journal of Pharmaceutics 505 (2016) 234–245

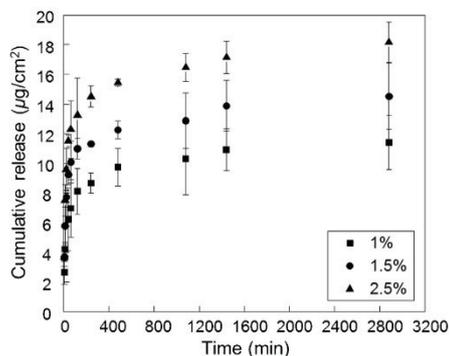


Fig. 8. Drug release profile of OP-Gel-Cipro dressings. Release temperature 37 °C, pH 7.4.

mobility of the skin. However, in a wound splinting model, the mobility of the skin is restricted; thus causing the wound to heal through granulation and reepithelialization in a process similar to wound healing in humans (Wang et al., 2013). The wound healing observations are displayed in Fig. 10 and the comparative reduction in wound areas is depicted in Fig. 11. Acute wound healing proceeds through various processes that overlap – haemostasis, inflammation and cellular migration, proliferation, matrix deposition and tissue remodelling (Eming et al., 2014). The presence of any bioactive components that can affect these pathways can lead to

changes in the wound healing process. OP-Gel dressing in itself was capable of healing and a percentage wound reduction of ~60% was observed in 8 days. On the other hand, OP-Gel-NS dressing treated wounds healed ~80% in the same time period and within 12 days, complete healing was achieved. Gross examination of the wound sites at the end of the study revealed very low scarring. Nanosilver exerts a potent antimicrobial effect and can eliminate any bioburden at the wound site, and leads to such rapid healing. The OP-Gel-Cipro and Bactigras[®] treated wounds healed at the same rate during the entire study period of 21 days. Statistical analysis was carried using a student's *t*-test at a significance level of $P \leq 0.05$. Although there were significant differences between control, OP-Gel-drug, and Bactigras[®] treated wounds on 4th and 8th days, there was no significant difference between control and OP-Gel-NS treated wounds on day 12. This might be due to the large difference in SD.

In addition to the hydroxyl, aldehyde and carboxymethyl functional groups, OP contains carboxylic acid groups on the backbone chain. The presence of such acidic groups confers an antimicrobial nature to OP and these may be responsible for the fast healing that has been observed. Furthermore, the esterified galacturonic acid residues on the OP backbone exert a strong anti-inflammatory effect (Birch et al., 2015). Apart from inducing haemostasis, gelatin also provides a suitable surface for cell attachment and proliferation, thus redirecting the healing cascade and enhancing the wound healing process. Balakrishnan et al. previously reported the synthesis of an *in situ* forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin (Balakrishnan et al., 2005). The basic crosslinking principle between the current OP-Gel systems and oxidized alginate/gelatin systems is the same. Therefore, we have attempted to compare the

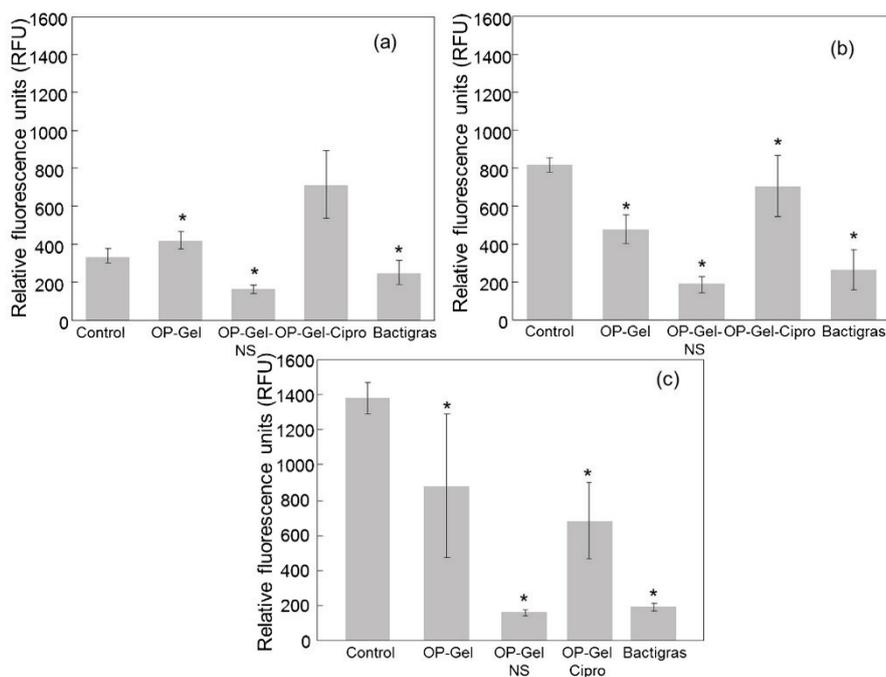


Fig. 9. *In vitro* cell viability assay against NIH3T3 mouse fibroblast cells: (a) after 24 h, (b) after 48 h and (c) after 72 h.

Résultat V. Etude d'un composite constitué d'un réseau de pectine oxydée et de gélatine pour accélérer la cicatrisation

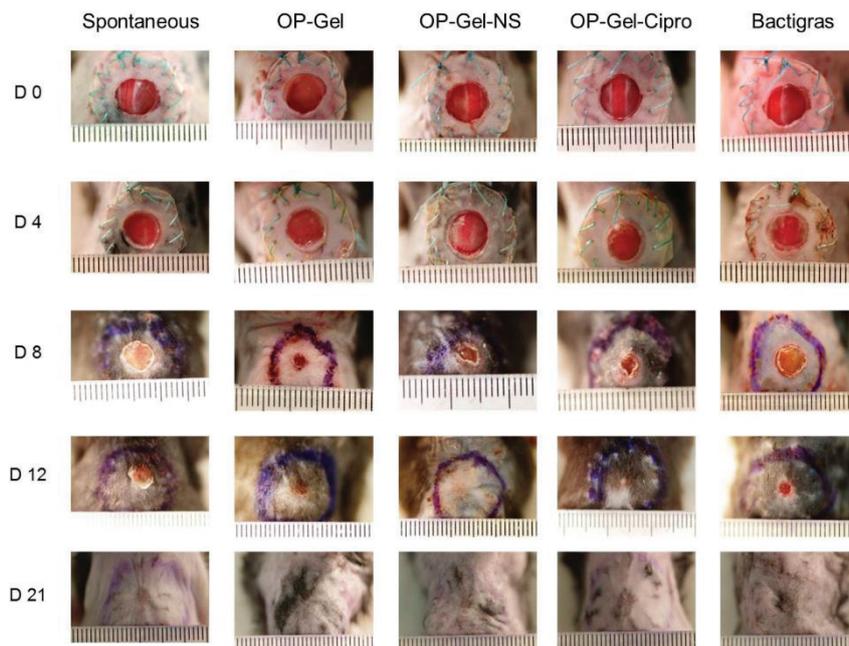


Fig. 10. Macroscopic appearance of 8 mm Ø full thickness wounds on C57BL/6J mice. (1) Spontaneous healing, (2) OP-Gel, (3) OP-Gel-NS, (4) OP-Gel-Cipro, and (5) Bactigras[®] at different times: (a) 0 days, (b) 4 days, (c) 8 days, (d) 12 days and (e) 21 days.

performance of these two products in terms of the wound healing capacity. Balakrishnan et al. employed borax as the antimicrobial agent; when applied on full thickness excisional wounds on male Wistar rats, the test wounds healed ~90% in 15 days, as compared to ~81% in control wounds (spontaneous healing). On the other hand, OP-Gel-NS wounds healed completely in 12 days. It may be concluded from this comparison that while oxidized polysaccharide-protein complexes are suitable matrices for wound healing and tissue regeneration, their performance is largely influenced by the antimicrobial agent incorporated.

Gross histological examination of healthy and healed tissues was carried out after staining with Goldner's Masson trichrome to analyze the formation of collagen, neovascularization and reepithelialization. Neovascularization and angiogenesis are essential for tissue repair, since nutrients and oxygen are transported to the cells at the wound site through blood vessels (Eming et al., 2014). The images of the stained sections are presented in Fig. 12. Fig. 12(a) and (b) represent healthy tissue and healed tissue after spontaneous healing, respectively. A marked lack of hair follicles and blood vessels can be observed in the case of spontaneously healed tissue, this seems to indicate the scar area. In the case of OP-Gel dressings (Fig. 12(c)), good nuclei migration could be observed along with incipient hair growth. Thick blood vessel formation could be noticed. On the other hand, the healed tissues of OP-Gel-NS treated wounds (Fig. 12(d)), exhibited a thick epidermal layer with organized collagen formation and deposition. Big blood vessels could be observed; however, the lack of hair indicates scar formation. In contrast, OP-Gel-Cipro treated wound tissues (Fig. 12(e)) displayed a thin epidermal layer akin to that of the healthy skin. Additionally, good blood vessel formation and hair

follicle growth could be observed along with nuclei migration. The thin epidermis might indicate that the wound healing has reached an advanced stage with a diminished scar formation. Unlike OP-Gel-NS and Bactigras[®], OP-Gel-Cipro treated fibroblast cells could achieve good confluence; thus the rate of regeneration is faster. A distinct lack of hair and blood vessels could be observed in Bactigras[®] treated wound tissues (Fig. 12(f)). In addition, a very thick epidermal layer growth was noticed indicating retardation in wound healing and tissue regeneration.

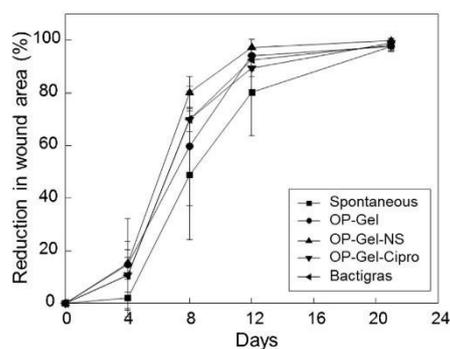


Fig. 11. Wound size reduction with time.

Résultat V. Etude d'un composite constitué d'un réseau de pectine oxydée et de gélatine pour accélérer la cicatrisation

244

M. Tummalapalli et al./International Journal of Pharmaceutics 505 (2016) 234–245

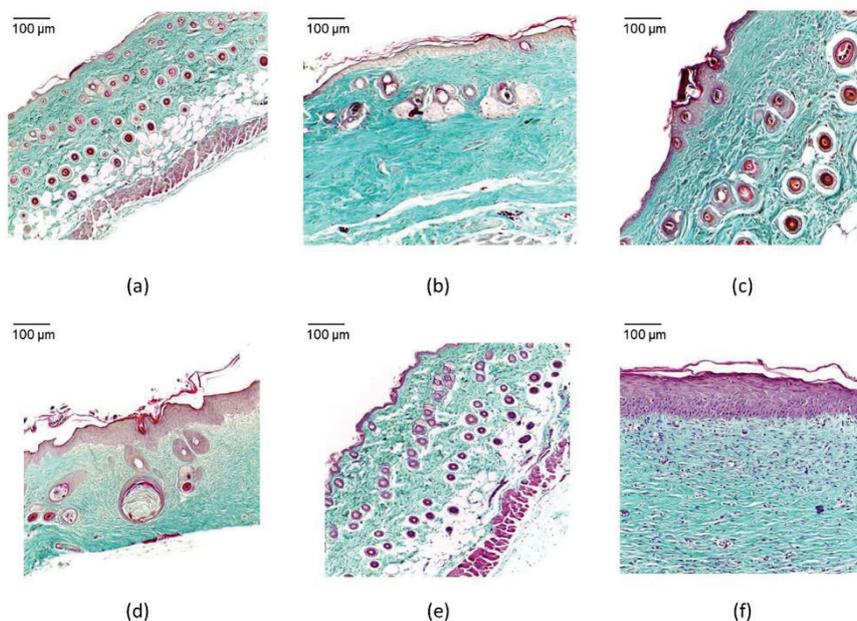


Fig. 12. Histological analysis of excised wound tissue: (a) Healthy tissue on day 0, Healed tissue on day 21 when treated with (b) Spontaneous healing, (c) OP-Gel, (d) OP-Gel-NS, (e) OP-Gel-Cipro and (f) Bactigras[®].

In spite of severe toxicity observed when fibroblast cells were treated with OP-Gel-NS dressings, the *in vivo* studies and histological examination produced results that were to the contrary. The wound healing studies indicated a 100% healing within 12 days with reduced scarring at the macroscopic level. Poon and Burd (2004) put forth a theory of an “environmental effect” that could explain the apparent discrepancy between the *in vitro* and *in vivo* results. Due to this effect, rapid inactivation of silver ions took place at physiologic concentrations of chloride and protein at the wound site. Hence it can be stated that the OP-Gel-NS dressings actively promote and accelerate wound healing by prevention and eradication of bacterial infection, while enhancing collagen deposition, nuclei migration and blood vessel formation. Due to the very low content of nanosilver in the OP-Gel-NS dressings, the cytotoxicity is at a minimum.

4. Conclusions

Using an *in situ* crosslinking methodology, we synthesized cytocompatible OP-Gel biopolymeric matrices capable of influencing the inflammatory and immunomodulatory responses in the wound healing cascade. Nanosilver incorporated OP-Gel-NS flower like nanohydrocolloids were synthesized using the aldehyde groups in OP. Biocomposite dressings of OP-Gel-NS and OP-Gel-Cipro were fabricated using a dip coating method; *in vitro* antimicrobial studies showed that OP-Gel-NS and OP-Gel-Cipro exhibited 100% antibacterial activity at a nanosilver loading of 3.75 µg/cm² and a ciprofloxacin loading of 1%, respectively. The wound healing performance of OP-Gel based dressings was compared with that of Bactigras[®]. NIH3T3 mouse fibroblast cells exhibited good cell viability when treated with OP-Gel and OP-Gel-Cipro. Meanwhile, OP-Gel-NS and Bactigras[®] induced cytotoxicity

and complete cell lysis, respectively. OP-Gel-NS dressings led to accelerated and complete healing within 12 days, while OP-Gel-Cipro dressings treated wounds at a rate similar to that of Bactigras[®]. The OP-Gel-Cipro treated tissues exhibited good collagen deposition and neovascularization, while spontaneously healed tissues exhibited a lack of blood vessels. Therefore, it is concluded that OP-Gel based dressings exhibit low cytotoxicity and are highly capable of wound healing with reduced scarring. Their performance was better than that of a commercially available dressing. Therefore, these biocomposite dressings could be considered potential candidates for effective wound management.

Acknowledgement

The authors duly acknowledge the facilities provided at SAIF, AIIMS, New Delhi to conduct the HRTEM analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.007>.

References

- Agarwal, R., Alam, M.S., Gupta, B., 2013. Preparation of curcumin loaded poly(vinyl alcohol)-poly(ethylene oxide)-carboxymethyl cellulose membranes for wound care application. *J. Biomater. Tissue Eng.* 3, 273–283.
- Balakrishnan, B., Mohanty, M., Umashankar, P.R., Jayakrishnan, A., 2005. Evaluation of an *in situ* forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials* 26, 6335–6342.
- Birch, N.P., Barney, L.E., Pandres, E., Peyton, S.R., Schiffman, J.D., 2015. Thermal-responsive behaviour of a cell compatible chitosan/pectin hydrogel. *Biomacromolecules* 16, 1837–1843.

- Broughton, G., Janis, J.E., Attinger, C.E., 2006. The basic science of wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 117, 12S–34S.
- Cherredy, K.K., Her, C.H., Comune, M., Moia, C., Lopes, A., Porporato, P.E., Vanacker, J., Lam, M.C., Steintraesser I. Sonveaux, P., Zhu, H., Ferreira, L.S., Vandermeulen, G., Pr at, V., 2014. PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing. *J. Controlled Release* 194, 138–147.
- Cipriani, T.R., Gracher, A.H.P., de Souza, L.M., Fonseca, R.J.C., Belmiro, C.L.R., Gorin, P. A.J., Sassaki, G.L., Iacomini, M., 2009. Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. *Thromb. Haemost.* 101, 860–866.
- Dongargaonkar, A.A., Bowlin, G.L., Yang, H., 2013. Electrospun blends of gelatin and gelatin–dendrimer conjugates as a wound-dressing and drug-delivery platform. *Biomacromolecules* 14, 4038–4045.
- Eaglstien, W.H., 2001. Moist wound healing with occlusive dressings: a clinical focus. *Dermatol. Surg.* 27, 175–182.
- Eming, S.A., Martin, P., Tomic-Comic, M., 2014. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci. Transl. Med.* 6, 265s6.
- Fan, L., Sun, Y., Xie, W., Zheng, H., Liu, S., 2012. Oxidized pectin cross-linked carboxymethyl chitosan: a new class of hydrogels. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 23, 2119–2132.
- Gao, C., Yan, T., Dai, K., Wan, Y., 2012. Immobilization of gelatin onto natural nanofibers for tissue engineering scaffold applications without utilization of any crosslinking agent. *Cell* 19, 761–768.
- Gupta, B., Kumari, M., Ikram, S., 2013a. Drug release studies of N-isopropyl acrylamide/acrylic acid grafted polypropylene nonwoven fabric. *J. Polym. Res.* 20, 1–6.
- Gupta, B., Tummalapalli, M., Deopura, B.L., Alam, M.S., 2013b. Functionalization of pectin by periodate oxidation. *Carbohydr. Polym.* 98, 1160–1165.
- Gupta, B., Tummalapalli, M., Deopura, B.L., Alam, M.S., 2014. Preparation and characterization of in-situ crosslinked pectin–gelatin hydrogels. *Carbohydr. Polym.* 106, 312–318.
- Hajosch, R., Suckfuell, M., Oesser, S., Ahlers, M., Flechsenhar, K., Schlosshauer, B., 2010. A novel gelatin sponge for accelerated hemostasis. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 94, 372–379.
- Hsin, Y.H., Chen, C.F., Huang, S., Shih, T.S., Lai, P.S., Chueh, P.J., 2008. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol. Lett.* 179, 130–139.
- J auregui, K., Cabrera, J., Geniceros, E., Hernández, J., Ilyina, A., 2009. A new formulated stable papin-pectin aerosol spray for skin wound healing. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 14, 450–456.
- Jayakumar, G.C., Usharani, N., Kawakami, K., Rao, J.R., Nair, B.U., 2014. Preparation of antibacterial collagen-pectin particles for biotherapeutics. *RSC Adv.* 4, 42846–42854.
- Jeong, Y.I., Na, H.S., Seo, D.H., Kim, D.G., Lee, H.C., Jang, M.K., Na, S.K., Roh, S.H., Kim, S. I., Nah, J.W., 2008. Ciprofloxacin-encapsulated poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity. *Int. J. Pharm.* 352, 317–323.
- Jiang, D., Qi, Y., Walker, N.G., Sindrilaru, A., Hainzl, A., Wlaschek, M., MacNeil, S., Scharfetter-Kochanek, K., 2013. The effect of adipose tissue derived MSCs delivered by a chemically defined carrier on full-thickness cutaneous wound healing. *Biomaterials* 34, 2501–2515.
- Kevadiya, B.D., Rajkumar, S., Bajaj, H.C., Chettiar, S.S., Gosai, K., Brahmabhatt, H., Bhatt, A.S., Barvaliya, Y.K., Dave, G.S., Kothari, R.K., 2014. Biodegradable gelatin–ciprofloxacin–montmorillonite composite hydrogels for controlled drug release and wound dressing application. *Colloids Surf. B* 122, 175–183.
- Kim, U.J., Kuga, S., Wada, M., Okano, T., Kondo, T., 2000. Periodate oxidation of crystalline cellulose. *Biomacromolecules* 1, 488–492.
- Lee, Y.H., Cheng, F.Y., Chiu, H.W., Tsai, J.C., Fang, C.Y., Chen, C.W., Wang, Y.J., 2014. Cytotoxicity oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts. *Biomaterials* 35, 4706–4715.
- Li, J., Wan, Y., Li, L., Liang, H., Wang, J., 2009. Preparation and characterization of 2,3-dialdehyde bacterial cellulose for potential biodegradable tissue engineering scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* 29, 1635–1642.
- Li, W.R., Xie, X.B., Shi, Q.S., Zeng, H.Y., You-Sheng, O.Y., Chen, Y.B., 2010. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1115–1122.
- Li, X., Fan, R., Tong, A., Yang, M., Deng, J., Zhou, L., Zhang, X., Guo, G., 2015. In situ gel-forming AP-57 peptide delivery system for cutaneous wound healing. *Int. J. Pharm.* 495, 560–571.
- Lo Nostro, P., Capuzzi, G., Romani, A., Mulinacci, N., 1999. Self-assembly and antioxidant properties of octanoyl-6-O-ascorbic acid. *Langmuir* 16, 1744–1750.
- Lubick, N., 2008. Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles—or both? *Environ. Sci. Technol.* 42, 8617.
- Madhumathi, K., Sudheesh Kumar, P.T., Abhilash, S., Sreeja, V., Tamura, H., Manzoor, K., Nair, S.V., Jayakumar, R., 2010. Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21, 807–8813.
- Maver, T., Hribernik, S., Mohan, T., Smrke, D.M., Maver, U., Stana-Kleinschek, K., 2015. Functional wound dressing materials with highly tunable drug release properties. *RSC Adv.* 5, 77873–77877.
- Mogoşanu, G.D., Grumezescu, A.M., 2014. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *Int. J. Pharm.* 463, 127–136.
- Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramirez, J.T., Yacaman, M.J., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346.
- Moseley, R., Walker, M., Waddington, R.J., Chen, W.Y.J., 2003. Comparison of the antioxidant properties of wound dressing materials—carboxymethylcellulose, hyaluronan benzyl ester and hyaluronan, towards polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species. *Biomaterials* 24, 1549–1557.
- Poon, V.K.M., Burd, A., 2004. In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns* 30, 140–147.
- Reddy, N.J., Nagore Vali, D., Rani, M., Rani, S.S., 2014. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by *Piper longum* fruit. *Mater. Sci. Eng. C* 34, 115–122.
- Saxena, S., Ray, A.R., Kapil, A., Pavon-Djavid, G., Letourneur, D., Gupta, B., Meddahi-Pellé, A., 2011. Development of a new polypropylene-based suture: plasma grafting surface treatment, characterization, and biocompatibility studies. *Macromol. Biosci.* 11, 373–382.
- Schäfer, M., Werner, S., 2008. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol. Res.* 58, 165–171.
- Shahrahan, A., Matsoukas, T., 2012. Encapsulation and controlled release from core-shell nanoparticles fabricated by plasma polymerization. *J. Nanopart. Res.* 14, 1–11.
- Shahverdi, A.R., Fakhimi, A., Shahverdi, H.R., Minaian, S., 2007. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine* 3, 168–171.
- Singh, B., Pal, L., 2008. Development of sterculia gum based wound dressings for use in drug delivery. *Eur. Polym. J.* 44, 3222–3230.
- Sotiriou, G.A., Pratsinis, S.E., 2010. Antibacterial activity of nanosilver ions and particles. *Environ. Sci. Technol.* 44, 5649–5654.
- Tepper, O.M., Carr, J., Allen, R.J., Chang, C.C., Lin, C.D., Tanaka, R., Gupta, S.M., Levine, J. P., Saadeh, P.B., Warren, S.M., 2010. Decreased circulating progenitor cell number and failed mechanisms of stromal cell-derived factor-1 α mediated bone marrow mobilization impair diabetic tissue repair. *Diabetes* 59, 1974–1983.
- Tummalapalli, M., Deopura, B.L., Alam, M.S., Gupta, B., 2015. Facile and green synthesis of silver nanoparticles using oxidized pectin. *Mater. Sci. Eng. C* 50, 31–36.
- Vicini, S., Princi, E., Luciano, G., Franceschi, E., Pedemonte, E., Oldak, D., Kaczmarek, H., Sionkowska, A., 2004. Thermal analysis and characterisation of cellulose oxidised with sodium methaperiodate. *Thermochim. Acta* 418, 123–130.
- Vowden, K., Vowden, P., 2014. Wound dressings: principles and practice. *Surgery (Oxford)* 32, 462–467.
- Wang, T., Zhu, X.K., Xue, X.T., Wu, D.Y., 2012. Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings. *Carbohydr. Polym.* 88, 75–83.
- Wang, X., Ge, J., Tredget, E.E., Wu, Y., 2013. The mouse excisional wound splinting model: including applications for stem cell transplantation. *Nat. Protoc.* 8, 302–309.

Article 4 “Composite wound dressings of pectin and gelatin with aloe vera and curcumin as bioactive agents”

Tummalapalli M, Berthet M, Verrier B, Deopura BL, Alam MS, Gupta B.

International journal of biological macromolecules.

2016;82:104-13. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.087. PubMed PMID: 26529192.

De l'aloé vera et de la curcumine ont été chargés dans des matrices de coton non tissé revêtues de pectine oxydée et de gélatine (OP-Gel) pour concevoir des pansements bioactifs (OP-Gel-Aloe, OP-Gel-Curcumine, OP-Gel-Aloe-Curcumine). Ces biocomposites, entièrement biodégradables, ont été fabriqués à l'aide d'un procédé de trempage. La matrice de coton non tissé qui a été utilisée fournit un support au pansement pour une meilleure manipulation de celui-ci. Ces composés d'origine végétale ont été largement utilisés en médecine traditionnelle indienne pour leurs nombreuses propriétés thérapeutiques. L'aloé vera est une plante grasse dont l'extrait a des propriétés anti-inflammatoires, anti-fongiques et des effets bénéfiques pour la cicatrisation des plaies. La curcumine est issue du curcuma, celle-ci est responsable des multiples propriétés biologiques du curcuma. En effet, la curcumine a des propriétés anti-prolifératives, anti-angiogéniques et agit comme agent thérapeutique pour promouvoir la cicatrisation des plaies.

Les profils de libération des principes actifs contenus dans les pansements indiquent que la curcumine est libérée selon un processus biphasique, d'érosion de la matrice polymérique, suivie de la diffusion, tandis que l'aloé vera est libéré lors de la lixiviation de la matrice polymérique. Une composition 50/50 d'aloé vera/curcumine a été utilisée pour fabriquer des pansements OP-Gel-Aloe-Curcumine. Les tests *in vitro* d'efficacité antibactérienne ont montré que pour un taux de chargement de 40% en actif naturel, les pansements OP-Gel-Aloe et OP-Gel-Curcumine ont ~83% et ~93% d'efficacité, respectivement. Cependant, contrairement à nos attentes, les pansements OP-Gel-Aloe-Curcumine présentaient une activité antimicrobienne amoindrie par rapport aux pansements OP-Gel-Aloe et OP-Gel-Curcumine, en raison de réactions entre les groupes esters acétyliques de l'aloé vera et les unités phénoliques de la curcumine. La cytocompatibilité des pansements fabriqués a été évaluée à l'aide de fibroblastes de souris NIH3T3. Les fibroblastes traités par OP-Gel-Aloe ont montré une viabilité élevée en comparaison aux autres pansements. D'autre part, les pansements OP-Gel-Curcumine et OP-Gel-Aloe-Curcumine semblent avoir provoqué une apoptose cellulaire. Des plaies d'excision

Résultat V. Etude d'un composite constitué d'un réseau de pectine oxydée et de gélatine pour accélérer la cicatrisation

sur souris C57BL/6J ont été réalisées pour suivre le processus de cicatrisation en présence des différents pansements. Les plaies traitées avec le pansement OP-Gel-Aloe présentaient une cicatrisation très rapide, avec une fermeture de la plaie de l'ordre de 80% en seulement 8 jours. De plus, l'analyse histologique des échantillons de peau traités avec ces pansements a révélé des fibres de collagènes organisées et une néovascularisation. Par conséquent, les pansements OP-Gel-Aloe sont proposés comme étant des biomatériaux viables pour une gestion efficace des plaies.



Composite wound dressings of pectin and gelatin with aloe vera and curcumin as bioactive agents



Mythili Tummalapalli^a, Morgane Berthet^b, Bernard Verrier^b, B.L. Deopura^a, M.S. Alam^c, Bhuvanesh Gupta^{a,*}

^a Bioengineering Lab, Department of Textile Technology, Indian Institute of Technology, New Delhi 16, India

^b Laboratory of Tissue Biology and Therapeutic Engineering, IBCP, UMR 5305 CNRS-UCBL, Lyon Cedex 07, France

^c Department of Chemistry, Jamia Hamdard, New Delhi 62, India

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2015

Received in revised form 20 October 2015

Accepted 27 October 2015

Available online 1 November 2015

Keywords:

Oxidized pectin

Biocomposite

Wound healing

ABSTRACT

Aloe vera and curcumin loaded oxidized pectin–gelatin (OP-Gel) matrices were used as antimicrobial finishes on nonwoven cotton fabrics to produce composite wound care devices. The drug release characteristics of the biocomposite dressings indicated that curcumin is released through a biphasic mechanism – erosion of the polymeric matrix, followed by diffusion, while aloe vera is released upon leaching of the polymeric matrix. A 50/50 composition of aloe vera/curcumin was used to fabricate OP-Gel-Aloe Curcumin dressings. However, contrary to our expectations, OP-Gel-Aloe Curcumin dressings exhibited lesser antimicrobial activity compared to OP-Gel-Aloe and OP-Gel-Curcumin dressings. The cytocompatibility of the fabricated dressings was evaluated using NIH3T3 mouse fibroblast cells. OP-Gel-Aloe treated fibroblasts had the highest viability, with the matrices providing a substrate for good cell attachment and proliferation. On the other hand, OP-Gel-Curcumin and OP-Gel-Aloe Curcumin seemed to have induced apoptosis in NIH3T3 cells. *In vivo* wound healing analysis was carried out using an excisional splint wound model on C57BL/6j mice. OP-Gel-Aloe treated wounds exhibited very rapid healing with 80% of the wound healing in just 8 days. Furthermore, aloe vera exerted a strong anti-inflammatory effect and prominent scar prevention. Histological examination revealed that an ordered collagen formation and neovascularization could be observed along with migration of nuclei. Therefore, OP-Gel-Aloe biocomposite dressings are proposed as viable materials for effective wound management.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mankind lives in a state of armed truce with a plethora of microorganisms both in and around us. Such a sensitively balanced state is disturbed when the human body experiences an injury or a wound, leading to a risk of infection. Infection still poses a major challenge for effective wound management even with the advent of powerful and modern medical technology. Wound exudate provides a warm and moist environment in which bacteria can grow and proliferate, thus increasing the bioburden of the wound [1]. Inoculation of such wounds can lead to bacterial colonization, biofilm formation and later on to infection. Therefore a means to eradicate and prevent infection is necessary. It has been reported that only 3.6% of surgical wounds exposed less than 30 min are infected, whereas 16.4% of the wounds exposed longer than 5 h

develop infection [2,3]. Thus, the modern philosophy of interactive wound dressings advocates the incorporation of antimicrobial agents into the polymeric matrix. Such bioactive components may interact with the bacteria at the wound site and prevent their proliferation. Of the various bacteriocidal agents ubiquitously supplied by nature, aloe vera and curcumin are the most easily and commonly available.

Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) is a perennial succulent plant belonging to the Liliaceal family. The whole gel extract of aloe vera has been reported to promote wound, burn, and frost-bite healing, in addition to having antiinflammatory, antifungal, hypoglycemic, and gastroprotective properties. Of those claims, aloe vera's anti-inflammatory and wound healing has been the most extensively studied [4]. A pilot study was conducted on the efficacy of aloe vera saturated polyethylene oxide (PEO) dressings for treating full face dermabrasion wounds [5]. The wound sites treated with aloe vera exhibited complete reepithelialization by the sixth day, 72 h faster than only PEO treated wounds. The healing was accompanied by reduced bacterial contamination, keloid formation, and pigment

* Corresponding author.

E-mail address: bgupta@textile.iitd.ernet.in (B. Gupta).

Résultat V. Etude d'un composite constitué d'un réseau de pectine oxydée et de gélatine pour accélérer la cicatrisation

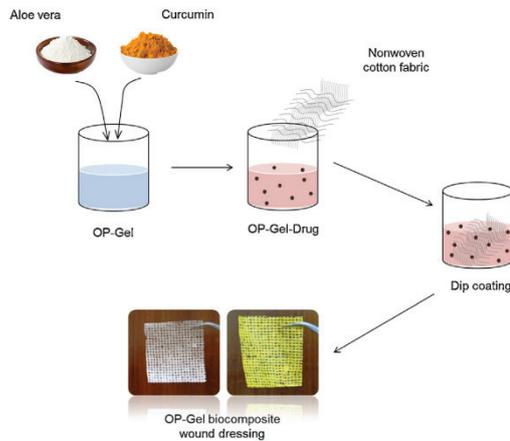


Fig. 1. Schematic of biocomposite dressing fabrication.

changes. Sodium alginate/polyvinyl alcohol films were loaded with aloe vera and vitamin E and these bioadhesive polymeric films were found to be capable of enhancing healing in burn wounds [6]. Blended films of fibroin and aloe gel extract were found to accelerate healing in healing impaired mice and can be treated as potential dressings for diabetic wound care management [7]. Silva et al. reported that a synergistic antimicrobial effect was exhibited by chitosan/aloe vera based membranes [8]. *In vitro* assays proved that these blend membranes are non-cytotoxic to primary human dermal fibroblasts. Collagen–chitosan scaffolds supplemented with aloe vera were tested *in vitro* for their possible application in tissue engineering [9]. An enhanced growth and proliferation of 3T3L1 fibroblasts was observed when the cells were incubated with the collagen–chitosan–aloe vera scaffolds, suggesting that these materials may be suitable for regenerative medicine.

The active component of turmeric which is responsible for its manifold therapeutic characteristics is curcumin [10].

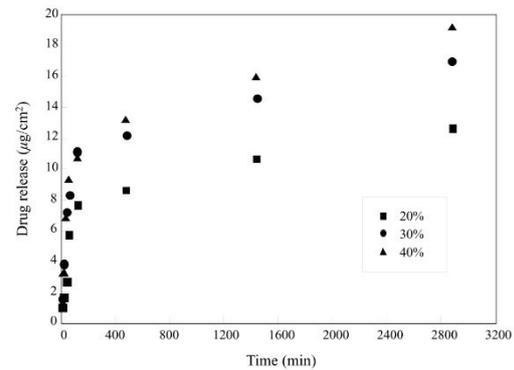


Fig. 3. Drug release profile of OP-Gel-Curcumin dressings. Release temperature 37 °C, pH 7.4.

Curcumin is a polyphenol compound, diferuloylmethane, responsible for the yellow pigmentation [11]. It has been reported that curcumin acts as an antiproliferative, anti-invasive, and antiangiogenic agent; as a mediator of chemoresistance and radioresistance; as a chemopreventive agent; and as a therapeutic agent in wound healing, diabetes and cardiovascular ailments [10]. Thermoresponsive chitosan-g-poly(*N*-isopropylacrylamide) nanoparticles were synthesized for the targeted delivery of curcumin [12]. Upon cell seeding, it was observed that apoptosis was induced in prostate cancer cells, while L929 mouse fibroblast cells were found to be viable. Curcumin incorporated collagen sheets were designed for dermal wound healing [13]. Such membranes led to higher antioxidant activity, hydrothermal stability and faster wound reduction compared to collagen treated wounds. Curcumin loaded zein nanofiber constructs were developed for biomedical applications [14]. A sustained antimicrobial activity was observed along with cytocompatibility. Such electrospun mats may be potentially used for wound healing and drug delivery applications. The electrospinning approach was once again employed by Sun et al. to develop polyvinyl alcohol (PVA) nanofibers loaded with curcumin

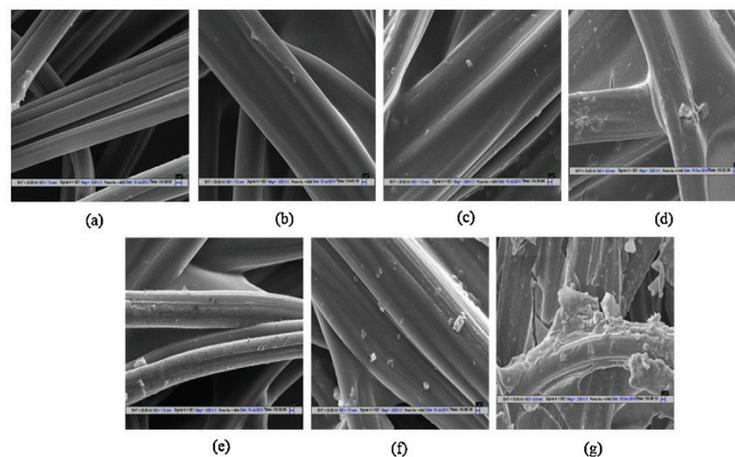


Fig. 2. Morphological analysis of dressings: (a) unmodified fabric, (b) OP-Gel-Aloe prior to drug release, (c) OP-Gel-Curcumin prior to drug release, (d) OP-Gel-Aloe Curcumin prior to drug release, (e) OP-Gel-Aloe after drug release, (f) OP-Gel-Curcumin after drug release and (g) OP-Gel-Aloe Curcumin after drug release.

Résultat V. Etude d'un composite constitué d'un réseau de pectine oxydée et de gélatine pour accélérer la cicatrisation

106

M. Tummalapalli et al. / International Journal of Biological Macromolecules 82 (2016) 104–113

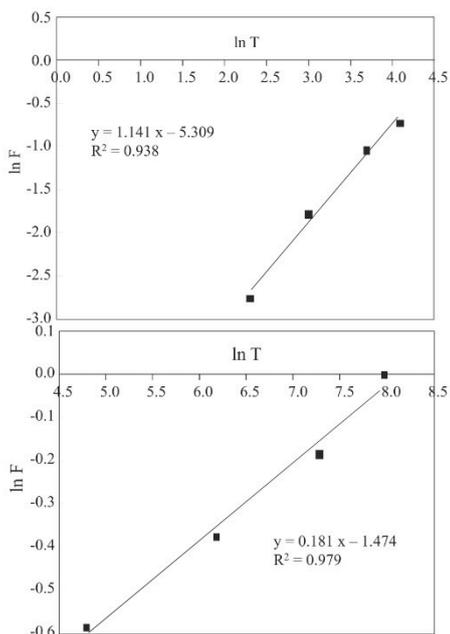


Fig. 4. Drug release kinetics of OP-Gel-Curcumin dressing. Drug loading 40%, release temperature 37 °C, pH 7.4.

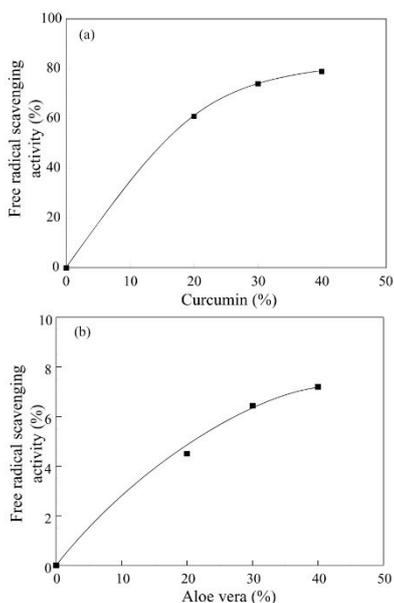


Fig. 5. Free radical scavenging activity of (a) OP-Gel-Curcumin dressings and (b) OP-Gel-Aloe dressings.

or its β -cyclodextrin inclusion complex [15]. A bi-phasic drug release was observed with potential for a sustained antimicrobial activity. Curcumin incorporated PVA/PEO/carboxymethyl cellulose freeze-dried membranes were developed. The interconnected porous morphology was found to be responsible for good water vapour transmission and a Fickian diffusion drug release. A prolonged antimicrobial activity could be observed and these membranes have been proposed for effective infection control.

In our earlier work, we demonstrated that OP-Gel matrices exhibit good hydrophilicity, biocompatibility, biodegradability and bacteriocidal nature when infused with an antimicrobial agent – the characteristics of an ideal wound care system [16]. Hence it was considered that it would be of interest to study the behavior of the OP-Gel dressings after the incorporation of naturally available antimicrobial agents, aloe vera and curcumin. Although combinations of two different drugs have been tried together before [17,18], aloe vera and curcumin have not been used in conjugation, to the best of the authors' knowledge. It is expected that such a combinatorial composition would lead to a synergistic effect, in addition to exhibiting a cytocompatible and wholly biodegradable behavior. In the present study, biocomposite dressings of aloe vera/curcumin/aloe vera-curcumin infused OP-Gel were fabricated using a nonwoven cotton fabric as the support layer. A dip coating method was employed to apply the antimicrobial finish. A comprehensive study was carried out to analyze the antimicrobial efficiency, cytocompatibility and wound healing efficacy of these biocomposite dressings.

2. Materials and methods

2.1. Materials, cells and animals

Citrus pectin (Mw ~30,000 g/mol, degree of esterification ~72%) was purchased from CDH Fine Chemicals, India. Gelatin, from porcine skin (high gel strength) was procured from Fluka Analytical, Germany. Spray dried aloe vera powder (200 \times , leaf extract) and curcumin were purchased from Biomax Life Sciences, India and Sigma-Aldrich, India respectively. Periodic acid was purchased from Merck Chemicals, India. Glycerol and isopropanol were obtained from Fisher Scientific, India. Luria broth and agar-agar, were both obtained from Hi Media Laboratories, India. Bacterial strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were provided by IIT Delhi. Ultra-pure water (18 M Ω cm) from Millipore Milli-Q system was used in all experiments. All chemicals were of analytical grade and used without further purification. Non-woven cotton fabric (21.24 GSM and 67% porosity) was separated from Surgipad dressings manufactured by Johnson & Johnson Limited.

Mice NIH3T3 fibroblast cells were purchased from CelluloNet (Lyon, France). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with a solution of fetal bovine serum (10%, v/v, FBS) and antibiotics (penicillin and streptomycin, 5%, v/v) at 37 °C under 5% CO₂. NIH3T3 were harvested with Trypsin EDTA solution at 80% confluence.

Twenty-five C57BL/6J mice (male, age 10 weeks, 18–20 g) from Janvier Laboratories (Le Genest St Isle, France) were used in this study. The ambient temperature and relative humidity were maintained constant in the animal facility. Mice were acclimatized for one week before the experiments, and kept with free access to food and water. All animal experiments conducted at IBCP, Lyon were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the University of Lyon 1, France (permission number BH2011-49) and complied with French legislation and ethics committee guidelines.

Résultat V. Etude d'un composite constitué d'un réseau de pectine oxydée et de gélatine pour accélérer la cicatrisation

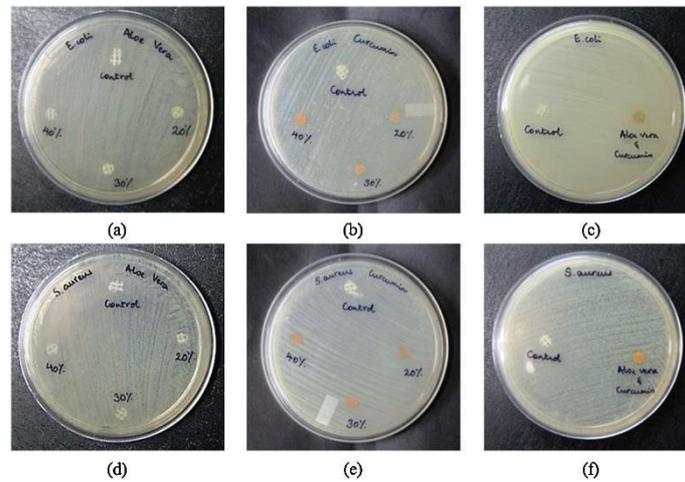


Fig. 6. Antimicrobial evaluation by zone of inhibition against *E. coli*: (a) OP-Gel-Aloe, (b) OP-Gel-Curcumin, (c) OP-Gel-Aloe Curcumin and against *S. aureus* (d) OP-Gel-Aloe, (e) OP-Gel-Curcumin, (f) OP-Gel-Aloe Curcumin.

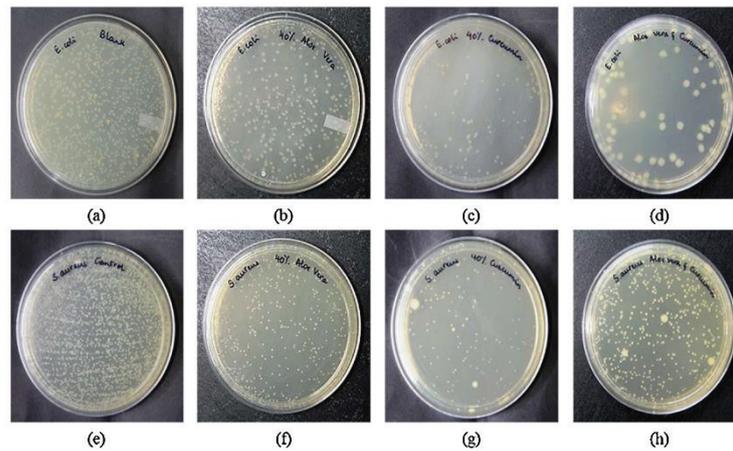


Fig. 7. Antimicrobial evaluation by colony count against *E. coli*: (a) Control (b) OP-Gel-Aloe, (c) OP-Gel-Curcumin, (d) OP-Gel-Aloe Curcumin and against *S. aureus* (e) control (f) OP-Gel-Aloe, (g) OP-Gel-Curcumin, (h) OP-Gel-Aloe Curcumin.

2.2. Fabrication of biocomposite dressings

Periodate oxidized pectin (OP) of aldehyde content 2.101 mmol/g was synthesized according to our previously reported work [19]. The OP thus synthesized was then crosslinked with gelatin at optimized reaction conditions to prepare OP-Gel matrices, as described in our previous study [16]. A 4% OP-Gel (70/30) crosslinked matrix was prepared according to the protocol for 16 h at 60 °C, pH 6.4 and with 40% glycerol. Three different types of wound dressings were developed, with aloe vera, curcumin and aloe vera-curcumin. To fabricate oxidized pectin-gelatin-aloe vera dressings (OP-Gel-Aloe), aloe vera powder (10–40 wt%) was added to the OP-Gel solution. At the end of 16 h crosslinking time, nonwoven cotton fabric was dipped into the OP-Gel-Aloe solution, taken out and dried at room temperature.

To fabricate oxidized pectin-gelatin-curcumin (OP-Gel-Curcumin), curcumin (10–40 wt%) was initially dissolved in 5 mL ethanol and slowly added to the OP-Gel solution. At the end of 16 h, nonwoven cotton fabric was dipped into the OP-Gel-Curcumin solution, taken out and dried at room temperature. In the case of oxidized pectin-gelatin-Aloe Curcumin dressings (OP-Gel-Aloe Curcumin) dressings, curcumin (20 wt%) was dissolved in 5 mL ethanol and slowly added to the OP-Gel solution containing 20% aloe vera. At the end of 16 h, nonwoven cotton fabric was dipped into the OP-Gel-Curcumin solution, taken out and dried at room temperature.

2.3. Surface morphology of biocomposite dressings

The surface morphology of the uncoated cotton fabric, OP-Gel-Aloe, OP-Gel-Curcumin and OP-Gel-Aloe Curcumin dressings was

Résultat V. Etude d'un composite constitué d'un réseau de pectine oxydée et de gélatine pour accélérer la cicatrisation

108

M. Tummalapalli et al. / International Journal of Biological Macromolecules 82 (2016) 104–113

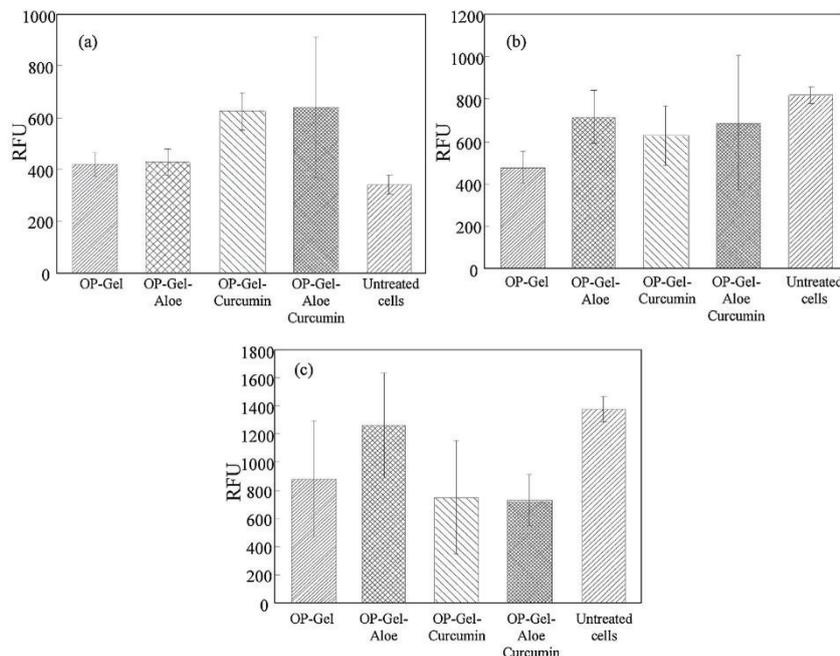


Fig. 8. In vitro cell viability assay against NIH3T3 mouse fibroblast cells: (a) after 24 h, (b) after 48 h and (c) after 72 h.

studied under a scanning electron microscope (Zeiss EVO Scanning Electron Microscope Model EVO 50) after a thin coating of gold was deposited on the surface of the dressings using a BIO-RAD POLARON Sputter Coater. The changes in surface morphology after drug release from the biocomposite dressings were also monitored after keeping the dressings in contact with simulated body fluid (SBF) of pH 7.4 for 2 h at 37 °C.

2.4. Antimicrobial studies

Antibacterial studies of the dressings were carried out by colony count and zone inhibition methods, according to test method AATCC 100-1998 [20]. The antibacterial activity was monitored against a Gram-positive bacterial strain *S. aureus* and a Gram-negative bacterial strain *E. coli*. The antibacterial activity of OP-Gel-Aloe, OP-Gel-Curcumin and OP-Gel-Aloe Curcumin dressings was compared with that of a control dressing (unmodified nonwoven cotton fabric).

2.4.1. Zone of inhibition

Colonies of *S. aureus* and *E. coli* obtained from an overnight culture were suspended in Luria Broth and the turbidity was adjusted to 0.5 McFarland standards. 200 µL of this suspension was spread on Luria-Agar plates to obtain a semi-confluent growth. Control, OP-Gel-Aloe, OP-Gel-Curcumin and OP-Gel-Aloe Curcumin dressings were then placed on the inoculated medium and the plates were kept for incubation for 24 h at 37 °C and subsequently, inhibition zones were observed.

2.4.2. Colony count method

Colonies of *S. aureus* and *E. coli* obtained from an overnight culture were suspended in Luria Broth and the turbidity was adjusted

to 0.5 McFarland standards. The samples (~20 mg) were placed in contact with 6 mL bacterial suspension in Luria Broth having 10^5 CFU mL⁻¹. All suspensions were vortexed and incubated at 37 °C for 24 h. The suspensions were vortexed again and dilutions were prepared and colonies were counted by the spread plate method. The inoculum (200 µL) was uniformly spread on nutrient agar plate using a sterile cotton swab. Plates were incubated at 37 °C and the colonies were counted after 24 h. All experiments were conducted under sterile conditions. Antibacterial efficiency (R) was calculated according to the following equation:

$$R(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

where, A is the number of bacteria recovered from the inoculated test specimen after 24 h incubation with control and B is the number of bacteria recovered after inoculation with test specimen. Consequently, R is the percent reduction which indicates antimicrobial efficiency of the sample.

2.5. Free radical scavenging activity of OP-Gel-Curcumin dressings

The free radical scavenging activity of OP-Gel-Curcumin and OP-Gel-Aloe Curcumin dressings was determined according to the method prescribed by Lo Nostro et al. [21]. Briefly, 20 mg of the dressings with varying curcumin content were incubated with diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) (10^{-4} mol/L in ethanol) for 20 min. After incubation, the absorbance of the DPPH solution was measured by using a UV-vis spectrophotometer (Shimadzu UV-2450) at 517 nm against ethanol as blank. DPPH ethanol reagent without

Résultat V. Etude d'un composite constitué d'un réseau de pectine oxydée et de gélatine pour accélérer la cicatrisation

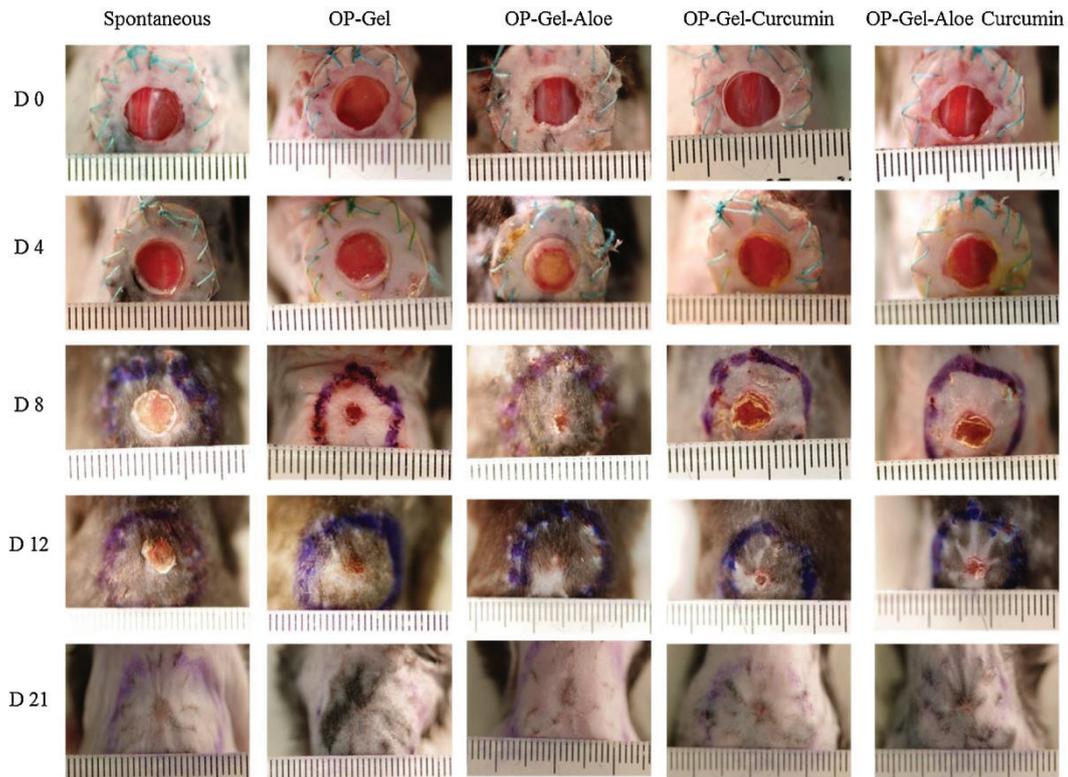


Fig. 9. Macroscopic appearance of 8 mm \varnothing full thickness wounds on C57BL/6J mice. (1) Spontaneous healing, (2) OP-Gel, (3) OP-Gel-Aloe, (4) OP-Gel-Curcumin, and (5) OP-Gel-Aloe Curcumin at different times: (a) 0 days, (b) 4 days, (c) 8 days, (d) 12 days and (e) 21 days.

sample was used as control and the free radical scavenging activity was calculated as follows:

$$R(\%) = \left[\frac{A_0 - A_{20}}{A_0} \right] \times 100$$

where, R is the percentage free radical scavenging activity, A_0 and A_{20} are the absorbance values of control sample and DPPH solution after incubation with the OP-Gel-Curcumin and OP-Gel-Aloe Curcumin dressings, respectively.

2.6. Curcumin release studies

In vitro drug release studies were performed at 37 °C using a Franz diffusion cell with separate donor and receptor compartments as described by Gupta et al. [22]. The receptor compartment, which has a capacity of 30 mL, was filled with SBF of pH 7.4. A nylon net, upon which a thin egg shell membrane was mounted, was placed between the donor and receptor compartments. OP-Gel-Curcumin dressing of 1 × 1 cm² size was placed over the egg shell membrane and nylon net so that it is in contact with the medium of the receptor compartment at all times. The curcumin release profile was obtained by sampling 3 mL aliquots from the receptor compartment solution at predetermined time intervals over a period of 48 h. The receptor compartment was replenished with an equal volume of SBF every time a sample was withdrawn. Each

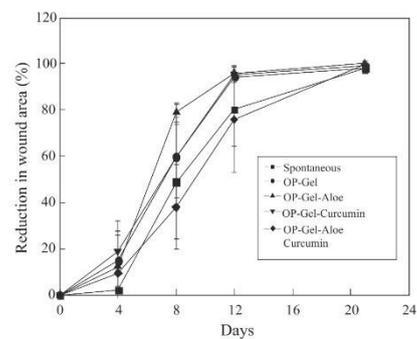


Fig. 10. Percentage wound size reduction with time.

experiment was repeated three times. The absorbance maximum of each aliquot was measured at a wavelength of 426 nm using a UV-vis spectrophotometer (Shimadzu UV-2450) against SBF as blank [23]. The amount of drug released was then calculated according to a previously obtained calibration equation and the cumulative release was plotted against time.

2.7. Release kinetics

The drug release kinetics of OP-Gel-Curcumin dressings have been calculated according to the Korsmeyer–Peppas equation given below:

$$F = \left[\frac{M_t}{M_\infty} \right] = kt^n$$

where, M_t is the amount of drug released at a time 't', M_∞ is the amount of drug released at infinite time. The value of the exponent 'n' decides the type of diffusion behavior as listed below:

- n = 0.5 Fickian diffusion
- n = 1 Case II diffusion
- n > 0.5 Non-Fickian diffusion
- n < 0.5 Quasi Fickian diffusion

2.8. Wound healing studies

24 h prior to the surgery, mice were anesthetized under isoflurane and the dorsal hair was removed using a depilatory cream, to avoid irritation. On day 0, the mice were exposed to isoflurane [35–37] and a full thickness wound was created on the exposed dorsal skin using a sterile biopsy punch of 8 mm Ø (Kai Medical, Germany). Immediately after wounding, a silicon splint of 8 mm inner diameter was placed around the wound and fixed with Ethicon™ Mersutures to prevent local skin contraction [24]. Subsequently, circular dressings of 8 mm Ø (OP-Gel, OP-Gel-Aloe, OP-Gel-Curcumin, OP-Gel-Aloe Curcumin) were placed on the wound. In the control group, the wounds were left untreated to observe spontaneous healing. The entire area including the surrounding silicone ring was covered with a Tegaderm™ (3M) sterile transparent dressing. On day 4 postsurgery, the Tegaderm™ covering and the dressing were removed and on day 8 the sutures were removed. The mice were checked periodically and photographs were once again taken on days 12 and 21. On day 21, the healed tissue was harvested after sacrifice of mice under anesthesia for histological examination. The extent of wound closure was estimated by measuring the wound area using ImageJ software and the percentage of wound contraction was calculated according to the given equation.

$$\text{Wound contraction (\%)} = \frac{\text{Wound area on day 0} - \text{wound on 'x'}}{\text{Wound area on day 0}} \times 100$$

2.9. Histological examination

Healthy tissue and regenerated tissue were excised from the wound site on day 0 and day 21 respectively. These tissues were fixed in freshly prepared cold 4% paraformaldehyde in PBS at 4 °C overnight, and embedded in paraffin. 3 µm thick sections were cut using a Leica CM3050 S cryostat and were stained with Goldner Masson's Trichrome to identify collagen formation and neovascularization. Images were taken with a Leica DM7500 microscope.

2.10. In vitro cell viability analysis

The cytocompatibility of OP-Gel-drug dressings was evaluated on NIH3T3 mouse fibroblast cells using a MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay (Promega, Germany). NIH3T3 cells (5000/well) were seeded in 96-well culture plate with culture medium consisting of DMEM medium (Gibco® by Life Technologies, USA) containing 10% fetal calf serum and antibiotics (1% penicillin and streptomycin) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The dressings (6 mm Ø) were added to experimental wells, and cells were incubated for 24 h, 48 h and 72 h respectively. The cell viability

assay was carried out using a MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay using a fluorescent substrate according to the manufacturer's instructions. Subsequently, the fluorescence was measured at 400 nm excitation and 505 nm emission wavelengths on a TECAN Infinite® M 1000 PRO Microplate reader equipped with a Quad 4 monochromator. The temperature was maintained in the range of 23–25 °C. The shaking time and shaking amplitude (linear) were 30 s and 2 mm, respectively.

2.11. Statistical analysis

The results were expressed as mean ± S.D. The significance of differences between average values of different experimental treatments and controls was assessed by the Student's *t*-test. $P \leq 0.05$ was considered to be significant.

2.12. Cell morphology studies

To analyze the effect of the dressings on the cell morphology, plates incubated for 24 h and 48 h were examined under a NIKON TE 300 Bright Field Inverted Microscope. Wells containing cells without any medium were treated as the control.

3. Results and discussion

In our previous work, we reported on the functionalization of pectin by periodic acid to yield a dialdehyde structure [19]; these aldehyde groups have then been exploited to undergo *in situ* crosslinking with the lysine and hydroxylysine groups of gelatin to form imine bonds as detailed in our earlier study leading to the formation OP-Gel biopolymeric matrices [16]. Natural herbal drugs, aloe vera and curcumin were then incorporated into the polymeric solution; when these OP-Gel-drug solutions were coated on nonwoven cotton fabrics, OP-Gel-Aloe and OP-Gel-Curcumin dressings were produced. The nonwoven cotton fabric acts as the support layer and at the same time, its highly porous structure assists in moisture vapor and gaseous transmission to and fro at the wound site. Glycerol, introduced into the OP-Gel system during crosslinking, acts as a plasticizer and ensures that the dressing is flexible. Along with physical adsorption of OP-Gel-drug colloidal solution on the fabric surface, hydrogen bonding and van der Waals interactions take place between the polymeric matrix and the functional groups on the backbone of cotton fibers, thus resulting in a cumulative adhesion of OP-Gel-drug on the surface of the fabric and providing an antimicrobial finish. The schematic for the biocomposite dressing fabrication is depicted in Fig. 1.

The morphologies of the OP-Gel-Aloe, OP-Gel-Curcumin and OP-Gel-Aloe Curcumin dressings were studied using a scanning electron microscope. The images are depicted in Fig. 2. Compared to the unmodified cotton fabric in Fig. 2(a), a uniform and smooth deposition of the polymeric matrix can be observed in Fig. 2(b–d), representing the OP-Gel-drug. Although curcumin was dissolved in ethanol prior to mixing with OP-Gel solution, it might still undergo phase separation upon encountering water, which is a non-solvent. The curcumin particles thus precipitated out may be deposited on the surface of the cotton fabric, and morphology as seen in Fig. 2(c) and (d) is observed.

To obtain a clear understanding of the drug release mechanism when the dressings are kept in contact with the wound, an experiment mimicking the physiological conditions was conducted. The biocomposite dressings were placed in contact with SBF (pH 7.4) for 2 h. At the end of this time period, the dressings were dried under vacuum and the morphological changes were examined. In the case of OP-Gel-Aloe dressings after drug release (Fig. 2(e)), a clear erosion of the biopolymeric finishing could be observed. Although smaller molecules like nanosilver or

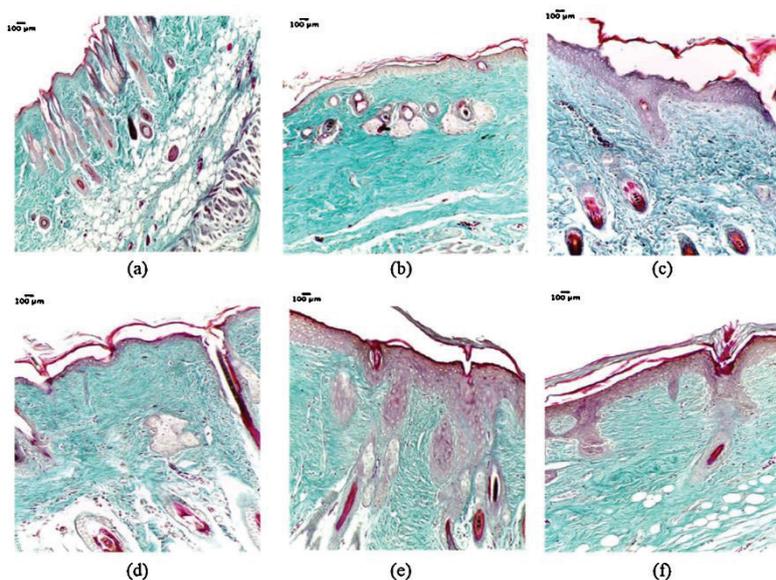


Fig. 11. Histological analysis of excised wound tissue: (a) healthy tissue on day 0, healed tissue on day 21 when treated with (b) spontaneous healing, (c) OP-Gel, (d) OP-Gel-Aloe, (e) OP-Gel-Curcumin and (f) OP-Gel-Aloe Curcumin.

ciprofloxacin can diffuse through the polymeric matrix and interact with the surrounding physiological medium, aloe vera consists of several macromolecules and therefore it is proposed that the drug release is primarily due to the leaching of the drug containing polymeric matrix. Meanwhile, OP-Gel-Curcumin and OP-Gel-Aloe Curcumin dressings exhibit a rough surface morphology (Fig. 2(f) and (g)). It is very clear from the images that leaching of the polymeric matrix took place during contact with the SBF. The topmost layer of the polymeric matrix is eroded and random deposits can be seen on the surface of the fibers. Additionally, curcumin diffuses through the matrix when the network structure is swollen. Therefore, OP-Gel-Curcumin and OP-Gel-Aloe Curcumin dressings exhibit a biphasic release mechanism – erosion of the biopolymeric matrix followed by drug diffusion.

To achieve a potent and prolonged antimicrobial activity, a sustained drug release is necessary. Ergo, the drug release behavior of OP-Gel-Curcumin dressings has been monitored and the cumulative release profile was constructed according to a previously obtained calibration equation. The release profiles of OP-Gel-Curcumin dressings with varying curcumin content are shown in Fig. 3. A two phase release behavior is observed, a burst release followed by a sustained release. Such a release mechanism is expected to be effective in controlling and preventing infection in the very early stages of wound infliction. It is interesting to note that an almost linear relationship is followed upon the completion of the burst phase. It is very clearly evident that a steady state has not been attained even at the end of 48 h, where a release of $\sim 19 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ was obtained for OP-Gel-Curcumin dressing with 40% curcumin. Such a prolonged release might indicate a long scale antimicrobial potency of the biocomposite dressings fabricated.

The release kinetics have been calculated for the OP-Gel-Curcumin dressing with a curcumin content of 40% according to the Korsmeyer-Peppas equation, and the results obtained are depicted in Fig. 4. From the value of the exponent 'n', it was understood that

during the burst phase, case II diffusion took place edging into a non Fickian model, while a quasi Fickian diffusion behavior was derived from the sustained release phase.

The drug release behavior of OP-Gel-Aloe dressings could not be monitored due to the lack of chromophores in aloe vera and lack of diffusion. Although the diffusion behavior of curcumin through the OP-Gel-Aloe Curcumin could be calculated, an accurate drug release profile was not possible due to the alternate release method adopted by aloe vera.

Curcumin is well known to exhibit strong antioxidant activity comparable to vitamins C and E, and is thus capable of relieving oxidative stresses at the wound site by conjugating with superoxide anion radicals, hydroxyl radicals and nitrogen dioxide radicals [13,25,26]. At the same time, the α -tocopherol form of vitamin E, a powerful antioxidant, is known to be present in aloe vera [4]. Therefore, it was proposed that the free radical scavenging activity of the biocomposite OP-Gel-Curcumin and OP-Gel-Aloe dressings be examined. The results of the DPPH free radical scavenging assay are shown in Fig. 5. OP-Gel-Curcumin dressings show $\sim 80\%$ free radical scavenging activity at a drug loading of 40 wt% (Fig. 5(a)). Although the evidence for the antioxidative mechanism of curcumin is unclear, it is believed that since curcumin exists in the cis-enol form in solution, the enolised diketone system is responsible for the scavenging activity according to the Norris type I reaction mechanism [27]. On the other hand, the OP-Gel-Aloe dressings exhibited only 8% free radical scavenging activity at a comparable value of drug loading as seen in Fig. 5(b). It has been proposed that aloe vera enhances the superoxide dismutase content in the plasma which utilizes the superoxide radicals to form hydrogen peroxide [28]. Tocopherol has been found to be stable till 60°C , beyond which it undergoes oxidation and forms dimers, trimers and α -tocopherol quinones [38]. Since the reaction temperature was maintained at 60°C , no special precautions were taken to preserve the antioxidant activity of aloe vera. However, there might be some stray reactions

due to the absence of an inert atmosphere that adversely affect the antioxidant activity of aloe vera. Alternatively, the anthraquinones present in aloe vera are also capable of radical scavenging activity and may exert antioxidant activity [4]. However, it has to be kept in mind that the free radical scavenging assay is conducted using an ethanolic solution of DPPH. Since curcumin is soluble in ethanol, the curcumin deposited on the surface of the fabric might dissolve in the surrounding solvent and this accounts for the higher than expected antioxidant activity.

The antimicrobial efficacy of the OP-Gel-Aloe, OP-Gel-Curcumin, and OP-Gel-Aloe Curcumin biocomposite dressings was evaluated against Gram-positive *S. aureus* and Gram-negative *E. coli*, both qualitatively as well as quantitatively. The zones of inhibition results are shown in Fig. 6. No zones of inhibition could be observed even at high aloe vera contents, as seen in Fig. 6(a) and (d). Since aloe vera consists of a large number of macromolecular polysaccharide components, diffusion of the drug through the polymeric matrix is highly restricted. Therefore diffusion into the surrounding nutrient medium is negligible, resulting in an absence of the zone of inhibition. As in the case of OP-Gel-Aloe dressings, no appreciable zone of inhibition could be observed with either OP-Gel-Curcumin or OP-Gel-Aloe Curcumin dressings. Since curcumin is hydrophobic, leaching into the surrounding nutrient medium is difficult, resulting in extremely small zones of inhibition.

Although zones of inhibition could not be observed, aloe vera loaded OP-Gel dressings exhibited strong antimicrobial activity as evidenced by the colony count method. At 40% aloe vera content, ~84% antimicrobial activity could be observed against *E. coli* as well as *S. aureus*. There are a large number of low molecular weight compounds in aloe vera, including lupeol, cinnamonic acid, salicylic acid and uric acid. They are capable of destroying the bacterial cells by interfering with the enzymatic processes [29]. At the same time, acemannan, the polysaccharide widely considered to be responsible for the anti-inflammatory behavior of aloe vera also exerts an antimicrobial effect [30]. OP-Gel-Curcumin dressings exhibited a potent antimicrobial activity when tested according to the colony count protocol. It is evident from Fig. 7(c) and (g) that curcumin exhibits a stronger antimicrobial activity than aloe vera at a similar drug content. This effect is observed at all concentrations (data not shown). While OP-Gel-Aloe dressing with 40% aloe vera content exhibits ~83% efficiency, OP-Gel-Curcumin with 40% curcumin content exhibits ~93% efficiency. There are various mechanisms proposed for the antibacterial activity of curcumin. It is widely believed that curcumin interferes with the shikimate pathway, a metabolic process followed by microorganisms to synthesize aromatic amino acids. Recently, Rai et al. proposed that curcumin inhibits the assembly of FtsZ protofilaments necessary for bacterial cytokinesis, thus preventing bacterial proliferation [31]. However, the OP-Gel-Aloe Curcumin dressings do not seem to have fared so well (Fig. 7(d) and (h)). Instead of an augmented antimicrobial activity, a detrimental effect is displayed; this may suggest that the drug composition plays an important role in the infection control capability of the biocomposite dressing. We theorized that there might be some chemical interactions between aloe vera and curcumin that lead to a reduction in their biological activity. In order to confirm this hypothesis, we conducted a separate study on the nature of interactions between aloe vera and curcumin. Spectral analysis showed that the *o*-acetyl ester group of acemannan present in aloe vera reacts with the phenolic group of curcumin at ambient pH. Since the acetyl groups in aloe vera and the phenolic groups in curcumin are responsible for the antimicrobial nature [7,25], the consumption of these units was responsible for the decreased activity shown by OP-Gel-Aloe Curcumin dressings.

From the *in vitro* antimicrobial analysis, it was decided that OP-Gel-Aloe and OP-Gel-Curcumin dressings with 40% drug loading

exhibited the highest antimicrobial activity and therefore were chosen for cytocompatibility assay and *in vivo* wound healing analysis. Their performance was contrasted against that of an OP-Gel-Aloe Curcumin dressing with 40% drug loading (50/50 aloe vera/curcumin). The cell viability analysis was carried out on NIH3T3 mouse fibroblast cells using a Multitox-Glo Multiplex Cytotoxicity assay. Cells that were left untreated were considered as the control. The cell viability was checked for at the end of 24 h, 48 h and 72 h incubation using a fluorescence microplate reader and is reported in terms of the relative fluorescence units (RFU). The results of the *in vitro* cell viability assay are presented in Fig. 8. The OP-Gel matrices were found to be amenable to cell growth and proliferation. While it initially seemed that the OP-Gel-Curcumin dressings were highly favorable for cell attachment and growth from the readings obtained at 24 h, the cell viability gradually decreased. Fibroblasts incubated with OP-Gel-Aloe dressings exhibited the highest viability, while Bactigras® exhibited the least. At the end of 72 h treatment, the order of cell viability is as follows: untreated cells > OP-Gel-Aloe > OP-Gel > OP-Gel-Curcumin > OP-Gel-Aloe Curcumin. Statistical analysis showed that all the groups were significantly different at $P \leq 0.05$. Furthermore, the morphologies of the NIH3T3 mouse fibroblasts were examined after 24 h treatment and 48 h treatment (data not shown).

It is evident that OP-Gel-Aloe dressings provide a very cell friendly matrix. Even OP-Gel dressing treated fibroblasts had the highest viability when compared with synthetic drug loaded dressings. However, when aloe vera was incorporated as the bioactive agent, an enhanced cell proliferation was noticed. In their extensive review on aloe vera and its biologic effects, Choi and Chung have pointed out that mannose-6-phosphate, which is an active ingredient for wound healing and inflammation, binds itself to a protein to form a mucopolysaccharide membrane and leads to an increase in the fibroblast activity [4]. Therefore, it seems as though the migration of the fibroblasts has been influenced and enhanced upon treatment and incubation with OP-Gel-Aloe biocomposite dressings. Keeping in tune with the cell viability results, it could be seen that the cell attachment on curcumin based dressings is very poor. It was expected that OP-Gel-Curcumin dressings would lead to appreciable levels of fibroblast proliferation; however, the results were to the contrary. There have been various reports suggesting that curcumin induces apoptosis in NIH3T3 fibroblast cells by inducing cell shrinkage, chromatin condensation and DNA fragmentation [32,33]. This might serve as a reasonable explanation for the low cell viability values obtained. A similar sort of morphology was observed in the case of OP-Gel-Aloe Curcumin treated fibroblasts. Cell shrinkage and condensation could be clearly noted. Such an observation explains the comparable cell viability results obtained with OP-Gel-Curcumin and OP-Gel-Aloe vera dressings.

In addition to the cytocompatibility studies, *in vivo* wound healing studies were carried out using full thickness excisional wound splinting model on C57BL/6J mice. Wounds were created on the dorsal side of the mice using a biopsy punch of 8 mm Ø. A silicone ring was carefully placed around the wound and sutured into the surrounding skin so as to prevent contraction. The dressings were then placed on the wounds and at subsequent time intervals, the healing was monitored. A spontaneous healing model was used as the control. The healing observations are displayed in Fig. 9 and the rate of wound reduction can be deduced from the calculations in Fig. 10.

OP-Gel dressing, without any drugs, also seems to influence the healing process, with oxidized pectin and gelatin acting as the bioactive components. A dramatic decrease in the wound area was observed in the case OP-Gel-Aloe treated wounds with ~80% healing occurring in 8 days. At the same time interval, wounds treated with OP-Gel-Curcumin and OP-Gel-Aloe Curcumin healed ~60%

and 38%, respectively. Furthermore, it has to be mentioned that upon gross examination, the scar formation appears to be diminished in the case of OP-Gel-Aloe treated wounds. Indeed, aloe vera is routinely used to prevent scar and keloid formation. Acemannan, a major component in aloe vera, is reported to exhibit immunomodulatory – by upregulation of phagocytosis – and anti-inflammatory activities [34]. Such an immunomodulatory effect may fasten the wound healing process and enhance the migration of fibroblasts, thus leading to an increased collagen synthesis and resulting in a diminished scar formation.

Histological examination was conducted on healthy and healed tissues to analyze the formation of collagen, neovascularization and reepithelialisation. The images of the stained sections are presented in Fig. 11. The sections represented in Fig. 11(a) and (b) pertain to healthy tissue and healed tissue after spontaneous healing, respectively. While collagen formation could be observed in the case of spontaneously healed tissue, there was an absence of blood vessels and hair follicles which indicates the formation of a scar. Although good nuclei migration could be observed in the tissues harvested from OP-Gel treated wounds (Fig. 11(c)), a thick epidermal layer could be noticed along with a lack of blood vessels. On the other hand, OP-Gel-Aloe treated wound tissues (Fig. 11(d)) exhibited a thinner epidermal layer and organized collagen deposition. A clearly defined stratum corneum could be seen along with big blood vessels. Therefore, it was concluded that treatment with OP-Gel-Aloe dressings did not lead to any adverse effects. Aloe vera acted as the bioactive component and induced rapid wound healing and diminished scarring. In the case of OP-Gel-Curcumin and OP-Gel-Aloe Curcumin treated wound tissues (Fig. 11(e) and (f)), a thick epidermal layer was formed. An organized collagen deposition could be observed. The pronounced lack of blood vessels and hair follicles indicates the scar area.

4. Conclusions

Wholly biodegradable OP-Gel-Aloe, OP-Gel-Curcumin, OP-Gel-Aloe Curcumin biocomposite dressings were fabricated using a dip coating method. The nonwoven cotton fabric that has been used provided support and better handling characteristics. *In vitro* antibacterial testing revealed that at 40% drug loading, the OP-Gel-Aloe and OP-Gel-Curcumin dressings exhibited ~83% and ~93% efficiency, respectively. On the contrary, a 50/50 aloe vera/curcumin drug composition led to a reduced antimicrobial activity due to a reaction between the acetyl ester groups of aloe vera and phenolic units of curcumin. Cell viability analysis was carried out on NIH3T3 mouse fibroblast cells. OP-Gel-Aloe treated fibroblasts had the highest viability, with the matrices providing a substrate for good cell attachment and proliferation. On the other hand, OP-Gel-Curcumin and OP-Gel-Aloe Curcumin seemed to have induced apoptosis in NIH3T3 cells. Fibroblasts treated with OP-Gel-Aloe dressings exhibited good confluence and morphology at the end of 48 h. When the wound healing efficiency of the fabricated dressings was compared, OP-Gel-Aloe exhibited very rapid healing with 80% of the wound healing in just 8 days. Furthermore, aloe vera exerted a strong anti-inflammatory effect and prominent scar prevention. Histological examination revealed that an ordered collagen formation and neovascularization could be observed along with an enhanced migration of fibroblasts and

keratinocytes. Therefore, from this extensive study and pre-clinical trials, it can be concluded that OP-Gel-Aloe biocomposite dressings could be considered as viable materials with strong potential for effective wound management. They represent a new class of wound dressings with all the characteristics of an ideal wound dressing system.

References

- [1] D. Harper, A. Young, C.E. McNaught, *Surgery (Oxford)* 32 (2014) 445–450.
- [2] M.C. Robson, *Surg. Clin. N. Am.* 77 (1997) 637–650.
- [3] K. Vowden, P. Vowden, *Surgery (Oxford)* 32 (2014) 462–467.
- [4] S. Choi, M.H. Chung, *Semin. Integr. Med.* 1 (2003) 53–62.
- [5] J.E. Fulton, *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 16 (1990) 460–467.
- [6] G.G. Pereira, S.S. Guterres, A.G. Balducci, P. Colombo, F. Sonvico, *BioMed Res. Int.* 2014 (2014) 9.
- [7] P. Inpanya, A. Faikrua, A. Ounaron, A. Sittichokechaiwut, J. Viyoch, *Biomed. Mater.* 7 (2012) 035008.
- [8] S. Silva, E.G. Popa, M.E. Gomes, M. Cerqueira, A. Marques, S. Caridade, P. Teixeira, C. Sousa, J.F. Mano, R.L. Reis, *Acta Biomater.* 9 (2013) 6790–6797.
- [9] P. Jithendra, A.M. Rajam, T. Kalavani, A.B. Mandal, C. Rose, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5 (2013) 7291–7298.
- [10] A. Goel, A.B. Kunnammakara, B.B. Aggarwal, *Biochem. Pharmacol.* 75 (2008) 787–809.
- [11] R.A. Sharma, A.J. Gescher, W.P. Steward, *Eur. J. Cancer* 41 (2005) 1955–1968.
- [12] N. Sanoj Rejinold, P. Sreerekha, K. Chennazhi, S. Nair, R. Jayakumar, *Int. J. Biol. Macromol.* 49 (2011) 161–172.
- [13] D. Gopinath, M.R. Ahmed, K. Gomathi, K. Chitra, P.K. Sehgal, R. Jayakumar, *Biomaterials* 25 (2004) 1911–1917.
- [14] D. Brahatheeswaran, A. Mathew, R.G. Aswathy, Y. Nagaoka, K. Venugopal, Y. Yoshida, T. Maekawa, D. Sakthikumar, *Biomed. Mater.* 7 (2012) 045001.
- [15] X.Z. Sun, G.R. Williams, X.X. Hou, L.M. Zhu, *Carbohydr. Polym.* 94 (2013) 147–153.
- [16] B. Gupta, M. Tummalapalli, B.L. Deopura, M.S. Alam, *Carbohydr. Polym.* 106 (2014) 312–318.
- [17] N.T. Ngoana, B.T. Chama, T. Dai Lamb, T. Tsukaharac, *Nanobiotechnology* 2 (2011) 55–64.
- [18] K. Varaprasad, Y.M. Mohan, K. Vimala, K. Mohana Raju, *J. Appl. Polym. Sci.* 121 (2011) 784–796.
- [19] B. Gupta, M. Tummalapalli, B.L. Deopura, M.S. Alam, *Carbohydr. Polym.* 98 (2013) 1160–1165.
- [20] S. Saxena, A.R. Ray, A. Kapil, G. Pavon-Djavid, D. Letourneur, B. Gupta, A. Pellé, *Macromol. Biosci.* 11 (2011) 373–382.
- [21] P. Lo Nostro, G. Capuzzi, A. Romani, N. Mulinacci, *Langmuir* 16 (1999) 1744–1750.
- [22] B. Gupta, M. Kumari, S. Ikram, *J. Polym. Res.* 20 (2013) 1–6.
- [23] R. Agarwal, M.S. Alam, B. Gupta, *J. Biomater. Tissue Eng.* 3 (2013) 273–283.
- [24] X. Wang, J. Ge, E.E. Tredget, Y. Wu, *Nat. Protoc.* 8 (2013) 302–309.
- [25] O.A.K. Khalil, O.M.M. de Faria Oliveira, J.C.R. Velloso, A.U. de Quadros, L.M. Dalposso, T.K. Karam, R.M. Mainardes, N.M. Khalil, *Food Chem.* 133 (2012) 1001–1005.
- [26] R.K. Maheshwari, A.K. Singh, J. Gaddipati, R.C. Srimal, *Life Sci.* 78 (2006) 2081–2087.
- [27] J.S. Wright, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* 591 (2002) 207–217.
- [28] Z. Yu, C. Jin, M. Xin, H. JianMin, *Carbohydr. Polym.* 75 (2009) 307–311.
- [29] R. Pereira, A. Mendes, P. Bártolo, *Procedia CIRP* 5 (2013) 210–215.
- [30] S.S. Silva, M.B. Oliveira, J.F. Mano, R.L. Reis, *Carbohydr. Polym.* 112 (2014) 264–270.
- [31] D. Rai, J. Singh, N. Roy, D. Panda, *Biochem. J.* 410 (2008) 147–155.
- [32] J.K. Lin, M.H. Pan, S.Y. Lin-Shiau, *Biofactors* 13 (2000) 153–158.
- [33] M.C. Jiang, H.F. Yang-Yen, J.J.Y. Yen, J.K. Lin, *Nutr. Cancer* 26 (1996) 111–120.
- [34] R. Stuart, D. Lefkowitz, J. Lincoln, K. Howard, M. Gelderman, S. Lefkowitz, *Int. J. Immunopharmacol.* 19 (1997) 75–82.
- [35] O.M. Tepper, J. Carr, R.J. Allen, C.C. Chang, C.D. Lin, R. Tanaka, S.M. Gupta, J.P. Levine, P.B. Saadeh, S.M. Warren, *Diabetes* 59 (2010) 1974–1983.
- [36] D. Jiang, Y. Qi, N.G. Walker, A. Sindrilaru, A. Hainzl, M. Wlaschek, S. MacNeil, K. Scharfetter-Kochanek, *Biomaterials* 34 (2013) 2501–2515.
- [37] K.K. Cherreddy, C.H. Her, M. Comune, C. Moia, A. Lopes, P.E. Porporato, J. Vanacker, M.C. Lam, L. Steintraesser, P. Sonveaux, H. Zhu, L.S. Ferreira, G. Vandermeulen, V. Prêat, *J. Controlled Release* 194 (2014) 138–147.
- [38] M. Miranda, H. Maureira, K. Rodriguez, A. Vega-Gálvez, *J. Food Eng.* 91 (2009) 297–304.

Discussion

Discussion

Ce projet de thèse est parti du constat que les thérapies conventionnelles de traitement des plaies cutanées ont des effets limités car elles n'ont pour effet que de permettre le démarrage de la cicatrisation sur une base saine, sans stimuler les mécanismes mis en jeu au cours des diverses phases qui la définissent. Par conséquent, de nouveaux concepts de pansements doivent être élaborés ciblant des mécanismes spécifiques du processus de cicatrisation afin d'accélérer la fermeture de la plaie et de restaurer la fonctionnalité du tissu cicatrisé. Des antioxydants tels que la VE et des facteurs de croissance des fibroblastes comme le FGF2, peuvent répondre à ces besoins en limitant la production de ROS générées après une blessure ou en agissant directement sur la réépithélialisation, la formation du tissu de granulation et le remodelage tissulaire. L'objet de ce travail a été d'imaginer des traitements à base de VE et/ou de FGF2 des plaies cutanées profondes du combattant telles que les brûlures thermiques et les plaies délabrantes.

Les effets bénéfiques de la VE et du FGF2 dans la cicatrisation sont bien connus et suscitent un intérêt pour le traitement des plaies. Cependant, leur utilisation comme composants de pansements ou, crèmes se heurte à certaines limites (dégradation rapide, faible biodisponibilité) qui restreignent leurs activités biologiques et par conséquent leur utilisation.

Pour surmonter ces difficultés, nous proposons un système de délivrance utilisant des NP fonctionnalisées par de la VE ou du FGF2. En effet, une supériorité des NP sur les pansements actuels résulte de leur capacité à transporter, à protéger et à permettre une libération contrôlée, voire ciblée, de molécules actives. Ces transporteurs permettent de renforcer l'action biologique de ces principes actifs en limitant leur dégradation tout en réduisant les quantités utilisées et donc les éventuels effets secondaires.

Bénéficiant de l'expertise de notre laboratoire dans la synthèse de NP de PLA de 200 nm de diamètre environ, nous avons pu envisager de les utiliser pour vectoriser la VE et le FGF2. Le polymère synthétique de poly(acide lactique) utilisé pour la synthèse des NP est biodégradable, biocompatible et biorésorbable. Le PLA est approuvé par la FDA et l'EMA et déjà utilisé dans de nombreuses applications en médecine (fils de suture, implants biorésorbables, etc.),

Discussion

renforçant la pertinence de son utilisation et devrait faciliter un développement clinique et industriel de ces vecteurs synthétiques. D'autre part, l'utilisation de ce polymère dans un contexte de cicatrisation cutanée est d'autant plus pertinent que son hydrolyse libère du lactate, un composé jouant un rôle important dans l'angiogenèse et la cicatrisation des plaies [106]. En effet, le lactate régule positivement l'expression de l'ARNm du VEGF en agissant par compétition de substrat (NAD⁺) entre l'enzyme LDH1 qui catalyse le lactate en pyruvate et la poly-ADP-ribose polymérase qui catalyse le mono-ADP-ribose en poly-ADP-ribose responsable de l'inhibition de l'expression du VEGF [107]. L'hydroxylation des procollagènes et la maturation des collagènes est régulées par la collagène prolyle hydroxylase qui est aussi régulée positivement par le lactate [106]. Il est important de souligner que la majeure partie des études sur la cicatrisation cutanée utilise des NP polymériques de PLGA pour vectoriser des principes actifs tels que des facteurs de croissances, des microARNs, des antibactériens [60] [108] [109] [110] [58]. L'avantage de ce polymère est qu'il libère plus rapidement du lactate par rapport au PLA. En effet, le PLGA de nature moins hydrophobe adsorbe plus d'eau. Ainsi, les lots de PLGA en solution sont par conséquent moins stables ce qui requiert généralement une étape supplémentaire pour leur stabilisation à long terme par lyophilisation.

Enfin, la méthode de synthèse des NP de PLA développée par le laboratoire consiste en la nanopréciipitation du polymère sans ajout de tensioactif ni stabilisant. Ainsi l'ambition est de limiter le nombre de composants chimiques introduits lors de la synthèse afin d'éviter des effets toxiques possibles.

De plus, cette méthode robuste et reproductible permet de produire des lots de NP de PLA homogènes en taille et à grande échelle. Enfin, les particules produites sont très stables en solution lorsqu'elles sont conservées à +4°C (plus de deux ans pour les particules non formulées). L'ensemble de ces propriétés permet d'envisager une production industrielle des produits dérivés de ces NP de PLA. Ce procédé de synthèse a déjà fait la preuve de sa faisabilité, notamment pour la production de particules de PLA utilisées comme adjuvants vaccinaux ou comme plateforme de délivrance d'agents pharmaceutiques actifs (immunomodulateurs, antibiotiques, antiviraux, etc.) (adjuvatis.com).

Dans un premier temps, il a fallu élaborer et caractériser les NP de PLA vectorisant de la VE et du FGF2. Ensuite, ces NP ont été testées *in vitro* pour évaluer leur efficacité potentielle, comme système de délivrance de vitamine E et de FGF2, sur la cicatrisation des plaies. Pour finir, des

Discussion

modèles expérimentaux *in vivo* ont été développés et caractérisés pour mettre en évidence l'efficacité des NP de PLA fonctionnalisées comme facteurs de stimulation de cicatrisation cutanée et de reconstruction dermique fonctionnelle.

Synthèse et caractérisation de NP de PLA-VE et NP de PLA-FGF2

Une grande partie de ce travail de thèse a consisté à (i) développer des NP de PLA fonctionnalisées avec de la VE ou du FGF-2, (ii) caractériser ces particules fonctionnalisées (caractéristiques physico-chimiques, taux de chargement et stabilité) et (iii) caractériser leurs actions biologiques *in vitro* et *in vivo*.

Une première étude a été réalisée pour évaluer l'influence du taux de chargement en VE sur les caractéristiques physico-chimiques des NP de PLA-VE, telles que la taille, l'indice de polydispersité et le potentiel zêta en les comparant des NP de PLA non fonctionnalisées. Des NP de PLA-VE ont été élaborées par nanoprécipitation sans ajout de tensioactif à des taux de chargement de VE encapsulée allant de 1,2% à 10% (m/m), avec des rendements d'encapsulation supérieurs à 84% dans tous les cas. Contrairement aux particules lipidiques développées pour l'encapsulation de la VE et stabilisées par des tensioactifs (Pluronic F68, Tween 80), notre procédé de synthèse se prête parfaitement à l'encapsulation de la VE, sans avoir à ajouter de tensioactifs [111].

De cette première étude, peu de différences physico-chimiques ont été constatées entre les particules de PLA-VE produites avec différents taux de chargement en VE, hormis l'indice de polydispersité qui augmente légèrement avec le taux de chargement.

De telles augmentations de taille et d' I_p ont déjà été observées par Khayata *et al.* qui ont produit des particules polymériques (polycaprolactone ou PLGA) par nanoprécipitation contenant divers taux de vitamine E encapsulée. Les capsules obtenues de type cœur-écorce étaient submicroniques et relativement homogènes en taille, les diamètres et valeurs d'indice de polydispersité augmentant avec la quantité de Vitamine E introduite : particules de 143 nm pour 50 mg de Vitamine E jusqu'à 236 nm de diamètre lorsque 150 mg de Vitamine E étaient introduits. Notons que dans tous les cas le rendement d'encapsulation était supérieur à 96%. Les auteurs expliquent ce résultat par la haute viscosité de la phase organique à cause de la

Discussion

Vitamine E, les taux de chargements étant, dans leur cas, particulièrement élevés (de l'ordre de 80%). Mais de telles augmentations de diamètres en fonction de la quantité de principe actif encapsulé ont également été observées sans que la viscosité de la phase aqueuse soit modifiée. Ainsi Musumeci *et al.* ont encapsulé du docetaxel, un alcaloïde hydrophobe, dans des particules de PLA ou de PLGA selon une méthode très proche de celle que nous avons utilisée, les particules étant stabilisées par du Tween 80 puis par une étape de lyophilisation. Le docetaxel a été introduite à 0,5 ou 1% (m/m) avec du PLA à différentes masses molaires donnant alors des particules de 130 à 180 nm de diamètre, avec des I_p de 0,06 à 0,4 [112]. Les auteurs ont constaté une augmentation des diamètres et des indices de polydispersité des particules formulées avec le taux de chargement : de 100 nm, I_p de 0,058 sans docetaxel à 157 nm, I_p 0,210 avec 1% de docetaxel pour le PLA R203 (Mw 16 000 g/mol) ou encore de 138 nm, I_p 0,136 sans docetaxel à 180 nm, I_p 0,403 avec 1% de docetaxel pour le PLA R207 (Mw 209 000 g/mol). Les auteurs décrivent une possible expansion de la matrice de polymère avec l'encapsulation de quantités croissantes de docetaxel qui expliquerait cette augmentation de taille. Notons que les augmentations de taille rapportées dans ces deux études sont faibles comparé à ce que rapportent Yenilmez *et al.* [113]. En effet, les auteurs ont produit des microparticules (MPs) de chitosane avec 10% (m/m) de VE encapsulée d'un diamètre moyen de $3,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$ vs $0,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$ en absence de VE, un indice de polydispersité moyen élevé dans les deux cas $0,61 \pm 0,01$ vs $0,97 \pm 0,01$ en absence de VE et un potentiel zêta moyen de $+44,5 \pm 0,0 \text{ mV}$ vs $+11,0 \pm 0,0 \text{ mV}$ en absence de VE. L'encapsulation de VE induit dans ce cas de profondes modifications des caractéristiques physico-chimiques des particules formées et semble même déstabiliser le système comme le montrent les tailles élevées (plus de 3 μm de diamètre) ainsi que la valeur d' I_p proche de 1.

Nous avons donc été capables de produire des particules de PLA-VE avec des taux de chargement en VE élevés (jusqu'à 10%), des rendements de chargement supérieurs à 84%, en induisant des faibles modifications de taille (autour de 200 nm), d'indice de polydispersité (qui reste proche de 0,1) et de potentiel zêta, comparé aux NP de PLA sans VE. Ces NP de PLA-VE à un taux de chargement de 10% ont un diamètre moyen de $215,4 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$, un indice de polydispersité moyen de $0,12 \pm 0,02$ et un potentiel zêta moyen de $-61,4 \pm 10,9 \text{ mV}$ ($n = 4$). La méthode ainsi développée semble donc prometteuse pour produire des particules submicroniques d'environ 200 nm (favorisant leur capture par les cellules par rapport à des particules microniques), contenant des taux élevés de VE encapsulée. Ramalho *et al.* décrivent

Discussion

également des particules de PLGA fonctionnalisées avec de la Vitamine D (VD) à des taux de chargement relativement élevés, de 5 à 8% (m/m) et des rendements d'encapsulation compris entre 57 et 83% [114]. Les particules ainsi produites (par émulsion stabilisée par du Pluronic F127) ont un diamètre de 172 nm (sans VD) et de 186 nm avec VD. Dans tous les cas, l'indice de polydispersité est $\leq 0,1$ et les particules chargées négativement. Leurs particules semblent stables quelques semaines, mais une stabilité à long terme requiert de lyophiliser ces particules, ce qui constitue une étape supplémentaire dans le processus de production.

Le profil de libération de la VE des NP de PLA a été caractérisé en utilisant deux méthodes développées spécifiquement à cet effet. En effet, la libération d'un principe actif hydrophobe hors des particules dans une solution aqueuse peut être naturellement limitée par la faible solubilité de la substance hydrophobe dans le milieu aqueux. Il est possible de diluer les particules de façon à ce que la concentration en principe actif ne soit pas saturante, mais cela requiert une méthode de dosage particulièrement sensible pour détecter ces très faibles concentrations.

C'est pourquoi nous avons plutôt utilisé un système biphasique (hydrophile/lipophile) pour (i) simuler la nature lipophile du *stratum corneum* de la peau et (ii) limiter la saturation de cette solution aqueuse en VE hydrophobe en ajoutant un solvant lipophile qui favorise sa solubilisation [96]. Les NP de PLA-VE ont été diluées dans une solution de PBS et la libération de la VE se fait dans cette phase aqueuse. La VE se dilue et se concentre ensuite dans la phase lipophile (hexane) qui surnage et dans laquelle la VE est soluble mais pas le PLA. Ainsi la phase aqueuse n'est jamais saturée en VE et la libération de la VE hors de la matrice hydrophobe des particules n'est pas limitée par sa faible solubilité dans l'eau. Le profil de libération observé est caractérisé par un burst correspondant à une libération initiale massive (15 % en 30 minutes) et qui représente généralement la libération du principe actif adsorbé à la surface des particules ou encapsulé à proximité de la surface [112]. La deuxième phase correspond à une libération plus lente et soutenue jusqu'à 75% de la VE libérée en 7 jours.

Nous avons également étudié le relargage de la VE en adaptant une deuxième méthode pour (i) se rapprocher des conditions physiologiques d'une plaie cutanée en se plaçant dans une solution aqueuse à pH acide et (ii) mimer l'interface milieu-membranes cellulaires en ajoutant un tensioactif qui favorise la solubilisation de la VE. Dans ce cas, les NP de PLA-VE ont été diluées dans une solution hydrophobe grâce à la présence d'une concentration importante de

Discussion

Tween[®] 80. Le profil de libération observé alors est caractérisé par un burst très important et très rapide puisque 89% de la VE encapsulée est libérée hors des NP de PLA-VE en seulement 30 min.

Ces études mettent en évidence une libération progressive et soutenue de la VE hors des NP de PLA dans un environnement biphasique (modèle 1), mais au contact des membranes cellulaires, une libération massive et très rapide de la VE pourrait se produire comme illustrés par les résultats obtenus avec le modèle 2. Ainsi, on peut donc faire l'hypothèse que l'encapsulation de la VE pourrait favoriser sa libération ciblée dans les cellules.

Nous nous sommes également intéressés à la stabilité des particules que nous avons produites. Ainsi les caractéristiques physico-chimiques et les taux de chargements de plusieurs lots de NP PLA-VE en solution ont été suivis à différentes températures de conservation, pendant 56 jours. Aucune instabilité majeure n'a été observée. Néanmoins, le lot de NP de PLA-VE au taux de chargement en VE de 7% (m/m) est celui qui présente le moins de variations dans le temps et aux différentes températures de stockage, et il a été utilisé comme référence pour la suite de l'étude. Ainsi, un taux de chargement de 7% en VE les NP de PLA-VE ont un diamètre moyen de 216 nm, un rendement d'encapsulation moyen de 84% correspondant à 2 mg/mL de VE.

L'encapsulation de FGF2 dans le cœur des NP de PLA n'est pas envisageable avec le mode de synthèse des particules par nanopréciipitation, et conduirait à une dénaturation de ces protéines lors de l'encapsulation (solubilisation en acétone) ou à un rendement d'encapsulation très faible, car la protéine est hydrophile. En revanche, l'adsorption passive de protéines à la surface des particules de PLA est à la fois une méthode de formulation très douce non dénaturante pour les protéines, et une stratégie qui s'est avérée efficace par exemple pour la vectorisation d'antigènes dans le cadre du développement de candidats vaccins anti-HIV [115] [116] [117]. De plus, une fois adsorbé à la surface des particules, le FGF2 reste accessible aux récepteurs de surface cellulaires. Un protocole d'adsorption a été développé avec un taux de chargement en FGF2 de 0,5% (m/m) pour permettre d'obtenir à la fois un bon rendement d'adsorption de FGF2 (74%, 11 µg/mL) et un diamètre des particules formulées qui reste submicronique (201 nm). Le FGF2 est une protéine très cationique, susceptible de s'adsorber très facilement à la surface des NP de PLA anioniques. Mais pour obtenir des particules correspondant à notre cahier des charges, nous avons dû limiter les interactions électrostatiques entre la protéine et les particules, afin d'éviter la formation d'agrégats particulaires. Pour cela, l'adsorption a été réalisée dans un

Discussion

tampon proche du point isoélectrique de la protéine (point isoélectrique, pI 9,6). D'autres systèmes de délivrance à base de NP polymériques ont été décrits pour vectoriser des facteurs de croissance. Mais le VEGF, le FGF2 et l'EGF ont à chaque fois été encapsulés dans des NP de PLGA produites par émulsion et stabilisées par des tensioactifs (Pluronic® F-127, F-68, PVA) [109] [118] [62].

Evaluation de l'efficacité *in vitro* des NP de PLA-VE et des NP de PLA-FGF2

Les NP de PLA-VE n'ont montré aucune toxicité sur les fibroblastes. L'effet antioxydant de la VE encapsulée dans les NP de PLA est maintenu et permet de diminuer la production de ROS intracellulaires des fibroblastes mise en condition de stress oxydant. Cet effet a déjà été démontré dans de nombreuses études [119] [120] [121].

L'évaluation *in vitro* de la capacité du FGF2 formulé ou non avec les NP de PLA, a d'abord nécessité de développer les conditions de culture adéquates. En effet, pour s'affranchir des facteurs de croissance présents dans le sérum généralement ajouté dans le milieu de culture, il a fallu dans un premier temps déterminer la proportion de sérum dans le milieu qui permette de mettre en évidence l'effet du FGF2 sans induire la mort cellulaire. Deux modèles ont donc été utilisés : un modèle expérimental pour étudier la prolifération des fibroblastes et un modèle de « plaie » *in vitro* dans lequel une brèche est pratiquée dans un tapis cellulaire de fibroblastes, permettant d'évaluer leur capacité à migrer dans une plaie.

La capacité du FGF2 à stimuler la prolifération des fibroblastes, une fois celui-ci adsorbé à la surface des NP de PLA a été évaluée par un test fondé sur la quantification de l'ADN intracellulaire. Cette méthode est plus sensible que les tests métaboliques tels que le XTT, le MTT ou UptiBlue™ dans lesquels nos composés à tester peuvent interférer avec les enzymes impliquées dans le fonctionnement du test métabolique et ainsi créer des faux positifs. Aucune différence significative n'a été relevée entre les fibroblastes traités avec des NP de PLA-FGF2 et ceux traités par du FGF2 libre. L'activité stimulante du FGF2 adsorbé est donc comparable à celle du FGF2 libre pour la prolifération cellulaire. Les particules formulées ont également été testées pour leur capacité à induire la prolifération/migration de fibroblastes dans un modèle de « brèche » *in vitro*. Les NP de PLA-FGF2 et le FGF2 libre ont montré une capacité identique à induire la prolifération/migration des fibroblastes jusqu'à 24 h, en réduisant significativement

Discussion

le temps de fermeture de la « brèche » du scratch test, comparé aux cellules non traitées ou traitées avec des NP de PLA nues. Ces résultats démontrent que l'activité biologique du FGF2 après adsorption sur des NP de PLA a bien été conservée. De plus, aucune cytotoxicité des NP de PLA-FG2 n'a été mise en évidence sur des fibroblastes.

Développement de modèles expérimentaux pour l'étude de la cicatrisation *in vivo*

Les résultats des tests *in vitro* utilisés pour évaluer l'efficacité des NP de PLA fonctionnalisées nous ont renseignés sur leur activité biologique. Celle-ci a été mise en évidence pour les NP de PLA-VE et pour les NP de PLA-FGF2. Comme mentionné dans l'étude bibliographique, ces modèles présentent des limites car ils ne reflètent pas un environnement intégré et fonctionnel tel qu'un organisme entier.

Pour se rapprocher au plus près des processus physiologiques mis en place chez l'homme après blessure, nous avons développé des modèles expérimentaux de plaies cutanées profondes. Dans le contexte de plaies profondes se rapprochant le plus des plaies délabrantes et des brûlures du combattant, nous avons mis en place des modèles plaies d'excision cutanée et de brûlure thermique de 3^{ème} degré. Ces deux modèles ont été développés, sur souris SKH1 immunocompétentes et sans poils. Cette souche de souris représente un avantage majeur car il n'est pas nécessaire de dépiler les animaux avec des crèmes dépilatoires susceptibles d'engendrer des réactions physiologiques non contrôlées. Le modèle de plaie d'excision décrit par Galiano *et al.* (2004) sur des souris C57/BL6J a été utilisé comme référence et adapté sur souris SKH1 [102]. Ce modèle est fréquemment utilisé dans les études précliniques pour tester l'efficacité de nombreux biomatériaux sur la cicatrisation. Une amélioration apportée dans ce modèle initial est l'utilisation d'un anneau de silicone fixé autour de la plaie pour (i) limiter les effets de contractions cutanées liés à la présence du muscle *panniculus carnosus* chez les rongeurs, et pour (ii) induire une cicatrisation par réépithélialisation et formation du tissu de granulation [48]. Avec cet anneau autour de la plaie, la taille des plaies est plus reproductible par rapport aux souris excisées sans anneaux [122]. Cependant, il convient de noter que ces dispositifs altèrent l'environnement mécanique de la plaie en entravant les forces de traction générées à l'intérieur et autour du site de la plaie [123].

Discussion

Un protocole de brûlure thermique du 3^{ème} degré, décrit par Stevens *et al.* (1994) sur souris CD1, a également été adapté et caractérisé, sur la souris SKH1 [103]. A l'issue de cette thèse, nous pouvons donc proposer un protocole standardisé de brûlure thermique de 3^{ème} degré sur souris sans poils immunocompétente. De nombreux protocoles ont été décrits dans la littérature et l'utilisation d'un plot en métal préchauffé dans un bain marie sec constitue une alternative aux approches utilisant de l'eau bouillante ou bien une flamme. Dans les études publiées sur la souris utilisant des plots métalliques, différentes températures de plots sont utilisées allant de 92°C à 180°C associées à des temps d'applications sur la peau allant de 5 sec à 60 sec [36] [124] [125] [126] [127] [103]. Dans l'objectif de standardisation du protocole de brûlure thermique de 3^{ème} degré sur la souris SKH1 nous avons testé différents temps d'application d'un plot en laiton chauffé à 100°C allant de 3 sec à 25 sec. Pour créer des plaies reproductibles le plot métallique est appliqué sur la peau en utilisant uniquement la gravité, c'est à dire que la pression appliquée sur la peau résulte du seul poids des plots. En effet, des études ont montré que l'intensité de la pression appliquée sur la peau peut affecter la profondeur et l'étendue de la brûlure [128]. Un temps d'application du plot de 5 sec a été retenu pour induire une brûlure de 3^{ème} degré avec des dommages tissulaires impliquant la totalité du derme et de l'hypoderme, tel que nous l'avons caractérisé par des observations histologiques. Nous avons aussi montré une progression des dommages dans le tissu (nécrose cellulaire, cellules inflammatoires, MEC dégradée) entre 2 h et 72 h après la brûlure. Des observations histologiques de peaux de patients brûlés [26] [29] [129] [130] et issues de modèles expérimentaux de brûlure thermique tels que le porc [129] ont montré que la brûlure est un processus dynamique qui est à son maximum 3 jours après la brûlure. La coloration progressive de la peau passant du jaune au marron après brûlure est corrélée à la formation d'une escarre. Nous avons souhaité intégrer à ce protocole une étape qui est pratiquée en clinique pour la prise en charge des brûlures de 3^{ème} degré chez l'homme. En effet, quatre jours après la brûlure une étape de débridement est réalisée pour éliminer le tissu nécrotique par excision. Comme mentionné dans de nombreuses publications, cette étape induit la diminution de la réponse inflammatoire si elle est réalisée suffisamment tôt après la brûlure [131] [132]. En effet, dans une étude menée chez le rat, un débridement effectué 24 h après la brûlure induit une diminution de production des principales cytokines pro-inflammatoires 5 jours après la brûlure ce qui n'est pas le cas lorsque l'étape de débridement n'est pas réalisée [131]. Cette étape étant rarement réalisée dans les modèles de brûlures de 3^{ème} degré publiés il est difficile de comparer nos résultats de cinétique de fermeture de la plaie à ceux de la littérature. Dans nos essais, la plaie est refermée 14 jours après la brûlure en

Discussion

moyenne, alors que dans une étude de brûlure de second degré chez la souris ne réalisant pas de débridement, la plaie n'est toujours pas refermée après 14 jours [133]. Même si l'analyse histologique est considérée comme le « gold standard » pour évaluer la profondeur de la brûlure, cette technique présente des limites. En effet, les dommages structurels ne sont pas systématiquement associés à une perte de fonctionnalité tissulaire. D'autre part, le fait que les dommages induits par la brûlure soient progressifs rend difficile l'interprétation de biopsies réalisées trop tôt [134]. Comme mentionné dans l'étude bibliographique, la physiopathologie de la brûlure engendre des modifications de la perfusion sanguine cutanée [26]. Les observations histologiques montrent des vaisseaux sanguins hémorragiques et dilatés entre J1 et J3 ce qui est en lien avec la perte de fonctionnalité microvasculaire illustrée par une diminution du flux sanguin, suggérant des atteintes vasculaires importantes. Quatre jours après la brûlure, le flux sanguin est en dessous du flux basal mais est restauré à J7 après brûlure. Ces résultats sont similaires à ceux de Langer *et al.* sur souris SKH1 qui ont montré que 1 et 3 jours après la brûlure le flux sanguin artériel est diminué par rapport au flux basal, avec des moyennes de flux de 71% et de 70% vs 100%, respectivement [135].

A la fin de notre étude (J16), le tissu cicatrisé est caractéristique d'un tissu cicatrisé en phase de tissu de granulation tardif et est caractérisé par une réaction inflammatoire élevée comparé à la peau saine.

Pour pallier le fait que la souris cicatrise spontanément sans traitement quelconque, un terrain diabétique entravant les processus de réparation-reconstruction tissulaire est opportun et pertinent pour tester l'efficacité de nos « NP fonctionnalisées » dans des conditions stringentes. Ainsi, un diabète de type I sur souris SKH1 a été induit chimiquement et suivi, et un ralentissement de cicatrisation a été observé sur les deux types de plaies réalisées. Pour l'induction chimique expérimentale, l'injection, par voie IP, d'une dose unique et massive de streptozotocine (STZ, 195 mg/kg de poids vif), entraînant la destruction des cellules β pancréatiques et induit un diabète de type 1, avec une hyperglycémie stable et durable [105]. Le processus de cicatrisation de ces deux modèles de plaies sur souris SKH1 saines et diabétiques a été caractérisé par un suivi macroscopique, microscopique et par analyse de l'expression de 84 gènes impliqués dans le processus de cicatrisation. La fonctionnalité du tissu en cours de cicatrisation et reconstruit a été évaluée par analyses physiologiques de la microcirculation cutanée sanguine.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'objectif de cette thèse était de mettre en œuvre le développement d'une thérapie innovante des plaies cutanées profondes, basée sur l'utilisation de nanoparticules biodégradables vectrices de médiateurs de la cicatrisation. Le but recherché est d'accélérer la cicatrisation cutanée et de favoriser la reconstruction d'un derme fonctionnel. A cette fin, la stratégie suivie a été de réduire la réaction inflammatoire pour en contenir les effets délétères et de stimuler la réépithélialisation pour accélérer la cicatrisation et réduire le risque infectieux. Les moyens mis en œuvre pour atteindre ces objectifs ont été l'utilisation d'un antioxydant, la vitamine E (VE) et d'un facteur de croissance des fibroblastes (FGF2), vectorisés par des nanoparticules (NP) biocompatibles et biodégradables à base de poly(acide lactique) (PLA).

Les NP-PLA ont été élaborées par nanopréciptation, sans ajout de tensioactifs, à partir d'un polymère synthétique obtenu au laboratoire par « chimie verte » utilisant le zinc (Zn^{++}) comme catalyseur. Ces NP contiennent l'antioxydant (VE) encapsulé dans leur cœur hydrophobe, ou portent le facteur de croissance fibroblastique (FGF2) adsorbé à leur surface. Ces formulations ont alors été caractérisées par des méthodes physico-chimiques, puis testées *in vitro* pour évaluer leur efficacité potentielle, comme système de délivrance de vitamine E et de FGF2, sur la cicatrisation des plaies. Des modèles expérimentaux *in vivo* ont été développés et caractérisés pour mettre en évidence l'efficacité des NP de PLA fonctionnalisées comme facteurs de stimulation de cicatrisation cutanée et de reconstruction dermique fonctionnelle.

Les NP de PLA-VE que nous avons synthétisées par nanopréciptation à un taux de chargement de VE de 7% (m/m) avaient un diamètre moyen de 216 nm, avec un indice de polydispersité (I_p) moyen de 0,07 ce qui prouve l'homogénéité des lots produits. Le potentiel de surface moyen était de -67 mV. Le rendement d'encapsulation était en moyenne de 86%. Le taux de chargement en VE était modulable, et nous avons pu le faire varier de 1,2% à 10% (m/m). La cinétique de libération de la VE des NP de PLA-VE a été évaluée dans deux milieux de relargage. Une libération de 89% de VE des NP de PLA-VE en 30 min a été observée dans un environnement mimant le pH acide de la plaie et les membranes cellulaires contrairement au second milieu mimant le *stratum corneum* de la peau, où 15% de VE était libérée des NP de PLA-VE. Une bonne stabilité des NP de PLA-VE aux différents taux de chargement en VE

Conclusion et perspectives

(1,2% à 10%) a été observée à 4°C, 25°C, et 37°C comme attesté par la stabilité de plusieurs paramètres (taille moyenne de 218 nm, un indice de polydispersité moyen de 0,08 et potentiel zêta moyen de -60 mV) sur une durée de près de deux mois. Nos résultats montrent que l'activité antioxydante de la VE n'est pas perturbée par l'encapsulation dans des NP de PLA, et qu'elle est légèrement supérieure à celle de la vitamine E libre, dans un système *in vitro* de fibroblastes en culture soumis à un stress oxydant. Enfin, les NP de PLA-VE utilisées dans notre étude n'ont montré aucune cytotoxicité.

Les NP de PLA-FGF2 synthétisées par adsorption passive de FGF2 sur des NP de PLA nues à un taux de chargement en FGF2 de 0,5% (m/m) avaient un diamètre moyen de 201 nm, avec un indice de polydispersité moyen de 0,18, attestant de l'homogénéité des lots produits. Le potentiel de surface moyen était de -49,6 mV. Le rendement d'adsorption moyen était de 74%, avec une concentration de FGF2 de 11 µg/mL. L'activité biologique du FGF2 n'est pas diminuée par son adsorption à la surface des NP de PLA, comme montré par la capacité des NP de PLA-FGF2 d'induire la prolifération (synthèse d'ADN) et la migration (Scratch test) de fibroblastes en culture. A l'égal des NP de PLA-VE, les NP de PLA-FGF2 n'ont montré aucune toxicité sur les fibroblastes. Ces résultats montrent que les NP de PLA-VE comme les NP de PLA-FGF2 ont les caractéristiques de bons candidats médicaments pour la délivrance *in situ* de facteurs de cicatrisation de plaies.

Deux modèles expérimentaux de plaies cutanées profondes ont été développés sur souris sans poils SKH1 saines : Un modèle robuste de brûlure cutanée thermique de 3^{ème} degré, qui se caractérise par une inflammation massive de la plaie et par un stade de granulation tardif après 16 jours de cicatrisation, a été mis au point et décrit. Un modèle de plaie d'excision cutanée, adapté de celui de Galiano *et al.* a également été utilisé. Un modèle de cicatrisation retardée a été obtenu par induction chimique d'un diabète de type I stable avant réalisation des plaies d'excision ou de brûlure. Ces modèles de plaies cutanées ont été caractérisés tout au long du processus de cicatrisation par des études macroscopiques de cinétique de fermeture des plaies, des études histologiques d'inflammation, de nécrose et de réépithélialisation, et enfin des études physiologiques de perfusion sanguine cutanée. L'expression de 84 gènes impliqués dans le processus de cicatrisation a été étudiée sur le tissu cicatriciel 14 jours après formation de la plaie. A titre d'essais exploratoires, j'avais lors de mon stage de Master II, testé l'efficacité de NP de PLA-FGF2 sur la cicatrisation d'une plaie d'excision cutanée, sur le modèle de souris C57BL/6. Ces pré-essais avaient montré un (faible) effet positif des NP fonctionnalisées, mais

Conclusion et perspectives

aussi des NP de PLA nues, ce qui était somme toute encourageant d'utiliser un potentiel « pansement biologique » aux propriétés cicatrisantes intrinsèques.

Pour conclure, nos résultats mettent en évidence l'intérêt et l'efficacité des NP de PLA utilisées comme vecteurs de molécules thérapeutiques, dans le cadre du développement de stratégies de délivrance ciblée de VE et FGF2 dans les plaies cutanées profondes. Les modèles expérimentaux *in vivo* développés et caractérisés, ouvrent la voie aux études précliniques d'efficacité des NP de PLA fonctionnalisées dans le processus de cicatrisation des plaies profondes. Il s'agit de tester l'effet des NP de PLA-VE et des NP de PLA-FGF2, en application topique, seules ou en association, sur la cicatrisation et la reconstruction dermique des plaies cutanées profondes selon la méthodologie décrite dans cette thèse. Le modèle de souris SKH1 diabétique, avec retard de cicatrisation, développé ici sera à cet égard très utile. Comme décrit plus haut, ces études reposeront sur (i) des observations macroscopiques utilisant des techniques d'imagerie permettant d'analyser finement la cinétique de fermeture des plaies, (ii) des observations histologiques en microscopie optique permettant de suivre au niveau tissulaire et cellulaire l'évolution de l'inflammation et de la reconstruction dermique, (iii) des études physiologiques fondées sur la technologie laser-doppler, permettant de suivre par des méthodes non invasives la revascularisation du tissu cutané, et enfin (iv) des études de biologie moléculaire basées sur la qPCR permettant d'analyser l'induction ou l'inhibition d'expression de nombreux gènes impliqués dans le processus de cicatrisation-réparation.

Pour la suite de cette thèse, il reste à étudier le relargage du FGF2 et la stabilité des NP de PLA-FGF2 dans le temps pour finir de les caractériser. Il serait aussi intéressant de vérifier si le FGF2 adsorbé à la surface des NP de PLA est protégé des phénomènes de dégradation rencontrés dans la plaie (acidification, protéases). Dans une étude réalisée par Nguyen *et al.*, le FGF2 adsorbé à la surface de NP de carboxyméthyl-chitosane est protégé de la dégradation par une protéase comme la trypsine présente dans les plaies [136]. Si les NP de PLA ne protègent pas le FGF2 de la dégradation, l'utilisation de l'héparine pour fixer le FGF2 sur les NP de PLA est une alternative. En effet, une étude menée par Gospodarowicz et Cheng a montré que le FGF2 couplé avec l'héparine est protégé de la dégradation induite par la chaleur et l'acidification [137]. De plus, la forte capacité de l'héparine à se lier spécifiquement au FGF2 a été utilisée pour développer de nouveaux systèmes de délivrance de FGF2 par la libération contrôlée de FGF2-héparine [138] [137] [139] [140]. De nombreux nanovecteurs couplés à de l'héparine tels que des micelles de PCL, NP de PLGA ou de gélatine ont été utilisés pour libérer

Conclusion et perspectives

progressivement du FGF2 [141] [142] [143] [144] [145] [146]. Le couplage de l'héparine au NP de PLA pourrait peut-être répondre à cette exigence dans le cas où les NP de PLA-FGF2 libèreraient trop rapidement le FGF2.

Les modèles expérimentaux *in vivo* développés et caractérisés, ouvrent la voie aux études précliniques d'efficacité des NP-PLA fonctionnalisées dans le processus de cicatrisation des plaies profondes. Un objectif sur le court terme sera de tester des NP de PLA vectorisant les deux molécules, VE encapsulée + FGF2 adsorbé en surface pour démontrer un potentiel effet synergique des trois composants des NP (VE, FGF2 et PLA) sur la cicatrisation des plaies. Cette stratégie a été bénéfique dans une étude *in vivo* menée par Li *et al.* où un antioxydant (la curcumine) et un facteur de croissance (EGF) ont été co-encapsulés dans des NP de PLA-10R5-PLA intégrées dans un hydrogel (EGF-Cur-NP/H) [147]. Le traitement EGF-Cur-NP/H a montré accélérer significativement la fermeture de la plaie en augmentant la formation du tissu de granulation, le dépôt de collagènes et l'angiogenèse par rapport aux NP/H, au Cur-NP/H et EGF-NP/H traités. Néanmoins, il est nécessaire d'envisager une autre méthode d'administration car le fait que les NP soient en solution rend difficile le contrôle de leurs dépôts sur la plaie. Une des possibilités serait d'administrer les NP par injection intradermique sur les bords de la plaie. Ce mode d'administration a déjà été utilisé pour traiter des plaies d'excision chez des souris saines et diabétiques avec des NP de PLGA fonctionnalisées par de la curcumine, du VEGF ou un peptide antimicrobien LL37 [58] [62] [60]. Une alternative est de pulvériser les NP sur la plaie, comme cela a été réalisé dans l'étude de Chu *et al.*, dans laquelle des NP de PLGA vectorisant de l'EGF ont été appliquées sur des plaies d'excision chez des rats diabétiques à l'aide d'un spray [118].

Nous avons pu constater au cours des expérimentations qu'il est difficile de maintenir l'anneau en place autour de la plaie sans que les souris ne l'arrachent, même lorsqu'il était recouvert d'un film transparent. Lorsque l'anneau fixé s'était arraché, ou ne tenait plus très bien, nous avons été contraint de le remplacer par un nouvel anneau, ce qui peut engendrer des réactions inflammatoires non désirées. Il paraît nécessaire de réadapter ce modèle pour qu'il soit utilisé de façon optimale. Nous nous sommes intéressées avec le Dr Dominique Sigaud-Roussel à mettre au point un dispositif plus « solide » que le précédent avec le cahier des charges suivant : il doit être non-invasif, étanche et conformable, permettre de visualiser facilement la progression de la cicatrisation, assurer la protection de la plaie, vis à vis de l'environnement extérieur et de l'animal lui-même. Pour cela, nous nous sommes basées sur un dispositif déjà

Conclusion et perspectives

breveté et inventé par le Dr Christophe Dardenne, le Dr Bernard Pipy et le Dr Michel Lamoise [148]. Notre prototype a été fabriqué à partir de polymère thermoplastique, l'acrylonitrile butadiène styrène, à l'aide d'une imprimante 3D (RAISE 3D, équipe PRABI Raphael Terreux, PU UCBL1) (**Figure 33**).

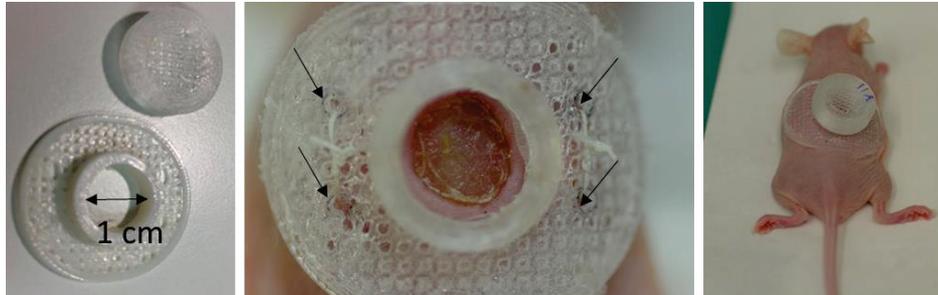


Figure 33 : (a)anneau avec maillage en acrylonitrile butadiène styrène, deux par côtés sont effectués pour laisser passer le fil de suture)préalablement thermoformée, afin d'épouser parfaitement le dos de l'animal b) dispositif fixé à l'aide de colle chirurgicale et de deux points de suture.

Il convient également de souligner que la vectorisation de principes actifs, et notamment de molécules peptidiques, par des particules pourrait favoriser leur immunogénicité, ce qui constituerait un effet secondaire non souhaité. Il s'agit d'ailleurs d'une analyse à réaliser dans les études précliniques d'évaluation de toxicité. L'immunogénicité de la VE et surtout de la FGF2 vectorisés devra être étudiée. Même si les lots de NP de PLA fonctionnalisées sont fabriqués à partir d'un polymère biodégradable, biocompatible et biorésorbable, une étude de biodistribution de ces NP dans l'organisme, après application topique sur la plaie, nous renseignerait sur le devenir des NP de PLA. Pour cela, nous pourrions envisager d'utiliser une méthode d'imagerie médicale utilisant des produits de médecine nucléaire, la scintigraphie, pour évaluer la perméation de nos NP de PLA-VE dans une plaie et voir si celles-ci passent dans la circulation sanguine. Cette technique a déjà été utilisée par Pereira *et al.* pour mettre en évidence la rétention au niveau de la zone brûlée de microparticules de chitosane vectorisant de la VE et de l'aloé vera incluent dans un gel [149]. Il est également nécessaire d'envisager la stérilisation des nanoparticules actives, soit par irradiation γ (NP de PLA-VE et NP de PLA-FGF2), soit par autoclavage des NP de PLA nues (cela a été fait au laboratoire dans le cadre d'autres études) et synthèse des NP fonctionnalisées en conditions stériles (NP de PLA-FGF2). L'infection étant un des principaux facteurs de ralentissement ou d'échec de guérison des plaies profondes, notamment les brûlures de 3^{ème} degré, il sera nécessaire d'apporter des antibiotiques (par exemple la ciprofloxacine) et/ou des antiseptiques (par exemple les ions Ag^{++}) dont

Conclusion et perspectives

l'efficacité pourra être testée sur divers modèles d'infections expérimentales de plaies décrits dans la littérature (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumonia* par exemple) ou sur des infections par des bactéries du risque biologique, telle *Bacillus anthracis*. Ces antimicrobiens pourront être encapsulés ou adsorbés sur les NP. Ils pourraient également être portés par une matrice. En effet, dans le cadre plus large du projet PaNaCée, il était prévu d'imbriquer les NP de PLA fonctionnalisées dans une matrice nanofibrillaire, par exemple de PLGA, afin de constituer un « biopansement » biorésorbable relarguant ses principes actifs au cœur de la plaie [94]. Outre qu'elle permettrait un relargage progressif et contrôlé des NP, et des molécules bioactives, au cœur de la plaie, cette matrice servirait de support facilitant la migration-prolifération des cellules responsables de la réépithélialisation. Autre qu'une matrice nanofibrillaire de PLGA, les hydrogels sont une alternative intéressante, car de par leur teneur élevée en eau ($\geq 90\%$) et leurs propriétés mécaniques leur permettant de mieux épouser les contours de la plaie ils en facilitent la réhydratation. En effet, l'association des NP fonctionnalisées avec des matrices bioactives représente une innovation majeure pour le futur des traitements des plaies cutanées comme nous l'avons mentionné dans la revue «Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment?» (Figure 34) [30].

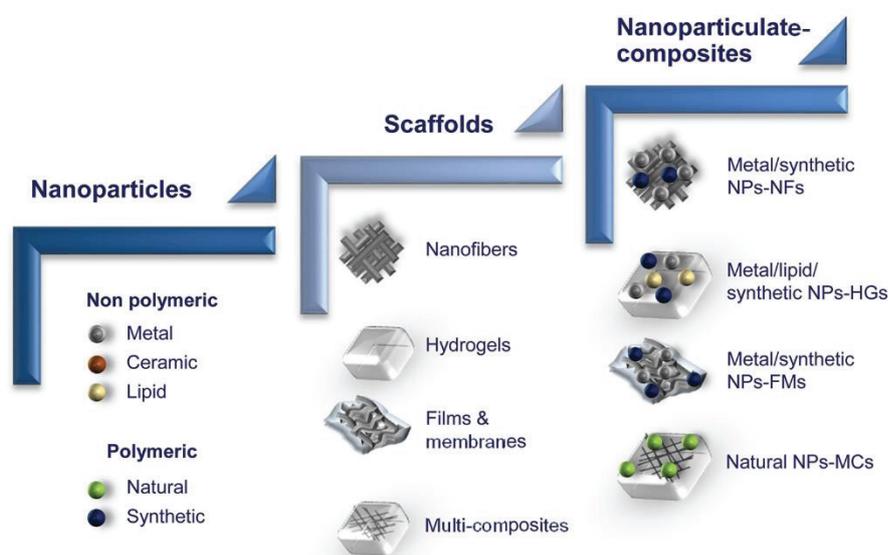


Figure 34 : Représentation schématique des nanomatériaux utilisés pour la cicatrisation des plaies ; “des nanoparticules aux composites nanoparticulaires” [30]. Abréviations : FMs, Films et membranes; HGs, Hydrogels; MCs, Multi-composites; NFs, Nanofibres; NP, Nanoparticules.

Annexes

Figures complémentaires

Revue n°2 “Poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery”

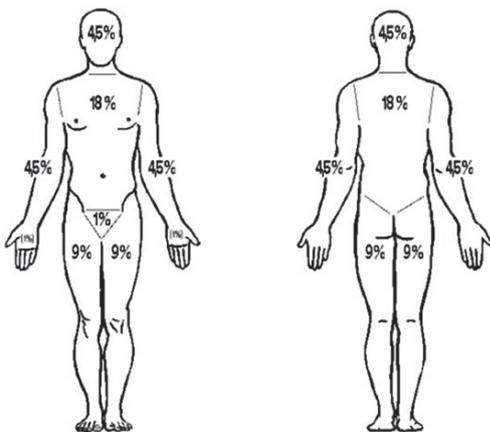
Demande d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

Annexes

Figures complémentaires

a

Règle des 9 de Wallace



b

Table de Lund et Browder

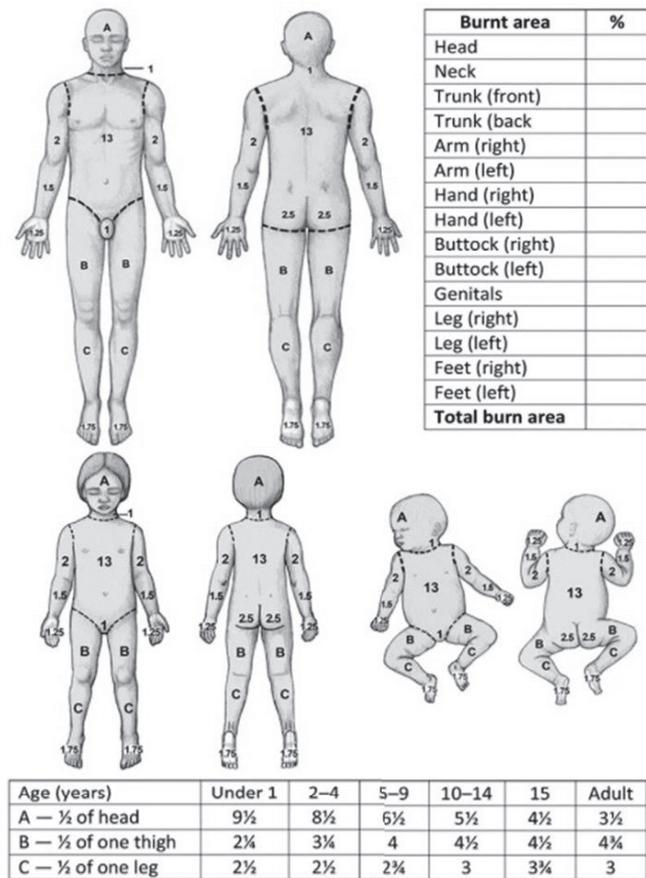


Figure 35 : (a) Evaluation de la surface corporelle brûlée : règle des 9 de Wallace (<http://sofia.medicalistes.org>), (b) Evaluation de la surface corporelle brûlée : table de Lund et Browder (www.remotephmanuals.com).

Annexes

Taux de chargement en VE (%)	0% n = 3	1,2% n = 2	2,5% n = 2	5,0% n = 2	7,0% n = 4	10,0% n = 4
Diamètre (nm)	192,6 ± 11,4	206,6 ± 0,0	218,2 ± 4,4	223,2 ± 8,8	215,4 ± 5,3	215,4 ± 15,0
Indice de polydispersité	0,040 ± 0,030	0,05 ± 0,011	0,038 ± 0,008	0,069 ± 0,020	0,084 ± 0,021	0,123 ± 0,016
Potentiel zêta (mV)	-57,6 ± 3,0	-60,4 ± 10,7	-53,2 ± 4,1	-60,3 ± 2,5	-62,7 ± 1,3	-61,4 ± 10,9
Rendement d'encapsulation en VE (%)	-	82,3 ± 7,2	90,5 ± 8,9	87,2 ± 6,4	85,8 ± 4,1	93,0 ± 6,9

Tableau 8 : Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-VE à différents taux de chargement en VE (1,2%, 5,0%, 2,5%, 5,0%, 7,0% et 10,0%) et des NP de PLA nues. Le diamètre (nm), l'indice de polydispersité et le potentiel zêta (mV) sont obtenus par DLS. Le rendement d'encapsulation de VE dans les NP de PLA (%) est déterminé par HPLC. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne ± SD.

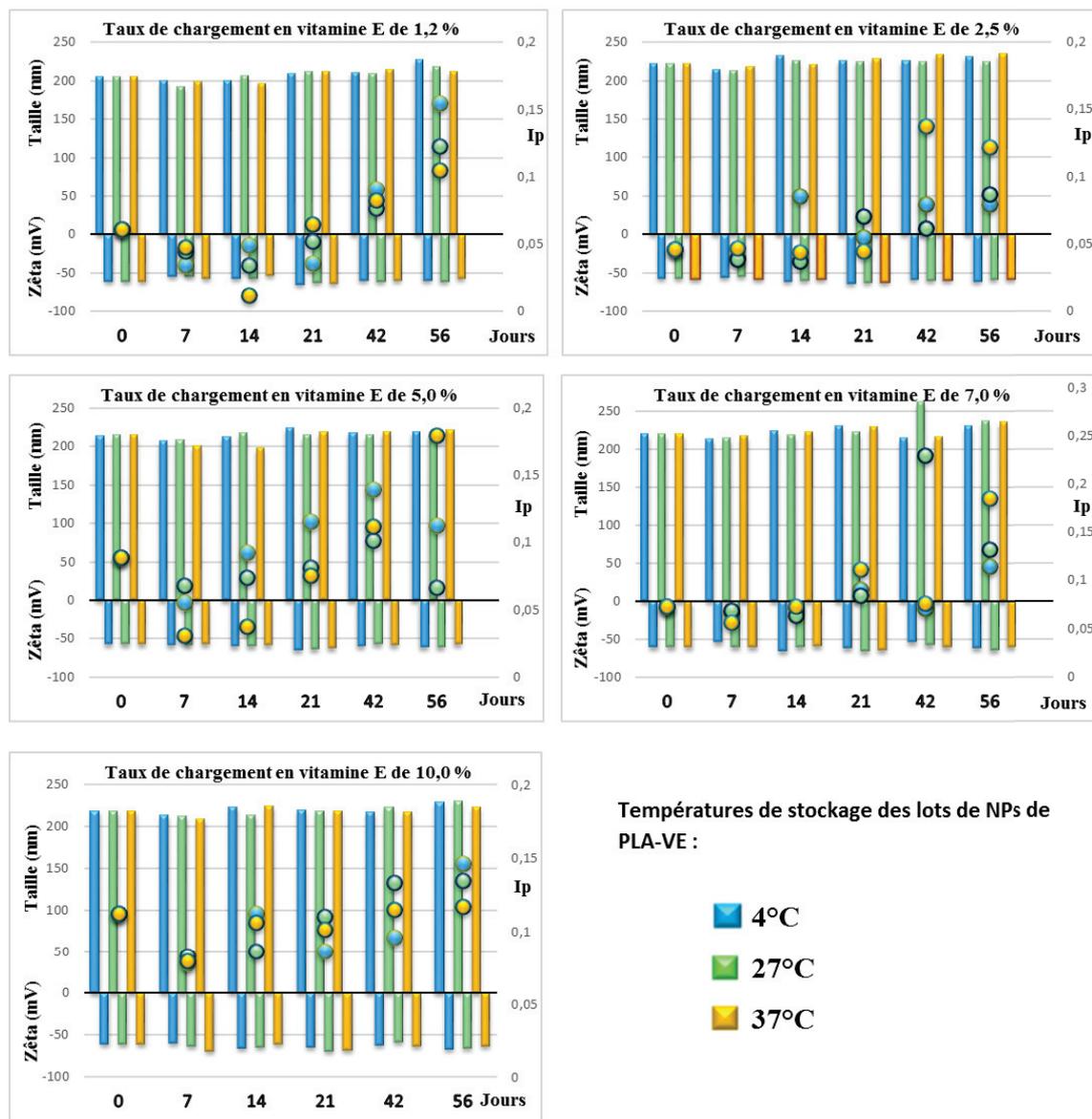


Figure 36 : Caractérisation physico-chimique des NP de PLA-VE aux différents taux de chargement en vitamine E (10,0%, 7,0%, 5,0%, 2,5% et 1,2%) à trois températures (4°C (bleu), 27°C (vert) et 37°C (orange)) sur 56 jours. Evaluation dans le temps du diamètre (nm), de l'indice de polydispersité (Ip) et du potentiel zéta (mV).

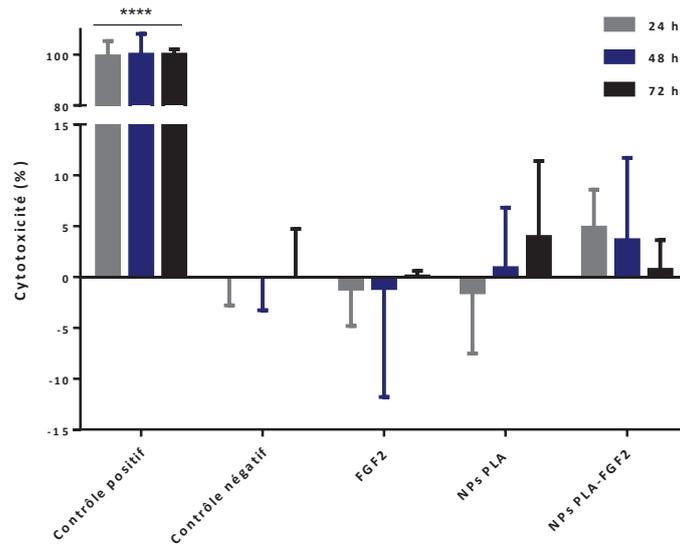


Figure 37 : Effet cytotoxique du FGF2 (100 ng/mL), des NP de PLA nues (15 µg/mL) et des NP de PLA-FGF2 (100 ng/mL en FGF2) sur des fibroblastes NIH3T3. Les résultats sont exprimés comme le pourcentage de cytotoxicité. Les résultats sont représentés comme étant la moyenne ± la SD (N=3, n=3-5). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. Les différences significatives sont représentées par rapport au condition NT, **** diffère très significativement ($P \leq 0.0001$).

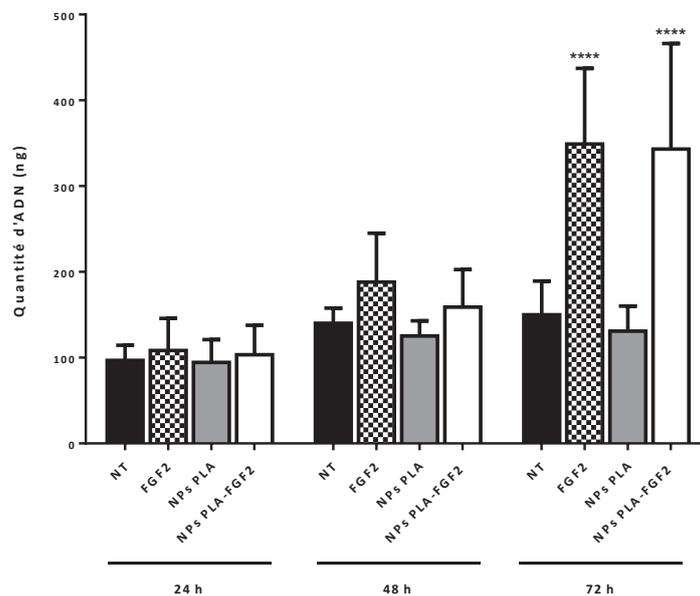


Figure 38 : Effet du FGF2 (100 ng/mL), des NP de PLA nues (15 µg/mL) et des NP de PLA-FGF2 (100 ng/mL en FGF2) sur la prolifération des fibroblastes NHDF. Les résultats sont exprimés en fonction de la quantité d'ADN (ng) contenue dans les cellules. Les résultats sont représentés comme étant la moyenne ± la SD (N=3, NT, NP de PLA, FGF2 n=14, NP de PLA-FGF2 n=5). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. Les différences significatives sont représentées par rapport au condition NT, **** diffère significativement ($P \leq 0.0001$).

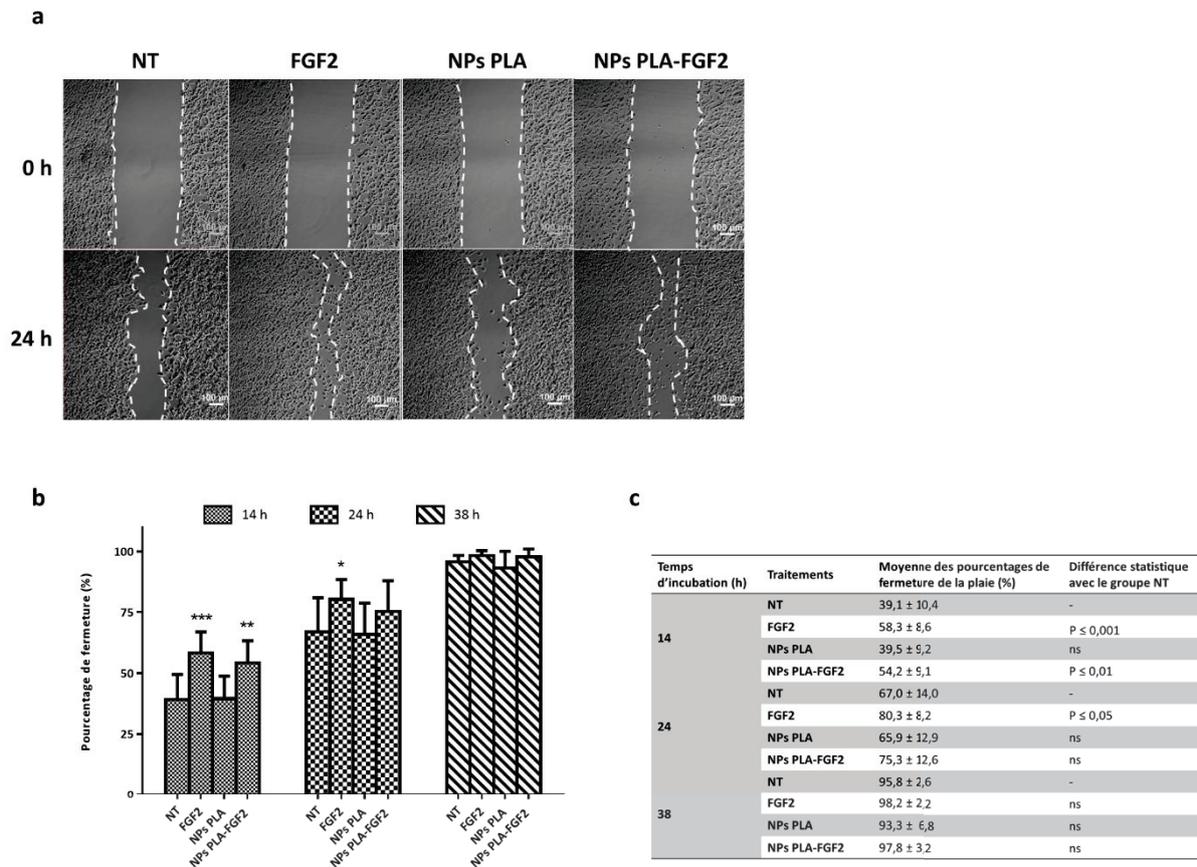


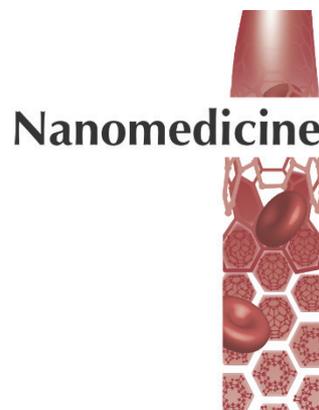
Figure 39 : Effet du FGF2, des NP de PLA nues et des NP de PLA-FGF2 sur la migration et la prolifération des fibroblastes NIH3T3. (a) observations microscopiques à 0 h et après 24 h de traitements, (b) et (c) Les résultats sont exprimés comme le pourcentage de fermeture par rapport à la surface de la plaie initiale. Les résultats sont représentés comme étant la moyenne ± la SD (N=4, n=3, cellules non traitées NT, FGF2 et NP de PLA-FGF2, NP de PLA). Des analyses statistiques sont effectuées en utilisant un two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc multiparamétrique Bonferroni. Les différences significatives sont représentées par rapport au condition NT. Les valeurs obtenues en condition non traitée (NT) sont comparées aux autres conditions. *** diffère significativement ($P \leq 0.001$), ** diffère significativement ($P \leq 0.01$), * diffère significativement ($P \leq 0.05$).

Revue n°2 “Poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery”

SPECIAL FOCUS I Nanotechnology for vaccine development

Review

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com



Poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery

The development of safe and effective vaccines for cancer and infectious diseases remains a major goal in public health. Over the last two decades, controlled release of vaccine antigens and immunostimulant molecules has been achieved using nanometer or micron-sized delivery vehicles synthesized using biodegradable polymers. In addition to achieving a depot effect, enhanced vaccine efficacy using such delivery vehicles has been attributed to efficient targeting of antigen presenting cells such as dendritic cells. Biodegradable and biocompatible poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) polymers belong to one such family of polymers that have been a popular choice of material used in the design of these delivery vehicles. This review summarizes research findings from ourselves and others highlighting the promise of poly(lactic acid)- and poly(lactic-co-glycolic acid)-based vaccine carriers in enhancing immune responses.

Keywords: adjuvants • biodegradable • controlled release • immune response • particles • PLA • PLGA • vaccine delivery

Over the last two decades, nanoparticle (NP) and microparticle (MP) based delivery systems have received much attention for applications in the fields of biology and medicine and appear to show promise as vaccine vehicles. Particulate materials, including aluminum salts (referred to as ‘alum’), calcium phosphate, emulsions and biodegradable polymeric particles, are the most widely used and studied vehicle adjuvants [1].

Despite the fact that aluminum compounds have been used with a large number of antigens and are capable of increasing humoral responses to high titer in most cases, these adjuvants have shown limitations in the development of vaccines for viral infections, cancer or other intracellular infections where CD8⁺ T-cell responses are critical. The adjuvant activity of alum is generally thought to be improved when antigens are adsorbed to the aluminum particles, although this is not the case for all antigens [2,3]. Limitations of alum as adjuvant include lack of effectiveness for some antigens, requirement for booster

doses, incapacity to elicit mucosal IgA antibodies (Abs) and local hypersensitivity reaction in some subjects [4]. This has led to the development of new research in the design of innovative adjuvants to improve existing vaccines and to support the newer and often less immunogenic antigens under development.

Biodegradable polymer particles, most commonly micro- or nano-particles, carrying peptide or protein antigens, have been studied for more than 20 years since the ability to control the release of antigens over time was recognized, potentially allowing the elimination of booster doses [5].

As antigen delivery systems, particles have demonstrated enormous potential for the development of improved vaccines. Their benefits are manifold, including the sustained delivery of antigens for extended periods of time, the potential to reduce the number of booster injections and passive or active targeting of antigen-presenting cells (APCs) through nonspecific or receptor-mediated phagocytosis, respectively.

Vincent Pavot¹, Morgane Berthet², Julien Rességuier², Sophie Legaz², Nadège Handké², Sarah C Gilbert¹, Stéphane Paul³ & Bernard Verrier^{*2}

¹The Jenner Institute, University of Oxford, Oxford, UK

²Institut de Biologie & Chimie des Protéines - LBTI, UMR 5305 – CNRS/University of Lyon, Lyon, France

³Groupe Immunité des Muqueuses & Agents Pathogènes – INSERM CIE3 Vaccinologie, Faculté de Médecine de Saint-Etienne, France

*Author for correspondence:

Tel.: +33 0 4 72 72 26 36

Fax: +33 0 4 72 72 26 04

bernard.verrier@ibcp.fr

Future
Medicine part of 

A variety of polymers exists from which NPs and MPs for drug delivery can be prepared. However, the most commonly studied polymers are poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and poly(lactic acid) (PLA) [6]. These biodegradable and biocompatible polymers have been licensed for human use (e.g., as sutures, bone implants and screws as well as implants for sustained drug delivery) and are approved by US FDA [7,8].

Furthermore, PLA and PLGA polymers have been extensively studied for their use in the formulation of vaccine antigens (proteins, peptides, DNA) [8–11] and there is a large body of literature demonstrating the advantages of such particles for antigen delivery [8,12–13]. These particles can be tailored to degrade over a range of rates and can act as a depot from which the loaded antigen/ligand is gradually released [14]. Additionally, these particles allow the encapsulation of hydrophobic molecules and may protect encapsulated antigens [11,15] and preclinical studies have shown that PLA NPs can induce systemic Ab titers comparable to those of aluminum salts or MF59® (Novartis, Basel, Switzerland), a more recently licensed adjuvant [10,16–17]. The objective of this review is to provide an overview of the use of PLA/PLGA particles in vaccination.

Desired immune responses to vaccines

Vaccines provoke immunity by imitating an infection (e.g., attenuated or viral vector-based vaccines) or by simply inducing antigen-specific immune responses (e.g., subunit vaccines). Vaccination does not cause illness, but results in the production of T-lymphocytes and Abs. Long-term immunity is conferred by the maintenance of antigen-specific immune effectors and/or by the induction of immune memory cells that may be sufficiently efficient and rapidly reactivated into immune effectors in case of subsequent pathogen exposure.

The majority of vaccines result in the production of Abs, produced by plasma cells and capable of binding specifically to a toxin or a pathogen. This is referred to as 'humoral immunity' [18]. Whereas specific Abs are able to neutralize extracellular pathogens, specific cellular immune responses are important for the control of intracellular pathogens after infection, or for the control of cancer. Therefore, induction by vaccination of cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes (CTL) that may limit the spread of infectious agents by recognizing and killing infected cells or tumor cells, or secreting specific antiviral cytokines is of interest. The generation and maintenance of both B and CD8⁺ T-cell responses are supported by growth factors and signals provided by CD4⁺ T helper (Th) lymphocytes, which are commonly subdivided into T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) subtypes (Figure 1).

Preparation of PLA/PLGA particles

The encapsulation of compounds including protein and peptide vaccine antigens into PLA/PLGA particles is a very attractive strategy. The choice of the method to prepare PLA/PLGA particles will mainly depend on the choice of the vaccine immunogen, its physico-chemical properties and the desired association with the particles. Drugs can be entrapped into the core of a 'micro/nanocapsule', into the core of a polymeric matrix of a 'micro/nanosphere', or adsorbed onto the surface of particles (Figure 2).

Hydrophobic drugs, such as some immunostimulating molecules or even peptides, are usually entrapped into particles to prevent their rapid degradation and elimination. The choice of protocol for the preparation of these particles depends predominantly on the solubility of the drug in a water-miscible, or in a nonwater-miscible solvent, volatile or not.

If the drug is soluble in a water-miscible solvent (e.g., acetone, acetonitrile and tetrahydrofuran) along with PLA and PLGA, nanoprecipitation, also known as 'solvent displacement,' diafiltration or salting-out, can be applied.

The nanoprecipitation of PLA/PLGA was developed and patented by Fessi *et al.* [19]. This method permits the preparation of monodisperse particles, by controlling the precipitation of the hydrophobic polymers into an aqueous phase. Briefly, it requires the use of two miscible phases: an organic phase in which the polymer is dissolved and an aqueous phase where the polymer is not soluble. The organic phase is injected under moderate flow into the aqueous phase and the particles are immediately formed under the influence of the solvent displacement into the aqueous phase. Preferably, the solvent chosen is volatile, to facilitate removal by evaporation under reduced pressure, but alternatively solvents can also be removed by dialysis. This one-step manufacturing process has the major advantage of being instantaneous, allowing the reproducible formation of nanometric, monodisperse particles exhibiting a high hydrophobic drug loading capacity. Additionally, this method has the advantage that no surfactant need be added. The size and size distribution of the particles can be easily adjusted by changing the preparation conditions, such as initial polymer concentration, ratio of water to organic solvent, polymer molecular weight or solvent evaporation rate. The organic solvent can also be changed to modulate the size of particles, by changing its diffusion rate in water [20].

If the drug is not soluble in a volatile, water-miscible solvent, the diafiltration method can be used to prepare particles by dialysis of the organic phase dissolving PLA/PLGA. Although this is less easily controlled than the nanoprecipitation method, the par-

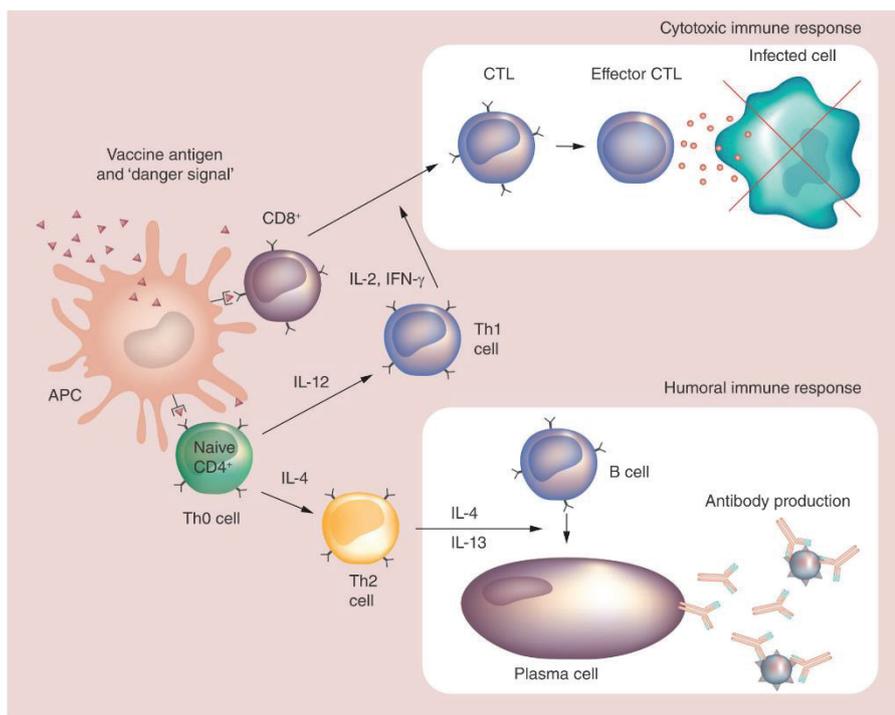


Figure 1. Desired immune responses elicited by prophylactic vaccines. Vaccines against extra- or intra-cellular pathogens must target antigens and danger signals to immature DCs at the administration site and/or into the draining lymph nodes. DCs then present antigen through MHC class I or II complexes to CD8⁺ or CD4⁺ T cells, respectively. Danger signals stimulate DCs, which consequently express costimulatory molecules and secrete cytokines leading to T-cell stimulation and Th1 or Th2 orientation. Activated Th2 cells, produce B cell-stimulating cytokines that support differentiation of antigen-primed B cells. This facilitates/induces B-cell differentiation into memory B cells and plasma cells that produce large amounts of antibodies that prevent future virus infection. CD8⁺ lymphocytes acquire a cytotoxic phenotype, known as CTL, which is able to cause infected cell lysis directly. APC: Antigen-presenting cell; CTL: Cytotoxic CD8⁺ T lymphocyte; DC: Dendritic cell.

ticle sizes can be better controlled when the solution is precipitated prior to use.

The salting-out process was developed by Ibrahim [21]. Briefly, an emulsion of an organic phase in an aqueous phase containing a stabilizer and a highly concentrated electrolyte (salt, sucrose), in which the organic solvent is not soluble, is prepared with vigorous stirring. Pure water is then added to allow the solvent to diffuse into the aqueous phase leading to the formation of particles. This method allows for better control of the particle size, by controlling the stabilizer concentration, the stirring rate and the polymer concentration [22,23]. However, an additional purification step is necessary to remove the electrolyte used for the saturation of the aqueous phase. The other components (active molecule and active surfactant) must also

be compatible with the electrolyte, which must also be nontoxic.

When the antigen or the active molecule is preferentially soluble in a nonwater-miscible solvent like dichloromethane (DCM), single emulsion solvent evaporation can be performed. The single emulsification process involves an oil-in-water (o/w) emulsion. The first step consists in dissolving the polymer in a nonwater miscible organic phase (e.g., DCM). This polymer solution is then dispersed into an aqueous phase commonly containing a surfactant (e.g., polyvinyl alcohol and Poloxamer), in order to create an o/w emulsion with larger droplets. The emulsion is then treated by homogenizers or ultrasound in order to obtain smaller droplets. To replace the chlorinated solvent commonly used for the single emulsion sol-

vent evaporation methods, emulsion-solvent diffusion using a partially water-miscible solvent less toxic than dichloromethane, such as ethyl acetate, can be used instead. The main drawback of these two methods is the required use of surfactant to stabilize emulsions, often leading to the requirement to remove their excess for further *in vitro* or *in vivo* trials.

As peptide or nucleic acid antigens are generally highly water soluble, the former methods often lead to poor yield as the drug becomes deposited on the particle surface and in the polymer matrix during the process, and rapidly diffuses into the aqueous phase.

Therefore the encapsulation of such compounds becomes quite challenging. Indeed, their successful encapsulation, as for hydrophobic drug encapsulation, requires high drug loading in the NPs/MPs, predictable release of the drug compound from the particle but most of all requires the prevention of protein degradation during the encapsulation process. Currently, the most common technique used for the encapsula-

tion of water-soluble vaccine antigens in PLA/PLGA particles is the double emulsification solvent evaporation [24,25]. An aqueous phase containing the drug is added to an organic phase composed of PLGA or PLA in DCM with vigorous stirring to create the water-in-oil emulsion. The w/o/w emulsion is created by adding the previous w/o emulsion into a large volume of water with an emulsifier to stabilize the emulsified polyvinyl alcohol and create the w/o/w emulsion. The particles are obtained after the solvent has been removed by evaporation. As for o/w emulsion method, the disadvantage of w/o/w emulsion processes is the presence of emulsifiers which if not removed, lead to toxicity. Furthermore, this strategy requires high energy to create the emulsions, which can lead to the denaturation of the protein antigen, the use of surfactants and the poor drug loading into particles.

One of the disadvantages of all of these encapsulation techniques is the poor encapsulation efficiencies of drugs and the initial rapid release of drug (burst effect)

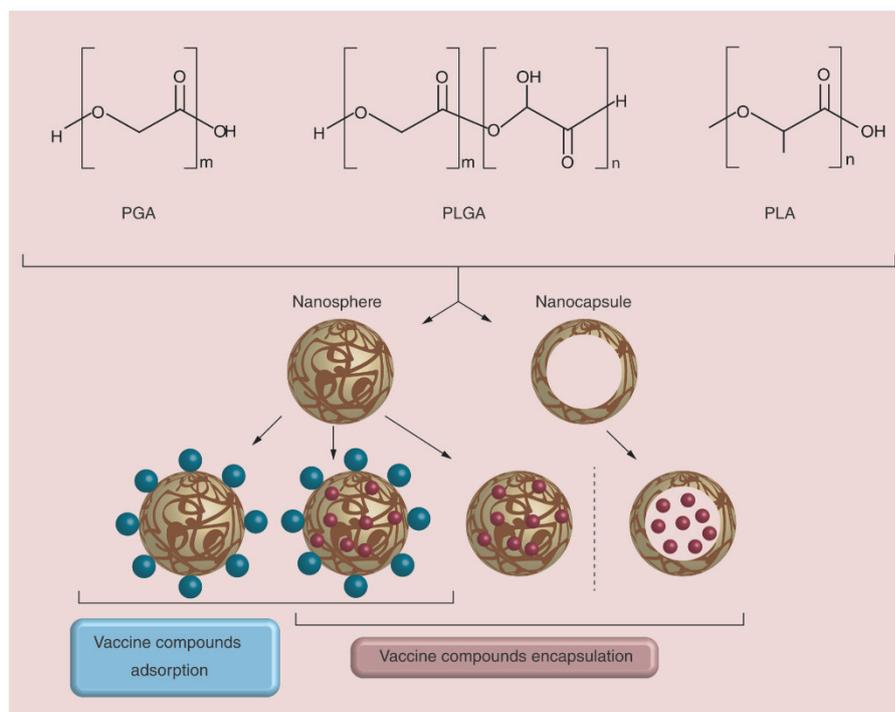


Figure 2. Illustrative representation of the architecture of different nanostructured poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) particles. These include nanospheres, in which the molecule is dissolved, adsorbed or dispersed throughout the matrix, attached to the surface or attached to the polymer matrix; nanocapsules, in which the molecule is in solution and surrounded by a shell-like wall.

PGA: Poly(glycolic acid); PLA: Poly(lactic acid); PLGA: Poly(lactic-co-glycolic acid).

due to the diffusion of the drug present at the interface of particles after dilution into media.

An alternative strategy for the efficient presentation of protein on particles is adsorption onto the surface of 'empty particles.' With this strategy, all the methods previously described to encapsulate hydrophobic drugs can be used to prepare the particles of the desired size and with the appropriate surface charge for the adsorption of protein antigen.

Many studies have also been conducted to obtain particle formulation that could be sterile filtered, lyophilized and resuspended to the initial size with excipients appropriate for use as a vaccine formulation [26,27].

In brief, molecules of interest (e.g., vaccine antigens and immunostimulant molecules) can be incorporated into the particles during the particle production (encapsulation) or adsorbed/chemically bound after their production. These methods are dependent on the hydrophobic/hydrophilic nature of the active drug (Ag or ligand). In the event of a hydrophobic Ag, it will be encapsulated within the polymer matrix during the formation of particles following methods precipitation/evaporation of solvent, emulsion (o/w). In the event of a hydrophilic Ag, the double emulsion (w/o/w) is used to encapsulate in the core of particles. Finally, the adsorption of hydrophilic Ag (or ligands) on the particles surface is one possible approach.

PLA/PLGA particles as vaccine antigen carrier systems

Most licensed vaccines rely on multiple dose immunization schedules which can be difficult and costly to achieve. In such a scenario, biodegradable polymer particle based vaccine delivery systems provide a viable alternative to single-dose vaccines [28]. In particular, PLA and PLGA polymers have been used successfully in preclinical studies as vaccine delivery systems for many years and are particularly well-suited to vaccine design because of their known adjuvant activity [6,29,30].

Already used in many medical devices (drug delivery implants, suture material and microspheres) [31,32], these biodegradable polymers are probably the most studied materials for parenteral and mucosal antigen delivery. The initial motivation for using PLA/PLGA particles for antigen delivery came from the desire to reduce the number of repeated administrations required for long-term protection, through prolonged antigen release [33]. Another important advantage would be the reduction in mass vaccination costs.

As PLA/PLGA particles are efficiently phagocytosed by APCs *in vitro* and *in vivo* [17,34,35] they have been studied mainly for the delivery of antigens to DCs and macrophages aiming at inducing CTL responses.

Despite the encouraging immunological performances of PLA/PLGA-based MPs and NPs, the harsh conditions such as organic solvent/water interfaces, shear or cavitation forces, excessive heat, freezing and drying involved in the encapsulation methods often causes significant aggregation or degradation of vaccine antigens [30,36–38]. Moreover, the degradation of the polymers generates acidic monomers and acidification of the inner polymer environment can cause protein degradation and consequent loss of tertiary structure, which is a central issue in the development of these devices for drug delivery [36,39,40]. These problems have been partially solved by optimized manufacturing methods [41,42] or addition of stabilizing agents such as Mg(OH)₂, other proteins, surfactants or sugars [43–46].

To address the limitations of antigen encapsulation, another strategy based on surface adsorption of antigens on PLA/PLGA particles was developed to avoid exposure of the proteins to organic solvents and shear forces during the emulsification step [47,48]. Mechanistic studies determined that protein adsorption on PLA/PLGA surface is driven by electrostatic and hydrophobic interactions [48,49]. Therefore, adsorption of the proteins can be optimized by modulating ionic strength and pH. However, surface adsorption of antigen does not allow controlled release of antigen for single immunization vaccines; PLA/PLGA particles are instead used as an adjuvant for particulate delivery of antigen to the immune cells similar to alum, but the ease of encapsulating or adsorbing single or multiple antigens or ligands in PLA/PLGA particles (compared with alum) explains the renewed interest in vaccine approaches using these particulate systems [40].

In the last 10 years, micro and nanoparticles have been used mainly to carry vaccine antigens for parenteral administration (subcutaneous, intradermal and intramuscular). Major efforts are being made to develop new mucosal candidate vaccines by selecting appropriate antigen delivery systems with high immunogenicity, designing new mucosal routes of administration and selecting immune-stimulatory adjuvant molecules. The versatility for delivery of PLA/PLGA NPs has led to their study as potential vaccine delivery systems for mucosal administration [11,50]. Indeed, it has been shown that these particles were able to carry antigens to microfold cells (M cells) at the surface of Peyer's patches into the intestinal mucosa, leading to their uptake and delivery to mucosal APCs making them efficient antigen carrier systems for mucosal immunization [35].

Immune responses to PLA/PLGA carried antigens

Many different antigens encapsulated or adsorbed on PLA/PLGA particles have been shown to induce broad

and potent humoral immune responses (Table 1). The majority of published pre-clinical studies are on tetanus toxoid (TT) or focused on more model antigens such as ovalbumin (OVA) and bovine serum albumin (BSA). Other antigens of interest were of bacterial origin: *Escherichia coli* detached fimbriae, pertussis toxoid, diphtheria toxoid (DT), subunit antigens from *Haemophilus influenzae* type B, *Yersinia pestis* and *Mycobacterium tuberculosis*; viral origin: subunit antigens from human and simian immunodeficiency virus (HIV, SIV), hepatitis B virus surface antigen (HBsAg), influenza A virus, measles virus, parainfluenza virus, respiratory syncytial virus; and parasitological origin: subunit antigens from *Plasmodium* species (malaria) and *Leishmania*.

TT represents one of the most frequently used microencapsulated antigen for parenteral or mucosal immunization and in most preclinical studies, a single injection of TT-loaded particles induced high Ab titers maintained over several months, generally up to 1 year or more [51,52,56,57]. Encapsulated toxoid induced low but continuous levels of neutralizing Abs (NABs), whereas those obtained with the control alum-TT decreased after reaching the maximum level at 14 weeks. Moreover, the administration of a mixture of encapsulated and adsorbed TT led to significantly higher and more prolonged NAb levels than those measured for the adsorbed toxoid. Analysis of the Ab isotypes revealed dominance of IgG1 (pro-Th2) over IgG2a (pro-Th1); this pattern was consistent with that observed in the group injected with alum-TT.

A study performed by Saini *et al.* aimed to compare the humoral and cell-mediated immune responses between recombinant HBsAg adsorbed PLA MPs vaccine (single shot) and alum-HBsAg vaccine (two doses) [54]. Specific humoral immune responses (IgM and IgG) and cell-mediated immune responses were determined. Based on these findings, it was concluded that a single injection (using the subcutaneous route – sc.) of the polymeric MPs produced a better immune response (both humoral and cell mediated) than two injections of a conventional alum-HBsAg vaccine, in the mouse model. These data demonstrate the high potential of polymeric MPs for their use as a carrier adjuvant for hepatitis B vaccine.

The rabbit model was used in a quantitative and qualitative comparison of the Ab responses induced by PLA NPs or by the emulsion adjuvant MF59 using three HIV-1 antigens: p24gag, wild-type (WT) Tat and a mutated, detoxified form of Tat [10]. All antigen and adjuvants led to the induction of similar level of IgG titers in sera when injected by subcutaneous route. The p24 antigen, but not Tat, also induced fecal IgG in rabbits when formulated with PLA particles or MF59. The nature of the adjuvant had consequences on the

spectrum of specificity induced, depending on the antigen: PLA adjuvant focused the anti-p24 response to an immunodominant domain when compared with MF59. With WT Tat, no difference between adjuvants was observed in the spectrum of specificity induced. However, detoxified Tat coated on PLA NPs increased the number of epitopes recognized by serum IgG compared with MF59. The impact of these qualitative differences depending on the antigen/adjuvant associations is important to take into account for further designs of vaccine formulation using particulate adjuvants.

In summary, for the antigens studied, strong Ab responses were observed after a single administration. Responses were frequently comparable to that elicited by gold-standard formulations, such as antigen in alum, MF59 or Freund's adjuvant, given once or twice [10,17,58–60]. Thus, the particle preparations proved to be highly suitable for a large variety of antigens, derived from various sources and having very different structural features. Besides inducing strong and functional humoral immune responses, PLA/PLGA particles are of particular interest in releasing antigens over extended periods of time and thereby providing prolonged stimulation of the immune system.

Whereas specific Abs appear necessary to block pathogen invasion, specific cellular immune responses are important for the control of virus replication and viral load after infection, and also for therapeutic cancer vaccines. Particulate vaccines are recognized as extracellular antigens and are taken up by APCs by one of the endocytic mechanisms – receptor-dependent or receptor-independent endocytosis – and placed into a membrane-delimited compartment of the endocytic pathway [61]. This compartment undergoes a series of modifications and finally fuses with lysosomes or MHC class II compartments leading to peptide presentation to antigen-specific CD4⁺ T cells but no CD8⁺ T cells. Hence, it appears that particulate formulations alone are poor inducers of CTL responses. To improve immune responses, the use of additional stimuli, such as pattern recognition receptors (PRRs) ligands, appears to be crucial; in particular to induce cross-presentation of extracellular Ags to CD8⁺ T cells [62].

Potentiating the immune response with PLA/PLGA particles carrying pattern recognition receptor ligands

Most successful vaccines induce persistent Ab responses that can last a lifetime. The mechanisms involved remain unclear, but emerging evidence indicates that they activate immune cells (especially DCs) via PRRs including Toll-like receptors (TLRs),

Table 1. Examples of studies demonstrating that carrying of antigens by poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) particles potentiate specific immune responses *in vivo*.

Nanocarrier	Antigen	Model/ immunization route	Immune response	Ref.
PLA or PLGA micro- or nanoparticles	Encapsulated TT	Wistar rats/im.	– Particles encapsulating TT elicited higher anti-TT Ab titers than TT alone – Titers persisted for more than 5 months	[51]
PLGA NPs	Encapsulated TT and QS	Rabbits/in.	– The serum IgG titer induced with PLGA(TT) was higher than TT solution – IgG titers induced with PLGA(TT + QS) was higher than PLGA(TT)	[52]
PLA or PLGA MPs	Encapsulated DT	Guinea pig/sc.	– PLGA(DT) made with the relatively hydrophilic PLGA 50:50 exhibited specific and sustained Ab responses over 40 weeks, comparable with the responses to alum(DT)	[53]
PLA MPs	Adsorbed HBsAg	Mouse/sc.	– A single injection of the PLA-HBsAg produced better immune response (both humoral and cellular) than two injections of a conventional alum-HBsAg vaccine	[54]
PLA or PLGA NPs	Adsorbed HBsAg	Rat/pulmonary delivery	– Hydrophobic particles >500 nm elicited a more robust increase in secretory IgA, IL-2 and IFN- γ levels compared with hydrophilic particles <500 nm	[55]
PLA NPs	Adsorbed HIV-1 antigens: p24gag, WT Tat and a mutated, detoxified form of Tat	Rabbit/sc.	– PLA NPs and MF59 [®] (Novartis, Basel, Switzerland) adjuvant led to the induction of similar level of IgG titers – PLA adjuvant focused the anti-p24 response to an immunodominant domain when compared with MF59	[10] [10]
PLA NPs	Adsorbed HIV-1 p24	Mouse/sc.	– After boosting PLA-p24 induced significantly higher IgG titers compared with the gold standard alum-p24	[17]
PLA NPs	Adsorbed HIV-1 p24	Macaque, rabbit, mouse/sc.	– PLA-p24 induced high Ab titers (>10 ⁶) in mice, rabbits and macaques – PLA-p24 elicited strong CTL responses and a Th1-biased cytokine release in mice – p24 protein generates a more Th1-oriented response when coated onto PLA NPs than adjuvanted with Freund's adjuvant – The ability of PLA-p24 particles to induce Th1 responses was confirmed in the macaque model	[16]

Ab: Antibody; Alum: Aluminium salts; CTL: Cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes; DT: Diphtheria toxoid; HBsAg: Hepatitis B virus surface antigen; im.: Intramuscular; in.: intranasal; MP: Microparticle; NP: Nanoparticle; PLA: Poly(lactic acid); PLGA: Poly(lactic-co-glycolic acid); QS: Quilajia saponins; sc.: subcutaneous; TT: Tetanus toxoid; WT: Wild-type.

NOD-like receptors (NLRs), C-type lectin receptors (CLRs) and RIG-I-like receptors (RLRs) [63,64]. Triggering specific combinations of PRRs in DCs can induce synergistic production of cytokines, which can result in enhanced T-cell responses (Th1, Th2 and Th17) [65–67] and/or reversal of the immunosuppressive action of regulatory T cells (T_{reg}) [68–70]. The inclu-

sion of such adjuvants within vaccines can enhance vaccine-induced protection by providing strong and long-term immune responses, broadening protection or providing cross-protection against related pathogens, improving immune responses in poorly responsive populations and potentially reducing the amount of antigen required. Reducing the dose enables an

increase in the manufacturing capacity and offers a potential for greater distribution of the given vaccine. This section describes the potential of targeting PRRs by PLA/PLGA particulate vectors to promote immune responses and outlines the progress being made toward the development of PRR-based adjuvants for use in clinical-grade vaccines (Figure 3).

A number of studies addressing this question have been performed *in vitro* and *in vivo*. As an example, Heit *et al.* determined *in vitro* that full maturation and cytokine secretion by APCs as well as cross-presentation of antigen were enhanced when coencapsulation into PLGA particles of antigen with TLR7 and 9 ligands was used [71]. Wischke *et al.*, as well as our group, recently showed that PLGA microencapsulated (~5 µm) or PLA nanoencapsulated (~200 nm) NOD ligands (respectively) induce an *in vitro* maturation of human monocyte-derived DCs to a proinflammatory phenotype with high levels of released cytokines compared with the soluble ligands [17,72].

Moreover, *in vivo* studies have been performed in different animal models in order to improve humoral and/or cellular immune responses (Table 2). In a study from Demento *et al.* [73], PLGA NPs loaded with recombinant West Nile virus envelope protein and surface modified with CpG ODN (TLR9 ligand) were used to immunize mice subcutaneously. The animals showed robust humoral responses polarized toward Th1 immune responses compared with predominately Th2-biased responses with the alum adjuvant. Immunizations with PLGA-CpG ODN resulted in a greater number of circulating effector T cells and greater activity of antigen-specific lymphocytes than unmodified NPs or alum. Last, compared with alum, this system offered superior protection in a mouse model of West Nile virus encephalitis.

PLGA NPs containing poly(I:C) or CpG ODN together with OVA have also been studied for the induction of CTL responses in a cancer vaccine study [75]. Immunization of mice (intravenous) with the PLGA(poly(I:C)) or (CpG ODN) together with OVA elicited potent OVA-specific CTL activity compared with particles containing OVA only. In accordance with these results, those formulations exerted potent antitumor activity in mice that were subcutaneously implanted with EG7.OVA tumor cells. These results show that encapsulation of poly(I:C) or CpG ODN together with antigen in biodegradable PLGA NPs is an effective approach for the induction of potent antigen-specific CTL responses *in vivo*.

In addition to improving parenteral immunizations, PLA/PLGA particles carrying PRR ligands have also been studied for the purpose of improving mucosal vaccine administration. Zhu *et al.* designed PLGA par-

ticles carrying PRR ligands and able to target the large intestine after oral delivery in the mouse model [11]. The particles were coated with methacrylate-based polymer Eudragit FS30D to bypass the harmful effects of digestive low pH and enzymatic destruction and to selectively deliver the particles to the lower GI tract. The PLGA particles containing the ligands macrophage-activating lipoprotein (MALP-2) for TLR2, polyinosine-polycytidylic acid (poly(I:C)) for TLR3 and the CpG ODN for TLR9, were able to induce colorectal immunity and protected against rectal or vaginal viral challenge with the vaccinia virus vPE-16, which expresses the HIV Env epitope used in the peptide vaccine.

However, despite the fact that numerous studies have used codelivery systems (antigen and PRR ligand(s) in the same particle), others have shown that coadministration (antigen and PRR ligand(s) in different particles) has equivalent and even better effect. In this manner, Kazzaz *et al.* [76] observed that codelivery of HIV-1 gp120 and MPLA (TLR4 ligand) or RC529 (synthetic form of MPLA) encapsulated within the same particle and coadministration of PLGA(gp120) and PLGA(MPLA) (or RC529) within different particles have an equivalent immune potency for specific-IgG and IgG2a production in mice.

More recently and consistent with previous observations [76,77], Kasturi *et al.* showed, in their supplementary data, that coadministration of PLGA(OVA) and PLGA(MPLA+R837(TLR7)) induced stronger IgG2c and IgG1 production than codelivery of PLGA(OVA+MPLA+R837) after subcutaneous administration in the mouse model [15]. Moreover, PLGA(OVA) plus PLGA(MPLA+R837) induced synergistic increases in antigen-specific, NAbs compared with immunization with NPs containing antigens plus a single TLR ligand. In addition to OVA, they also used the protective antigen (PA) from *Bacillus anthracis* and hemagglutinin (HA) from avian influenza H5N1 virus. As observed with OVA, there was a synergistic enhancement in the antigen-specific Ab responses after immunization with PLGA(MPLA+R837) plus PLGA(PA) or PLGA(HA). These responses completely protected mice against lethal avian and swine influenza virus strains, and induced robust immunity against pandemic H1N1 influenza in rhesus macaques.

Data supporting the idea that antigen and PRR ligand(s) can be delivered on separate particles have also been observed recently using ultrasmall Pluronic-stabilized poly(propylene sulfide) [78] or PLGA [79].

Despite all these observations, questions still remain concerning the codelivery or the coadministration strategies. This warrants further consideration and needs intensive investigations but probably depends

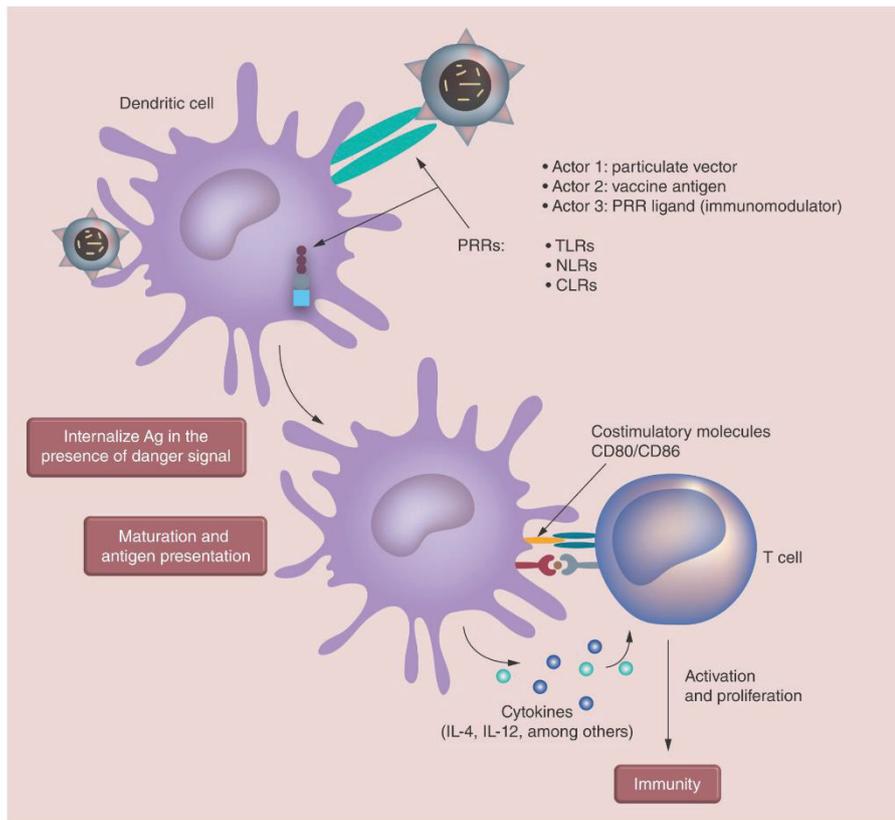


Figure 3. Potentiating the immune response with poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) particles carrying pattern recognition receptor ligands. The actual concept comprises target dendritic cells with immunostimulant molecules and vaccine antigen carried by a poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) particulate vector to trigger specific immune responses against the corresponding pathogen. CLR: C-type lectin receptor; NLR: NOD-like receptor; PRR: Pattern recognition receptor; TLR: Toll-like receptor.

on the type of particle system, antigen, administration route and of course the immunostimulatory molecule(s) used.

Strategies to improve cell & tissue targeting by PLA/PLGA particles

As discussed above, DCs are a key component in the induction of strong and long-lasting immune responses toward specific antigens. Being able to specifically deliver antigens and/or immunostimulant molecules to those cells by PLA or PLGA particles is a popular strategy [80–82]. However this delivery could be further improved by the presence of ligands included on the surface of particles to target specific tissues or cell surface antigens and reduce nonspecific distribu-

tion. In this context a large number of ligands are currently being assessed including proteins, peptides, Abs, polysaccharides, glycolipids, glycoproteins and lectins [8].

The use of lectins capable of targeting CLRs is a very attractive strategy to enhance the efficacy of vaccines. These molecules are highly specific internalization receptors that facilitate antigen uptake, processing and loading on MHC class I and II molecules leading to antigen presentation toward Th1 or Th2 orientation [83].

This was the objective of the recent study from Gupta *et al.* who used DT- and TT-encapsulated PLA particles with adsorbed soybean agglutinin (SBagg) lectins that resulted in a better association of polymer

particles with DCs [84]. In the mouse model, immunizations (im.) with PLA-SBagg-antigens elicited a stronger Ab response than with plain particles entrapping antigens (also higher than alum adsorbed antigens). The improved immunogenicity of PLA-SBagg-antigens was attributed to the N-linked glycan-mediated targeting of polymer particles to DCs. Other *in vivo* studies using varied particulate vectors demonstrated how CLR targeting can be employed for cell-specific antigen delivery and can result in enhanced humoral and cellular immune responses [85–88].

Several studies have also demonstrated the successful use of antilectin antibody-grafted nanoparticles to increase the uptake of these carriers by DCs. As an example, Cruz *et al.* tested various Abs recognizing the DC-specific receptor DC-SIGN (type II CLR) to study the effects of PEG copolymer shielding and

Ab type on antibody–receptor interactions [89]. While they found that shielding can lessen the efficacy of the targeted delivery through Abs, they also showed that particles with a coat of Abs targeting the carbohydrate recognition domain of the DC-SIGN were more efficiently taken up by DCs than those targeting the receptor's neck domain. However both formulations bound selectively to DCs and were able to induce a stronger cytokine production toward Th1 than Th2.

Mannosylation of particles is also a promising strategy to selectively target vaccine antigens to the mannose receptor expressed on DCs. PLGA NPs decorated with mannan (*Saccharomyces cerevisiae*), are able to simultaneously enhance antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses compared with nondecorated NPs [90]. Mannose-PEG(3)-NH(2) grafting can also

Table 2. Examples of studies demonstrating that carrying of antigens and pattern recognition receptor ligands by poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) particles potentiate specific immune responses *in vivo*.

Nanocarrier	Antigen/immunostimulant molecule(s)	Model/immunization route	Immune response	Ref.
PLGA NPs	Adsorbed rWNVE and CpG ODN (TLR9 ligand)	Mouse/sc.	– Humoral responses polarized toward Th1 responses compared with predominately Th2-biased responses with alum adjuvant – Compared with alum, this system offered superior protection against WN virus encephalitis	[73]
PLGA NPs	– Adsorbed HA or OVA – Encapsulated MPLA (TLR4) and/or R837 (TLR7)	Mouse, rhesus macaques/sc.	– PLGA(MPLA+R837) + PLGA(Ag) induces synergistic increases in NAbs compared with immunization with NPs containing Ags + a single ligand – Immunization protected completely against lethal influenza virus strains in mice – Induced robust immunity against pandemic H1N1 influenza in macaques	[15]
PLGA NPs	Encapsulated PeptAg/ MALP-2 (TLR2), poly(I:C) (TLR3) and CpG ODN (TLR9)	Mouse/oral	– Colorectal immunity – Protection against rectal or vaginal viral challenge	[11]
PLA NPs	– Adsorbed HIV-1 p24 – Encapsulated NOD1/NOD2 ligands	Mouse/sc.	– Encapsulated NOD1/2 ligands increased anti-p24 IgG responses up to 100-times compared with the free ligands, alum-p24 or PLA-p24 alone	[17]
PLGA NPs	Encapsulated HBcAg + MPLA (TLR4)	Mouse/sc.	– PLGA(MPLA+HBcAg) induced a stronger Th1 cellular immune response than HBcAg alone or PLGA(HBcAg)	[74]
PLGA NPs	Encapsulated OVA + poly(I:C) or CpG ODN	Mouse/iv.	– PLGA(OVA+poly(I:C) or CpG ODN) elicited potent specific CTL activity compared with PLGA(OVA) – PLGA(OVA+poly(I:C) or CpG ODN) exerted potent antitumor activity in mice	[75]

Ag: Antigen; CpG ODN: CpG oligodeoxynucleotides; CTL: Cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes; HA: Hemagglutinin; HBcAg: Hepatitis B virus core antigen; iv.: intravenous; MPLA: Monophosphoryl lipid A; NP: Nanoparticle; OVA: Ovalbumin; PLA: Poly(lactic acid); PLGA: Poly(lactic-co-glycolic acid); poly(I:C): Polyinosinic-polycytidylic acid; rWNVE: West Nile virus envelope protein; sc.: subcutaneous; WN: West Nile.

enhance the uptake of PLGA MS, with a variable relative contribution of specific and nonspecific uptake mechanism [91].

While targeting DCs during parenteral administrations has shown to be effective, to achieve such a goal by mucosal administration (e.g., enteral or nasal route), seems to be more complex [92].

The ability of M cells to take up and transcytose diverse numbers of microorganisms to APCs have made M cells an ideal target for vaccine delivery to the mucosal immune system [93]. Those cells are found in the follicle-associated epithelium of the Peyer's patches as well as in nasopharyngeal-associated lymphoid tissue (NALT) and bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) [94]. It has been shown that the lectins Ulex europaeus 1 (UEA-1) and the Lotus tetragonolobus agglutinin (LTA) are able to selectively bind to α -L-fucose targets on mouse M cells and are rapidly endocytosed and transported to M cell basolateral membranes. Therefore, oral administration (mouse model) of UEA-1 or LTA grafted PLGA NPs encapsulating HBsAg result in higher mucosal and systemic responses compared with uncoated NPs [58,95]. However, UEA-1 selectively binds to mouse M cells but not human [96].

New PLGA formulations were then developed to target the β 1 integrins expressed at the apical side of human M cells [97,98] via an RGD peptide that enhances the transport of those particles by 3.5-fold compared with particles without RGD peptides [99]. *In vivo* studies showed these NPs concentrate in Peyer's patches and were able to induce the production of specific IgG. Other M cell homing peptide (CKS9) or Abs (CA19.9) have also been studied [93,100].

Promising outcomes have been achieved with particle-based vaccine targeting M cells through mucosal administration. By applying the knowledge gained from studies on DC particle targeting, further major advances should arise in the field of mucosal vaccines. The dual targeting of M cells and DCs with codelivery or coadministration of immunostimulants seems to be a promising approach.

Vaccination strategy not only benefits from major advances in antigen/ligand formulation and administration, but also a better comprehension of the relationship between modulating particle physical properties and immune cells uptake. It has been established that rendering PLGA nanoparticles mucoadherent, by shifting their charge to positive through glycol-chitosan coating, induces higher systemic and mucosal immune response after nasal immunization in mice than the naked PLGA counterpart, presumably linked to their higher bioavailability due to a lower clearance [101].

It has also been demonstrated that modulating the size of the particles can influence the immune

response outcome [102–105]. Using PLGA particles sized at 300 nm, 1 μ m, 7 μ m and 17 μ m formulated with OVA and CpG ODN in *in vitro* and *in vivo* studies, it has been observed that 300 nm sized particles were the most efficiently taken up by DCs leading to efficient antigen delivery and DC activation, compared with bigger particles [106]. The systemic antigen-specific immune response to vaccination was also measured in mice. PLGA particles sized 300 nm generated the highest antigen-specific cytotoxic T-cell responses. These mice also showed the highest antigen-specific IgG2a:IgG1 ratio. This study suggests that the smaller the PLGA particle used to deliver antigen and adjuvants the stronger the antigen-specific cytotoxic T-cell response generated.

However this study did not establish the lower size limit for efficient uptake. Will 50 nm particles be more efficient than those of 300 nm?

Conclusion & future perspective

Over the last couple of decades, many groups have contributed to the development of PLA/PLGA controlled release NPs and MPs for antigens delivery to compensate their poor immunogenicity. These particle-based vaccines are now well established for their ability to provide persistent levels of Abs and to exhibit immunological memory. For designing new vaccines against viral infections and cancers, or intracellular pathogens, several strategies have been employed, from inclusion of different immunostimulatory molecules (essentially PRR ligands) to specific targeting of PLA/PLGA particles to APCs. This has led to the induction of both humoral and cellular immune responses, in animal models ranging from rodents to nonhuman primates. The induction of both types of responses may be a prerequisite for future vaccination strategies based on these eco-compatible polymers. It is also worth noting both, their potential interest and drawbacks toward alternative delivery systems already on the market, such as virosomes, emulsions or aluminum salts. Indeed, PLA/PLGA particles have a very short history in clinical studies and in some cases, sophisticated design of vaccine formulations associated to complex regulatory requirements could be major limitations for their development as vaccine delivery systems for human use. It is therefore essential that further research on such multifunctional vaccine delivery platform addresses these questions to be envisioned as a viable alternative method for vaccine delivery.

First, the chemistry behind particle synthesis should be kept scalable, with simple design that will not impair cost, reproducibility and safety issues. Second, the choice of immunostimulatory molecules should be focused on well-studied candidates, with strong preclin-

ical data, as prototype PRR ligands could have varied effects, depending on dose and route of administration, among others. Last, more basic science is required to decipher the mechanisms of particle uptake by APCs, transport to the lymphoid system, biodistribution and degradation of particles in the organism. In this respect, the particle formulation process facilitates the labeling of PLA/PLGA particles with different probes (such as fluorescent or radioactive probes). These labeled particles will constitute effective tools to understand the molecular basis of vaccine immunity through live imaging studies and to fine tune vaccine formulations through a back and forth scientific approach.

As illustrated in this review, the huge amount of preclinical data gathered with PLA/PLGA vaccine

platform provides strong hope that these particles will overcome the current challenges, potentially becoming key components among the vaccine armada of the future.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

Background

- The development of safe and effective vaccines for cancer and infectious diseases remains a major goal in global public health.
- One of the most important areas of research is the design of new generation of adjuvants.
- Particulate compounds including poly(lactic acid) (PLA) and poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nano- and micro-particles have been shown to possess significant potential as antigen and immunostimulant molecule delivery systems to antigen-presenting cells (APCs).

PLA & PLGA particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery

- Ease of encapsulating or adsorbing single or combination of antigen and ligands in PLA/PLGA particles.
- Potential of targeting pattern recognition receptors by PLA/PLGA particulate vectors to promote immune responses and outline the progress being made toward the development of pattern recognition receptor-based adjuvants for use in clinical-grade vaccines.
- New selective targeting of PLA/PLGA particles to APCs has been successfully achieved, and elevated humoral and cellular immune responses have been attained in preclinical models.

Conclusion & future perspective

- Nanoparticles can be optimized to improve their uptake and immunogenicity; understanding the role of nanoparticle's immunoproperties is important to fine tune these materials before their use in vaccine formulations.
- Thorough characterization and standardized preparation methods are critical to create an accurate knowledge base about PLA/PLGA particulate vector effects on the immune system.
- More basic science is required to decipher the mechanism of particle uptake by APCs, transport to the lymphoid system, biodistribution and toxicity.

References

- 1 Mecke AS, Munks MW, Marrack P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. *Immunity* 27(5), 687–690 (2007).
- 2 Clapp T, Siebert P, Chen D, Jones Braun L. Vaccines with aluminum-containing adjuvants: optimizing vaccine efficacy and thermal stability. *J. Pharm. Sci.* 100(2), 388–401 (2011).
- 3 Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat. Med.* 19(12), 1597–1608 (2013).
- 4 Kool M, Fierens K, Lambrecht BN. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *J. Med. Microbiol.* 61(Pt 7), 927–934 (2012).
- 5 Leleux J, Roy K. Micro and nanoparticle-based delivery systems for vaccine immunotherapy: an immunological and materials perspective. *Adv. Healthc. Mater.* 2(1), 72–94 (2013).
- 6 De Temmerman ML, Rejman J, Demeester J, Irvine DJ, Gander B, De Smedt SC. Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response. *Drug Discov. Today* 16(13–14), 569–582 (2011).
- 7 Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 17(2), 93–102 (1996).
- 8 Silva JM, Videira M, Gaspar R, Preat V, Florindo HF. Immune system targeting by biodegradable nanoparticles for cancer vaccines. *J. Control. Release* 168(2), 179–199 (2013).
- 9 Lamalle-Bernard D, Munier S, Compagnon C *et al.* Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity. *J. Control. Release* 115(1), 57–67 (2006).

- 10 Guillon C, Mayol K, Terrat C *et al.* Formulation of HIV-1 Tat and p24 antigens by PLA nanoparticles or MF59 impacts the breadth, but not the magnitude, of serum and faecal antibody responses in rabbits. *Vaccine* 25(43), 7491–7501 (2007).
- 11 Zhu Q, Talton J, Zhang G *et al.* Large intestine-targeted, nanoparticle-releasing oral vaccine to control genitoretal viral infection. *Nat. Med.* 18(8), 1291–1296 (2012).
- 12 Xu FH, Zhang Q. Recent advances in the preparation progress of protein/peptide drug loaded PLA/PLGA microspheres. *Yao Xue Xue Bao* 42(1), 1–7 (2007).
- 13 Wischke C, Schwendeman SP. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int. J. Pharm.* 364(2), 298–327 (2008).
- 14 Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(3), 329–347 (2003).
- 15 Kasturi SP, Skountzou I, Albrecht RA *et al.* Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* 470(7335), 543–547 (2011).
- 16 Ataman-Onal Y, Munier S, Gancee A *et al.* Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. *J. Control. Release* 112(2), 175–185 (2006).
- 17 Pavot V, Rochereau N, Primard C *et al.* Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties. *J. Control. Release* 167(1), 60–67 (2013).
- 18 Cooper NR, Nemerow GR. The role of antibody and complement in the control of viral infections. *J. Invest. Dermatol.* 83(1 Suppl.), s121–s127 (1984).
- 19 Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55(1), R1–R4 (1989).
- 20 Legrand P, Lesieur S, Bochot A *et al.* Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *Int. J. Pharm.* 344(1–2), 33–43 (2007).
- 21 Ibrahim H BC, Doelker E, Buri P, Gurny R. Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process. *Int. J. Pharm.* 87(1–3), 239–246 (1992).
- 22 Rivera PA, Martinez-Oharriz MC, Rubio M, Irache JM, Espuelas S. Fluconazole encapsulation in PLGA microspheres by spray-drying. *J. Microencapsul.* 21(2), 203–211 (2004).
- 23 Dinarvand R, Sepehri N, Manoochehri S, Rouhani H, Atyabi F. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int. J. Nanomed.* 6, 877–895 (2011).
- 24 Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Preat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J. Control. Release* 161(2), 505–522 (2012).
- 25 Johansen P, Men Y, Merkle HP, Gander B. Revisiting PLA/PLGA microspheres: an analysis of their potential in parenteral vaccination. *Eur. J. Pharm. Biopharm* 50(1), 129–146 (2000).
- 26 Wendorf J, Singh M, Chesko J *et al.* A practical approach to the use of nanoparticles for vaccine delivery. *J. Pharm. Sci.* 95(12), 2738–2750 (2006).
- 27 Holzer M, Vogel V, Mantele W, Schwartz D, Haase W, Langer K. Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72(2), 428–437 (2009).
- 28 Cleland JL. Single-administration vaccines: controlled-release technology to mimic repeated immunizations. *Trends Biotechnol.* 17(1), 25–29 (1999).
- 29 O'Hagan DT, Singh M. Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems. *Expert Rev. Vaccines* 2(2), 269–283 (2003).
- 30 Jiang W, Gupta RK, Deshpande MC, Schwendeman SP. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57(3), 391–410 (2005).
- 31 Okada H, Toguchi H. Biodegradable microspheres in drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 12(1), 1–99 (1995).
- 32 Putney SD, Burke PA. Improving protein therapeutics with sustained-release formulations. *Nat. Biotechnol.* 16(2), 153–157 (1998).
- 33 Aguado MT, Lambert PH. Controlled-release vaccines--biodegradable polylactide/polyglycolide (PL/PGL) microspheres as antigen vehicles. *Immunobiology* 184(2–3), 113–125 (1992).
- 34 Newman KD, Elamanchili P, Kwon GS, Samuel J. Uptake of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres by antigen-presenting cells *in vivo*. *J. Biomed. Mater. Res.* 60(3), 480–486 (2002).
- 35 Primard C, Rochereau N, Luciani E *et al.* Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells. *Biomaterials* 31(23), 6060–6068 (2010).
- 36 Schwendeman SP. Recent advances in the stabilization of proteins encapsulated in injectable PLGA delivery systems. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 19(1), 73–98 (2002).
- 37 Jiang W, Schwendeman SP. Stabilization of tetanus toxoid encapsulated in PLGA microspheres. *Mol. Pharm.* 5(5), 808–817 (2008).
- 38 Johansen P, Men Y, Audran R, Corradin G, Merkle HP, Gander B. Improving stability and release kinetics of microencapsulated tetanus toxoid by co-encapsulation of additives. *Pharm. Res.* 15(7), 1103–1110 (1998).
- 39 Fu K, Pack DW, Klivanov AM, Langer R. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharm. Res.* 17(1), 100–106 (2000).
- 40 Jain S, O'Hagan DT, Singh M. The long-term potential of biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microparticles as the next-generation vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines* 10(12), 1731–1742 (2011).
- 41 Almeida AJ, Alpar HO, Brown MR. Immune response to nasal delivery of antigenically intact tetanus toxoid

Review Pavot, Berthet, Rességuier *et al.*

- associated with poly(L-lactic acid) microspheres in rats, rabbits and guinea-pigs. *J. Pharm. Pharmacol.* 45(3), 198–203 (1993).
- 42 Butler SM, Tracy MA, Tilton RD. Adsorption of serum albumin to thin films of poly(lactide-co-glycolide). *J. Control. Release* 58(3), 335–347 (1999).
- 43 Audran R, Men Y, Johansen P, Gander B, Corradin G. Enhanced immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid with stabilizing agents. *Pharm. Res.* 15(7), 1111–1116 (1998).
- 44 Zhu G, Schwendeman SP. Stabilization of proteins encapsulated in cylindrical poly(lactide-co-glycolide) implants: mechanism of stabilization by basic additives. *Pharm. Res.* 17(3), 351–357 (2000).
- 45 Zhu G, Mallery SR, Schwendeman SP. Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly(lactide-co-glycolide). *Nat. Biotechnol.* 18(1), 52–57 (2000).
- 46 Jiang W, Schwendeman SP. Stabilization and controlled release of bovine serum albumin encapsulated in poly(D, L-lactide) and poly(ethylene glycol) microsphere blends. *Pharm. Res.* 18(6), 878–885 (2001).
- 47 Kazzaz J, Neideman J, Singh M, Ott G, O'Hagan DT. Novel anionic microparticles are a potent adjuvant for the induction of cytotoxic T lymphocytes against recombinant p55 gag from HIV-1. *J. Control. Release* 67(2–3), 347–356 (2000).
- 48 Singh M, Kazzaz J, Uguzzoli M, Malyala P, Chesko J, O'Hagan DT. Polylactide-co-glycolide microparticles with surface adsorbed antigens as vaccine delivery systems. *Curr. Drug Deliv.* 3(1), 115–120 (2006).
- 49 Singh M, Chesko J, Kazzaz J *et al.* Adsorption of a novel recombinant glycoprotein from HIV (Env gp120dV2 SF162) to anionic PLG microparticles retains the structural integrity of the protein, whereas encapsulation in PLG microparticles does not. *Pharm. Res.* 21(12), 2148–2152 (2004).
- 50 Slutter B, Bal S, Keijzer C *et al.* Nasal vaccination with N-trimethyl chitosan and PLGA based nanoparticles: nanoparticle characteristics determine quality and strength of the antibody response in mice against the encapsulated antigen. *Vaccine* 28(38), 6282–6291 (2010).
- 51 Raghuvanshi RS, Katare YK, Lalwani K, Ali MM, Singh O, Panda AK. Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. *Int. J. Pharm.* 245(1–2), 109–121 (2002).
- 52 Mohaghegh M, Tafaghodi M. Dextran microspheres could enhance immune responses against PLGA nanospheres encapsulated with tetanus toxoid and Quillaja saponins after nasal immunization in rabbit. *Pharm. Dev. Technol.* 16(1), 36–43 (2011).
- 53 Johansen P, Moon L, Tamber H, Merkle HP, Gander B, Sesardic D. Immunogenicity of single-dose diphtheria vaccines based on PLA/PLGA microspheres in guinea pigs. *Vaccine* 18(3–4), 209–215 (1999).
- 54 Saini V, Jain V, Sudheesh MS *et al.* Humoral and cell-mediated immune-responses after administration of a single-shot recombinant hepatitis B surface antigen vaccine formulated with cationic poly(l-lactide) microspheres. *J. Drug Target* 18(3), 212–222 (2010).
- 55 Thomas C, Rawat A, Hope-Weeks L, Ahsan F. Aerosolized PLA and PLGA nanoparticles enhance humoral, mucosal and cytokine responses to hepatitis B vaccine. *Mol. Pharm.* 8(2), 405–415 (2011).
- 56 Quintilio W, Takata CS, Sant'anna OA, Da Costa MH, Raw I. Evaluation of a diphtheria and tetanus PLGA microencapsulated vaccine formulation without stabilizers. *Curr. Drug Deliv.* 6(3), 297–304 (2009).
- 57 Tobio M, Schwendeman SP, Guo Y, McIver J, Langer R, Alonso MJ. Improved immunogenicity of a core-coated tetanus toxoid delivery system. *Vaccine* 18(7–8), 618–622 (1999).
- 58 Gupta PN, Khatri K, Goyal AK, Mishra N, Vyas SP. M-cell targeted biodegradable PLGA nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. *J. Drug Target* 15(10), 701–713 (2007).
- 59 Demento SL, Cui W, Criscione JM *et al.* Role of sustained antigen release from nanoparticle vaccines in shaping the T cell memory phenotype. *Biomaterials* 33(19), 4957–4964 (2012).
- 60 Salvador A, Igartua M, Hernandez RM, Pedraz JL. An overview on the field of micro- and nanotechnologies for synthetic peptide-based vaccines. *J. Drug Deliv.* 2011, 181646 (2011).
- 61 Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* 66(17), 2873–2896 (2009).
- 62 Joffe OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12(8), 557–569 (2012).
- 63 Geddes K, Magalhaes JG, Girardin SE. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8(6), 465–479 (2009).
- 64 Duthie MS, Windish HP, Fox CB, Reed SG. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunol. Rev.* 239(1), 178–196 (2011).
- 65 Timmermans K, Plantinga TS, Kox M *et al.* Blueprints of signaling interactions between pattern recognition receptors: implications for the design of vaccine adjuvants. *Clin. Vaccine Immunol.* 20(3), 427–432 (2013).
- 66 Napolitani G, Rinaldi A, Bertoni F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.* 6(8), 769–776 (2005).
- 67 Mount A, Koernig S, Silva A, Drane D, Maraskovsky E, Morelli AB. Combination of adjuvants: the future of vaccine design. *Expert Rev. Vaccines* 12(7), 733–746 (2013).
- 68 Dai J, Liu B, Li Z. Regulatory T cells and Toll-like receptors: what is the missing link? *Int. Immunopharmacol.* 9(5), 528–533 (2009).
- 69 Liu G, Zhang L, Zhao Y. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 160(2), 168–175 (2010).
- 70 Warger T, Osterloh P, Rechtsteiner G *et al.* Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses *in vivo*. *Blood* 108(2), 544–550 (2006).

- 71 Heit A, Schmitz F, Haas T, Busch DH, Wagner H. Antigen co-encapsulated with adjuvants efficiently drive protective T cell immunity. *Eur. J. Immunol.* 37(8), 2063–2074 (2007).
- 72 Wischke C, Mathew S, Roch T, Frentsch M, Lendlein A. Potential of NOD receptor ligands as immunomodulators in particulate vaccine carriers. *J. Control. Release* 164(3), 299–306 (2012).
- 73 Demento SL, Bonafe N, Cui W *et al.* TLR9-targeted biodegradable nanoparticles as immunization vectors protect against West Nile encephalitis. *J. Immunol.* 185(5), 2989–2997 (2010).
- 74 Chong CS, Cao M, Wong WW *et al.* Enhancement of T helper type 1 immune responses against hepatitis B virus core antigen by PLGA nanoparticle vaccine delivery. *J. Control. Release* 102(1), 85–99 (2005).
- 75 Lee YR, Lee YH, Kim KH, Im SA, Lee CK. Induction of potent antigen-specific cytotoxic T cell response by PLGA-nanoparticles containing antigen and TLR agonist. *Immune Netw.* 13(1), 30–33 (2013).
- 76 Kazzaz J, Singh M, Ugozzoli M, Chesko J, Soenawan E, O'Hagan DT. Encapsulation of the immune potentiators MPL and RC529 in PLG microparticles enhances their potency. *J. Control. Release* 110(3), 566–573 (2006).
- 77 Singh M, Chakrapani A, O'Hagan D. Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems. *Expert Rev. Vaccines* 6(5), 797–808 (2007).
- 78 De Titta A, Ballester M, Julier Z *et al.* Nanoparticle conjugation of CpG enhances adjuvancy for cellular immunity and memory recall at low dose. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110(49), 19902–19907 (2013).
- 79 Ilyinskii PO, Roy CJ, O'Neil CP *et al.* Adjuvant-carrying synthetic vaccine particles augment the immune response to encapsulated antigen and exhibit strong local immune activation without inducing systemic cytokine release. *Vaccine* 32(24), 2882–2895 (2014).
- 80 Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56(11), 1649–1659 (2004).
- 81 Hu L ZY, Gao C. Influence of structures and properties of polymer nanoparticles on their cellular uptake and cell functions. *Prog. Chem.* 21, 1254–1267 (2009).
- 82 Lee YR, Lee YH, Im SA, Kim K, Lee CK. Formulation and characterization of antigen-loaded PLGA nanoparticles for efficient cross-priming of the antigen. *Immune Netw.* 11(3), 163–168 (2011).
- 83 Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9(7), 465–479 (2009).
- 84 Gupta RK, Goswami DG, Singh RR, Surolia A, Panda AK. Soybean agglutinin coated PLA particles entrapping candidate vaccines induces enhanced primary and sustained secondary antibody response from single point immunization. *Eur. J. Pharm. Sci.* 45(3), 282–295 (2012).
- 85 Ramakrishna V, Trembl JF, Vitale L *et al.* Mannose receptor targeting of tumor antigen pmel17 to human dendritic cells directs anti-melanoma T cell responses via multiple HLA molecules. *J. Immunol.* 172(5), 2845–2852 (2004).
- 86 He LZ, Crocker A, Lee J *et al.* Antigenic targeting of the human mannose receptor induces tumor immunity. *J. Immunol.* 178(10), 6259–6267 (2007).
- 87 Maglinao M, Eriksson M, Schlegel MK *et al.* A platform to screen for C-type lectin receptor-binding carbohydrates and their potential for cell-specific targeting and immune modulation. *J. Control. Release* 175, 36–42 (2014).
- 88 Lepenies B, Lee J, Sonkaria S. Targeting C-type lectin receptors with multivalent carbohydrate ligands. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65(9), 1271–1281 (2013).
- 89 Cruz LJ, Tacke PJ, Fokkink R, Figdor CG. The influence of PEG chain length and targeting moiety on antibody-mediated delivery of nanoparticle vaccines to human dendritic cells. *Biomaterials* 32(28), 6791–6803 (2011).
- 90 Hamdy S, Haddadi A, Shayeganpour A, Samuel J, Lavasanifar A. Activation of antigen-specific T cell-responses by mannan-decorated PLGA nanoparticles. *Pharm. Res.* 28(9), 2288–2301 (2011).
- 91 Brandhonneur N, Chevanne F, Vie V *et al.* Specific and non-specific phagocytosis of ligand-grafted PLGA microspheres by macrophages. *Eur. J. Pharm. Sci.* 36(4–5), 474–485 (2009).
- 92 Pavot V, Rochereau N, Genin C, Verrier B, Paul S. New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine* 30(2), 142–154 (2012).
- 93 Azizi A, Kumar A, Diaz-Mitoma F, Mestecky J. Enhancing oral vaccine potency by targeting intestinal M cells. *PLoS Pathog.* 6(11), e1001147 (2010).
- 94 Gebert A, Pabst R. M cells at locations outside the gut. *Semin. Immunol.* 11(3), 165–170 (1999).
- 95 Mishra N, Tiwari S, Vaidya B, Agrawal GP, Vyas SP. Lectin anchored PLGA nanoparticles for oral mucosal immunization against hepatitis B. *J. Drug Target* 19(1), 67–78 (2011).
- 96 Clark MA, Jepson MA, Simmons NL, Hirst BH. Selective binding and transcytosis of *Ulex europaeus* 1 lectin by mouse Peyer's patch M-cells *in vivo*. *Cell Tissue Res.* 282(3), 455–461 (1995).
- 97 Gullberg E, Leonard M, Karlsson J *et al.* Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279(3), 808–813 (2000).
- 98 Gullberg E, Keita AV, Salim SY *et al.* Identification of cell adhesion molecules in the human follicle-associated epithelium that improve nanoparticle uptake into the Peyer's patches. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319(2), 632–639 (2006).
- 99 Garinot M, Fievez V, Pourcelle V *et al.* PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. *J. Control. Release* 120(3), 195–204 (2007).
- 100 Jiang T, Singh B, Li HS *et al.* Targeted oral delivery of BmpB vaccine using porous PLGA microparticles coated with M cell homing peptide-coupled chitosan. *Biomaterials* 35(7), 2365–2373 (2014).
- 101 Pawar D, Mangal S, Goswami R, Jaganathan KS. Development and characterization of surface modified PLGA nanoparticles for nasal vaccine delivery: effect of mucoadhesive coating on antigen uptake and immune adjuvant activity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85(3 Pt A), 550–559 (2013).

Review Pavot, Berthet, Rességuier *et al.*

- 102 Audran R, Peter K, Dannull J *et al.* Encapsulation of peptides in biodegradable microspheres prolongs their MHC class-I presentation by dendritic cells and macrophages *in vitro*. *Vaccine* 21(11–12), 1250–1255 (2003).
- 103 Kanchan V, Panda AK. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterials* 28(35), 5344–5357 (2007).
- 104 Champion JA, Walker A, Mitragotri S. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm. Res.* 25(8), 1815–1821 (2008).
- 105 Petros RA, Desimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9(8), 615–627 (2010).
- 106 Joshi VB, Geary SM, Salem AK. Biodegradable particles as vaccine delivery systems: size matters. *AAPS J.* 15(1), 85–94 (2013).

Demande d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

DEMANDE D'AUTORISATION DE PROJET UTILISANT DES ANIMAUX A DES FINS SCIENTIFIQUES

Ce formulaire a pour objectif de rassembler les informations permettant au comité d'éthique dont relève l'établissement utilisateur où sera réalisé le projet utilisant des animaux à des fins scientifiques, d'évaluer éthiquement le projet et au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche d'autoriser le projet suite à l'évaluation éthique.

Le fichier de ce formulaire ainsi que la notice d'aide pour le renseigner peuvent être demandés à : autorisation-projet@recherche.gouv.fr

Le projet est défini comme un programme de travail répondant à un objectif scientifique défini, utilisant un ou plusieurs modèles animaux et impliquant une ou plusieurs procédures expérimentales (article R-214-89 du Code rural et de la pêche maritime).

Le formulaire renseigné sera envoyé par lettre recommandée avec accusé de réception à l'adresse suivante :

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche – Direction Générale pour la Recherche et l'Innovation – Secrétariat « Autorisation de projet » - 1, rue Descartes, 75231 PARIS cedex 5

N.B. A l'exception des duplications des blocs permises et repérées par ■■■, aucune modification des items de ce formulaire ne doit être effectuée.

1. INFORMATIONS GÉNÉRALES

1.1. TITRE DU PROJET :

Etude de nanostructures biodégradables et bioactives pour la reconstruction fonctionnelle de plaies cutanées

1.2. Durée du projet :

5 ans

1.3. Date prévue de début du projet :

Dès autorisation

2. RÉSUMÉ NON TECHNIQUE

Les patients sévèrement blessés présentent souvent des plaies ouvertes, avec d'importants dommages cutanés et osseux provoqués par des chocs violents, des explosions, des projectiles ou/et des brûlures. La réaction physiologique de l'organisme va dicter le processus de cicatrisation de la plaie cutanée et de la régénération tissulaire. À cet égard, la première phase d'évolution de la plaie est caractérisée par la colonisation rapide du tissu lésé par des microorganismes, souvent résistants aux antibiotiques ou/et aux antiseptiques, ce qui fait de l'infection une des principales causes des complications post opératoires et de l'échec de la cicatrisation et de la réparation tissulaire.

Ces dernières années émergent tout un champ de recherche, axé sur la mise au point et le développement de biomatériaux vecteurs d'agents thérapeutiques, comme alternative aux méthodes traditionnelles de reconstruction tissulaire et régénération de la peau, notamment les greffes. Ces biomatériaux incluent des gels, films, membranes, matrices fibreuses et micro ou nanoparticules faits de polymères naturels ou synthétiques, biodégradables et biocompatibles, susceptibles de permettre la délivrance contrôlée et séquentielle de molécules thérapeutiques ou anti-infectieuses au niveau de la plaie. Le but est de stimuler et d'activer les réponses physiologiques favorables au processus de réparation tissulaire.

L'objectif de notre projet est de concevoir des « pansements biologiques » utilisables sur le terrain lorsque la gravité des plaies commande l'intervention d'urgence, dans un contexte où l'on ne peut pas avoir rapidement recours aux méthodes classiques.

A cette fin, des particules nanométriques (de diamètre inférieur à 0,2 microns), biodégradables et biocompatibles, seront synthétisées avec des principes actifs incorporés dans leur cœur ou attachés à leur surface. Notre objectif est d'encapsuler un antioxydant et un anti-infectieux dans le cœur, et d'adsorber un ou plusieurs facteurs de croissance tissulaire à la surface, ces diverses molécules étant connues pour leurs effets bénéfiques dans le processus de cicatrisation. Ces nanoparticules « médicalisées » pourront ensuite être incorporées dans différents types de supports comme par exemple des nano-fibres biodégradables ou encore dans des hydrogels, afin de constituer de véritables pansements biodégradables.

Après la phase initiale de tests *in vitro* (incorporation des molécules, stabilité, relargage, efficacité sur systèmes cellulaires...), la démonstration de l'efficacité de ces biomatériaux nécessite une approche *in vivo* puisque l'on étudie le phénomène de cicatrisation cutanée dans le système intégré qu'est l'organisme. Aucune méthode alternative ne peut alors se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de notre projet. Deux modèles de plaies cutanées profondes seront utilisés, la plaie d'excision et la brûlure thermique. Les études seront menées en parallèle sur un modèle murin d'animaux « normaux » et sur un modèle diabétique. Il est en effet établi que le diabète complique le processus de cicatrisation, et ce modèle nous permettra de mieux mettre en évidence l'effet bénéfique des traitements envisagés.

Le nombre de souris nécessaires aux expérimentations a été réduit autant que possible sans compromettre l'interprétation statistique des résultats. Une définition précise des points limite, un protocole adapté d'anesthésie-analgésie et une surveillance continue des animaux par un personnel compétent permettront de limiter au maximum toute souffrance animale. Nous prévoyons d'utiliser 1402 souris sur une période de 5 ans. Ce nombre de souris nous permettra de mettre en évidence l'efficacité des différents biomatériaux bioactifs sur le processus de cicatrisation en fonction du type de plaie effectué.

Nos travaux devraient enrichir la compréhension du processus de cicatrisation et permettraient d'envisager à moyen terme le développement de notre pansement biologique pour des applications médicales.

3. INFORMATIONS ADMINISTRATIVES ET RÉGLEMENTAIRES

3.1. L'établissement utilisateur (EU)

3.1.1. Agrément de l'EU où seront utilisés les animaux :

- Nom : FR3302 (Institut de Biologie et Chimie des Protéines)
- Numéro d'agrément : B 69 387 0601
- Date de délivrance de l'agrément : 08/02/2012
- Nom et prénom du responsable : Gilbert Deléage
- Adresse électronique du responsable : gilbert.deleage@ibcp.fr
- Nom et prénom de la personne délégataire du responsable présente dans l'EU : Bérengère Fromy
- Adresse électronique de ce délégataire : berengere.fromy@ibcp.fr

3.1.2. Comité d'éthique agréé par le MESR dont relève l'EU :

C2EA -15 : CECCAPP

3.1.3. Responsable(s) de la mise en œuvre générale du projet dans l'EU et de sa conformité à l'autorisation de projet :

Nombre de responsables :

4

Responsable 1 :

- Nom et prénom : **Gauthier Yves**
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : UMR5305 CNRS/UCBL1, 7 Passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 7.
- Adresse électronique : yves.gauthier@ibcp.fr
- Téléphone : 04/72/72/26/74

Responsable 2 :

- Nom et prénom : **Verrier Bernard**
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : UMR5305 CNRS/UCBL1, 7 Passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 7.
- Adresse électronique : bernard.verrier@ibcp.fr
- Téléphone : 04/72/72/26/36

Responsable 3 :

- Nom et prénom : **Sigaudo-Roussel Dominique**
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : UMR5305 CNRS/UCBL1, 7 Passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 7.
- Adresse électronique : dominique.sigaudo-roussel@ibcp.fr
- Téléphone : 04/37/65/29/34

Responsable 4 :

- Nom et prénom : **Sohier Jérôme**
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : UMR5305 CNRS/UCBL1, 7 Passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 7.
- Adresse électronique : jerome.sohier@ibcp.fr
- Téléphone : 04/37/65/29/34

3.1.4. Responsable(s) du bien-être des animaux :

Nombre de responsables :

3

Responsable 1 :

- Nom et prénom : **Berthet Morgane**
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : UMR5305 CNRS/UCBL1, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 7.
- Adresse électronique : morgane.berthet@ibcp.fr
- Téléphone : 04/37/65/29/13

Responsable 2 :

- Nom et prénom : **JOSSET-LAMAUGARNY Audrey**
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : UMR5305 CNRS/UCBL1, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 7.
- Adresse électronique : audrey.josset-lamaugarny@ibcp.fr
- Téléphone : 04/72/72/26/09

Responsable 3 :

- Nom et prénom : **Vial Jocelyne**
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : UMR5305 CNRS/UCBL1, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 7.
- Adresse électronique : jocelyne.vial@ibcp.fr
- Téléphone : 04/72/72/26/09

3.2. Le personnel

- **Compétences des personnes participant au projet :**

- **la conception des procédures expérimentales et des projets** ● oui ○ non
- **l'application de procédures expérimentales aux animaux** ● oui ○ non
- **les soins aux animaux** ● oui ○ non
- **la mise à mort des animaux** ● oui ○ non

3.3. Le projet

3.3.1. L'objectif du projet :

Est-il :

- justifié du point de vue éducatif ? ○
- requis par la loi ? ○
- justifié du point de vue scientifique ? ●
- Informations sur cette justification :

○

Cette étude s'inscrit dans le cadre du projet ANR-ASTRID « PaNaCée » validé en Juillet 2014 par l'ANR et d'une bourse DGA (M. Berthet). Il entre dans la thématique de l'unité de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (UMR 5305), qui a pour objectif l'étude du tissu biologique dans son intégrité fonctionnelle et le développement de nouveaux concepts d'ingénierie thérapeutique. Ce projet sera réalisé avec des collaborateurs externes (IRBA, INSERM, ADJUVATIS) et internes (équipe D. Sigaud-Roussel, axée sur la fonctionnalité du tissu cutané).

3.3.2. Description du projet :

Notre projet a pour objectif de développer une thérapie innovante des plaies profondes, fondée sur l'utilisation de microparticules biocompatibles et biodégradables délivrant des principes actifs, et insérées dans une matrice « support », elle-même porteuse de molécules anti-infectieuses. L'incorporation *in situ* de particules dans la matrice permettra ainsi de guider la colonisation cellulaire tout en maintenant un environnement aseptique et favorisera la cicatrisation rapide des plaies et concourra à la reconstruction d'un derme fonctionnel.

La cicatrisation est un processus physiologique multifactoriel complexe, à composantes cellulaires et biochimiques mobilisées aux diverses étapes de la réparation tissulaire. On décrit en effet trois phases successives dans le processus ordinaire de cicatrisation des plaies et de régénération tissulaire :

1) Durant la phase inflammatoire, 1 à 2 jours après blessure, la plaie est caractérisée par un environnement ischémique riche en bactéries. L'inflammation résulte pour partie de la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées par l'afflux de cellules immunitaires et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β ...). Si ces ROS ont un effet bactéricide bénéfique, leur hypersécrétion a un effet délétère et contribue à aggraver la nécrose tissulaire. Le contrôle de la balance des ROS est donc une cible de choix dans la thérapie des plaies aiguës et chroniques.

2) La phase de reformation tissulaire, dans les 2 à 10 jours, est caractérisée par une migration et une prolifération de différents types cellulaires, notamment de kératinocytes, qui vont participer à la restauration de la fonction de barrière de l'épithélium. On observe une angiogenèse qui, associée à l'afflux de fibroblastes et de macrophages induit la formation d'un tissu de granulation qui va remplacer la matrice de fibrine et servir de substrat à la migration des kératinocytes. A ce niveau, les régulateurs les plus importants de l'angiogenèse sont le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGFA) et le facteur de croissance des fibroblastes (FGF-2). Ces facteurs sont donc des outils de choix pour activer la réparation tissulaire.

3) La phase de remodelage, dans les 2 à 3 semaines, se caractérise par l'élimination et/ou l'apoptose des cellules endothéliales, des macrophages et des myofibroblastes, laissant une masse composée pour l'essentiel de collagène de type III et d'autres protéines de matrice extracellulaire. Dans les 6 à 12 mois, cette matrice acellulaire est remodelée par des métalloprotéinases en une matrice composée essentiellement de collagène de type I. Le tissu ainsi remodelé ne récupère jamais la fonctionnalité du tissu sain initial. Cette étape de remodelage constitue donc une autre cible à privilégier pour la reconstruction d'un derme fonctionnel.

Le présent projet repose donc d'une part sur la « fabrication d'outils thérapeutiques » (*Phase in vitro n'utilisant pas d'animaux mais rappelée ici pour montrer la biocompatibilité des matériaux et molécules utilisés et leur innocuité chez l'animal, et pour la compréhension globale du projet*), d'autre part sur la mise au point et l'utilisation de modèles expérimentaux pour mesurer l'efficacité de ces outils.

Fabrication d'outils thérapeutiques biocompatibles :

A la base, l'outil est constitué de microparticules ($\text{\O} < 200 \text{ nm}$) synthétisées par nano-précipitation à partir d'un polymère de l'acide lactique, l'acide poly-lactique ou PLA. Le PLA est un polymère linéaire et lipophile, issu de ressources renouvelables comme l'amidon de maïs ou la canne à sucre. Ce polymère est biodégradable par hydrolyse des liaisons ester, et métabolisable en acide lactique libre, en dioxyde de carbone et en eau par le cycle de Krebs. Il est déjà utilisé chez l'homme et présente un profil d'innocuité largement référencé qui le positionne comme un polymère de choix pour concevoir des vecteurs

colloïdaux particulières. Il sert, par exemple, à fabriquer des implants biorésorbables pour la chirurgie orthopédique et au traitement des lipoatrophies faciales chez les patients atteints du VIH.

Compte tenu des processus biochimiques et cellulaires de cicatrisation décrits plus haut, un antioxydant ou/et un antibiotique seront encapsulés dans ces particules, pendant la phase de synthèse. L' α -tocopherol (vitamine E) sera utilisé, car c'est l'antioxydant naturel qui est majoritairement mobilisé dans les voies biochimiques des mécanismes de réparation tissulaire. Une molécule d' α -tocopherol peut en effet piéger deux radicaux peroxyde, responsables de la peroxydation lipidique, protégeant ainsi les lipides membranaires de l'oxydation. Il est en outre parfaitement liposoluble, et son encapsulation dans des nanoparticules a déjà été décrite. L'antibiotique sera la ciprofloxacine, fluoroquinolone de seconde génération à large spectre utilisée chez l'homme, dont l'encapsulation a déjà été décrite dans la littérature scientifique. A la surface d'autres particules de PLA, sera adsorbé un facteur de croissance tissulaire, le facteur de croissance des fibroblastes (fibroblast growth factor / FGF-2) évoqué plus haut. Nous avons déjà pour une grande part construits ces outils thérapeutiques.

Efficacité des microparticules « médicalisées »

Après la phase initiale de tests *in vitro*, déjà en grande partie effectués, (taux d'incorporation des molécules thérapeutiques, stabilité, relargage, efficacité sur systèmes cellulaires...), la démonstration de l'efficacité de ces biomatériaux sera effectuée *in vivo*. A cette fin, Deux modèles murins de plaies cutanées profondes seront utilisés, la plaie d'excision et la brûlure thermique. Les études seront menées en parallèle sur un modèle murin d'animaux « normaux » et sur un modèle diabétique. Il est en effet établi que le diabète complique le processus de cicatrisation, et ce modèle nous permettra de mieux mettre en évidence l'effet bénéfique des traitements envisagés.

Notre projet s'articulera donc en deux grandes tâches (et diverses sous-tâches) : Mise au point des modèles expérimentaux (A) et validation *in vivo* de notre outil thérapeutique (B).

A. Mise au point des modèles expérimentaux

1. Choix du modèle murin

Nous utiliserons la souris SKH1-hairless. Cette souche immunocompétente présente l'avantage de s'affranchir des problèmes de dépilation rencontrés avec les souches poilues fréquemment utilisées, notamment l'utilisation de crèmes dépilatoires dont les éventuels effets sur la cicatrisation ne sont pas évalués ni maîtrisables.

2. Plaie cutanée d'excision (Procédure n° 1)

Ce modèle est adapté de celui de Galiano *et al.* (2004) et est décrit de manière détaillée au § 4.2.1.)

3. Plaie de brûlure thermique (Procédure n° 2)

Ce modèle est adapté de celui de Stevens *et al.* (1994) et est décrit de manière détaillée au § 4.2.2.)

4. Modèle de diabète (Procédure n° 3)

Il s'agit d'un diabète chimiquement induit par la streptozocine (décrit au § 4.2.3.)

B. Validation de l'efficacité de l'outil thérapeutique (Procédure n° 4)

Il s'agira de tester *in vivo* l'efficacité des microparticules « médicalisées » dans le processus de cicatrisation et de réparation tissulaire, sur les modèles expérimentaux de plaies cutanées d'excision ou de brûlure, dans un contexte normal ou diabétique (décrit au § 4.2.4.).

3.3.3. Précisez, le cas échéant, la ou les méthodes de mise à mort prévue(s) :

La souris est préalablement anesthésiée, selon les cas, soit par inhalation d'isoflurane, soit par injection d'un mélange kétamine/xylazine. La mise à mort est ensuite réalisée par overdose intracardiaque de thiopental. Cette technique est utilisée comme alternative à la dislocation cervicale car elle permet d'éviter la déformation de la cicatrice et/ou le déchirement du tissu cicatrisé lors des prélèvements cutanés.

3.3.4. Précisez, le cas échéant, les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation concernant la méthode de mise à mort envisagée :

3.3.5. Stratégie d'expérimentation ou d'observation et approche statistique utilisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, la douleur, la souffrance et l'angoisse, infligées et l'impact environnemental, le cas échéant – si une étude statistique est prévue, indiquez et justifiez les tests choisis :

Avant création des plaies cutanées, toutes les souris se verront administrer par voie intra-péritonéale une anesthésie chirurgicale à base de Kétamine (100 mg/kg) (*Imalgène 500*[®]) et de Xylazine (10 mg/kg) (*Rompun*[®] 2%). Ce mélange entraîne une profonde sédation dont les effets durent jusqu'à 120 minutes et une analgésie modérée, durant jusqu'à 30 minutes, suffisante pour protéger l'animal de la douleur pouvant être engendrée par la réalisation de la plaie excisionnelle. Pour une analgésie plus poussée, les animaux recevront en plus une injection sous-cutanée de Buprénorphine (*Temgesic*[®]; 0.3 mg/ml) à raison de 0.05 mg/kg juste avant réalisation de la plaie (J0), et une seconde injection 8 heures plus tard. Les animaux ayant une brûlure thermique recevront des injections supplémentaires de Buprénorphine à J+1, J+2 et J+3, à raison de deux administrations quotidiennes, après réalisation de la plaie. Pour les observations ultérieures, ou interventions légères non invasives, nécessitant une immobilisation des animaux, notamment pour le marquage ou le suivi de l'évolution du diamètre des plaies (mesure et photos), les souris seront maintenues sous légère anesthésie gazeuse à l'isoflurane.

Afin de limiter l'utilisation des animaux dans ce projet, le nombre de souris par expérience a été défini *a minima*, tout en sauvegardant l'interprétabilité statistique des résultats. De 5 à 12 souris selon les expérimentations seront utilisées. Cela nous permettra d'interpréter nos résultats expérimentaux de manière statistiquement significative en utilisant : 1) des tests non paramétriques (*Mann-Whitney*) ou *t de Student* pour les données mesurées (diamètre des plaies, poids, glycémie...), 2) des courbes de survie établies suivant la méthode de *Kaplan-Meier*, et comparées par le *log-rank test* (Prism 6), pour tester l'efficacité *in vivo* des traitements. Afin de démontrer la fiabilité et la reproductibilité des traitements thérapeutiques appliqués aux plaies, les tests utilisés seront répétés deux fois, même en cas de succès au premier essai.

3.4. Les animaux

3.4.1. Justifiez la nécessité d'avoir recours à des animaux pour atteindre les objectifs du projet :

Ce projet concerne l'étude de l'effet de divers traitements sur le processus de cicatrisation cutanée et de réparation tissulaire, en vue de la guérison totale de plaies d'excision ou de brûlure. L'utilisation d'animaux est donc incontournable car une telle étude thérapeutique requiert pour modèle expérimental un système physiologique intégré.

3.4.2. Espèces animales ou types d'animaux utilisés :

Souris (*Mus musculus*)



Rats (*Rattus norvegicus*)



Cobayes (*Cavia porcellus*)



Hamsters (syriens) (*Mesocricetus auratus*)



- Hamsters (chinois) (*Cricetulus griseus*)
- Gerbilles de Mongolie (*Meriones unguiculatus*)
- Autres rongeurs (*Rodentia*)
- Lapins (*Oryctolagus cuniculus*)
- Chats (*Felis catus*)
- Chiens (*Canis familiaris*)
- Furets (*Mustela putorius furo*)
- Autres carnivores (*carnivora*)
- Chevaux, ânes et croisements (*Equidae*)
- Porcs (*Sus scrofa domesticus*)
- Caprins (*Capra aegagrus hircus*)
- Ovins (*Ovis aries*)
- Bovins (*Bos primigenius*)
- Prosimiens (*prosimia*)
- Ouistitis et tamarins (par exemple, *Callithrix jacchus*)
- Singe cynomolgus (*Macaca fascicularis*)
- Singe rhésus (*Macaca mulatta*)
- Vervets *chlorocebus* spp. (généralement soit *pygerythrus*, soit *sabaeus*)
- Babouins (*Papio* spp.)
- Saïmiris (par exemple, *Saimiri sciureus*)
- Autres espèces de primates non humains (autres espèces de *Ceboidea* et *Cercopithecoidea*)
- Singes anthropoïdes (*Hominoidea*)
- Autres mammifères (autres *Mammalia*)
- Poules domestiques (*Gallus gallus domesticus*)
- Autres oiseaux (autres *Aves*)
- Reptiles (*Reptilia*)
- Grenouilles Rana (*Rana temporaria* et *Rana pipiens*)
- Grenouilles Xenopus (*Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis*)
- Autres amphibiens (autres *Amphibia*)
- Poissons zèbres (*Danio rerio*)
- Autres poissons (autres *Pisces*)
- Céphalopodes (*Cephalopoda*)

3.4.3. Justifiez la pertinence de l'(des) espèce(s) animale(s) choisie(s) :

De très nombreuses études sur la thérapie de plaies cutanées rapportées dans la littérature scientifique sur le sujet utilisent la souris comme modèle, outre le rat largement utilisé aussi et, moins souvent, le porc. La souris SKH1, *hairless* mais immunocompétente, est de plus le modèle de choix pour ce type d'étude. Il permet en effet de s'affranchir 1) de l'épilation préalable par rasage, source de potentielle inflammation cutanée superficielle, et surtout, 2) de l'utilisation de crèmes dépilatoires, rapportée dans la majorité des études sur le sujet, mais dont la possible migration transcutanée de divers de leurs composants est susceptible d'interférer de manière non contrôlable avec les processus étudiés.

3.4.4. S'agit-il de spécimens d'espèces menacées énumérées à l'annexe A du règlement (CE) n° 338/97 du Conseil du 9 décembre 1996 relatif à la protection des

espèces de faune et de flore sauvages par le contrôle et leur commerce ?

oui non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces que celles énumérées dans cette annexe :

3.4.5. S'agit-il de spécimens de primates non humains ? oui non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces de primates non humains

3.4.6. S'agit-il d'animaux capturés dans la nature ? oui non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres animaux que ceux capturés dans la nature :

3.4.7. S'agit-il d'animaux d'espèces domestiques, errants ou vivant à l'état sauvage ? oui non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte qu'en utilisant ces animaux.

3.4.8. Catégorie des animaux utilisés dans le projet :

- Animaux tenus en captivité (domestiques ou non domestiques)**
- Animaux non domestiques non tenus en captivité**
- Animaux génétiquement altérés**

Animaux non domestiques non tenus en captivité

- Si les animaux utilisés sont des spécimens d'espèces protégées en application de l'article L. 411-1 du Code de l'environnement, indiquez les références de la dérogation accordée pour effectuer la capture des animaux dans le milieu naturel (4° de l'article L. 411-2 du Code de l'environnement) :**

- Si les animaux utilisés sont des spécimens d'espèces dont la chasse est autorisée, indiquez ici les références de l'autorisation de**

prélèvement accordée pour effectuer la capture des animaux dans le milieu naturel (article L. 424-11 du Code de l'environnement) :

- Justification scientifique montrant que l'objectif de la procédure expérimentale ne peut être atteint en utilisant un animal élevé en vue d'une utilisation dans des procédures expérimentales :

- Animaux génétiquement altérés
 - Animaux génétiquement modifiés oui non
 - Si oui :
 - Création d'une lignée oui non
 - Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation oui non
 - Phénotype non dommageable oui non
 - Phénotype dommageable oui non
 - Souche mutante autre oui non
 - Si oui :
 - Création d'un mutant oui non
 - Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation oui non
 - Phénotype non dommageable oui non
 - Phénotype dommageable oui non

3.4.9. Origine des animaux tenus en captivité :

- Les animaux destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales appartenant aux espèces dont la liste est fixée réglementairement sont-ils élevés à cette fin et proviennent-ils d'éleveurs ou de fournisseurs agréés ? oui non

- Si oui, nombre d'établissements éleveur ou fournisseur agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet :

Etablissement :

- Nom :

- Adresse postale :

- Animaux fournis :

Etablissement :

- Nom :

- Adresse postale :

- Animaux fournis :

- Si non, justifier scientifiquement l'utilisation d'animaux qui ne proviennent pas d'éleveurs ou de fournisseurs agréés :

- Votre propre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ? oui non

- Un autre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ? oui non

- Nombre d'établissements éleveur occasionnel non agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet ?

Etablissement :

- Nom :

- Adresse postale :

- Animaux fournis :

- Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés dans des Etats membres autres que la France fournissant tout ou partie des animaux du projet ?

Etablissement :

Nom de cet éleveur ou fournisseur et pays :

- Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés dans des pays tiers fournissant tout ou partie des animaux du projet ?

Etablissement :

Nom de cet éleveur ou fournisseur et pays :

- **Les animaux sont-ils des animaux réutilisés d'un projet précédent ?**

Oui non

Si oui, veuillez compléter le chapitre 4.3 de ce formulaire.

3.4.10. Nombre estimé d'animaux utilisés dans le projet :

1402

- **Justification de ce nombre pour chacune des espèces animales utilisées :**

Nous avons prévu d'utiliser au total 1402 souris SKH1, dont 442 souris pour la mise au point des modèles de plaie excisionnelle, brûlure thermique et souris diabétiques. Une fois ces modèles établis et maîtrisés, nous envisageons de tester nos biomatériaux médicalisés sur ces modèles. Une première expérimentation avec 425 animaux est nécessaire. Une seconde expérience, avec le même nombre d'animaux, sera envisagée afin de confirmer les résultats (fiabilité et reproductibilité). La justification du nombre d'animaux utilisé à chaque étape est détaillée dans le descriptif de chacune des 4 procédures.

Procédure expérimentale	Nombre de souris
N° 1 Mise au point d'un modèle SKH1 de plaie excisionnelle	82
N° 2 Mise au point d'un modèle SKH1 de brûlure thermique	300
N° 3 Mise au point d'un modèle SKH1 de diabète de type I	60
N° 4 Traitement thérapeutique et étude fonctionnelle	960
Total	1402

3.4.11. Indiquez à quel(s) stade(s) de développement les animaux seront utilisés et le justifier :

Les souris sont utilisées à partir de l'âge de 8 semaines, lorsqu'elles sont matures du point de vue immunitaire.

3.4.12. Indiquez le sexe des animaux utilisés et le justifier :

Nous utiliserons des souris femelles pour éviter les problèmes d'agressivité constatés de manière récurrente avec les mâles. Cette agressivité entre individus entraîne l'apparition d'un stress, mais aussi de blessures se surajoutant à la plaie étudiée, et susceptibles d'interférer avec l'évolution de celle-ci, rendant plus incertaine l'interprétation des observations

3.4.13. Indiquez pour chaque espèce les points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet :

Pendant toute la durée de l'étude, les souris seront surveillées quotidiennement afin d'identifier l'apparition de troubles du comportement, léthargie, prostration, tremblements, dos voûté, pouvant traduire une douleur ou une détresse des animaux, qui seront considérés comme des points limite. Toute éventuelle infection de plaie (rare mais possible) rétive au traitement antibiotique (Ciflox / 72

heures) entraînera la mise à mort des animaux concernés. De même, une perte de poids supérieure à 20% entraînera la sortie des animaux non diabétiques concernés de l'expérience et leur mise à mort. Pour les souris ayant un diabète chimiquement induit, chez lesquelles on observe régulièrement une perte de poids assez importante, de l'ordre de 25% en moyenne, et que l'on peut en partie compenser en donnant à ces animaux affaiblis un accès plus aisé à l'aliment et à l'eau (coupelles au sol vs grille en hauteur). Dans ce cas particulier le point limite est porté à 25% de perte de poids, faute de quoi l'étude n'est pas envisageable sur ce modèle.

4. LES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

4.1 Objet(s) visés par les procédures expérimentales

- A - La recherche fondamentale.
- B - Les recherches transactionnelles ou appliquées menées pour :
- la prévention, la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement de maladies, de mauvais états de santé ou d'autres anomalies ou de leurs effets chez l'homme, les animaux ou les plantes ;
 - l'évaluation, la détection, le contrôle ou les modifications des conditions physiologiques chez l'homme, les animaux ou les plantes ;
 - le bien-être des animaux et l'amélioration des conditions de production des animaux élevés à des fins agronomiques.
- C - L'une des finalités visées au point précédent (B) lors de la mise au point, de la production ou des essais de qualité, d'efficacité et d'innocuité de médicaments à usage humain ou vétérinaire, de denrées alimentaires, d'aliments pour animaux et d'autres substances ou produits.
- D - La protection de l'environnement naturel dans l'intérêt de la santé ou du bien-être de l'homme ou de l'animal.
- E- La recherche en vue de la conservation des espèces.
- F- L'enseignement supérieur, ou la formation professionnelle ou technique conduisant à des métiers qui comportent la réalisation de procédures expérimentales sur des animaux ou les soins et l'entretien de ces animaux, ainsi que la formation professionnelle continue dans ce domaine.
- G - Les enquêtes médico-légales.

4.2 Nombre de procédures expérimentales :

4

4.2.1 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 1 :

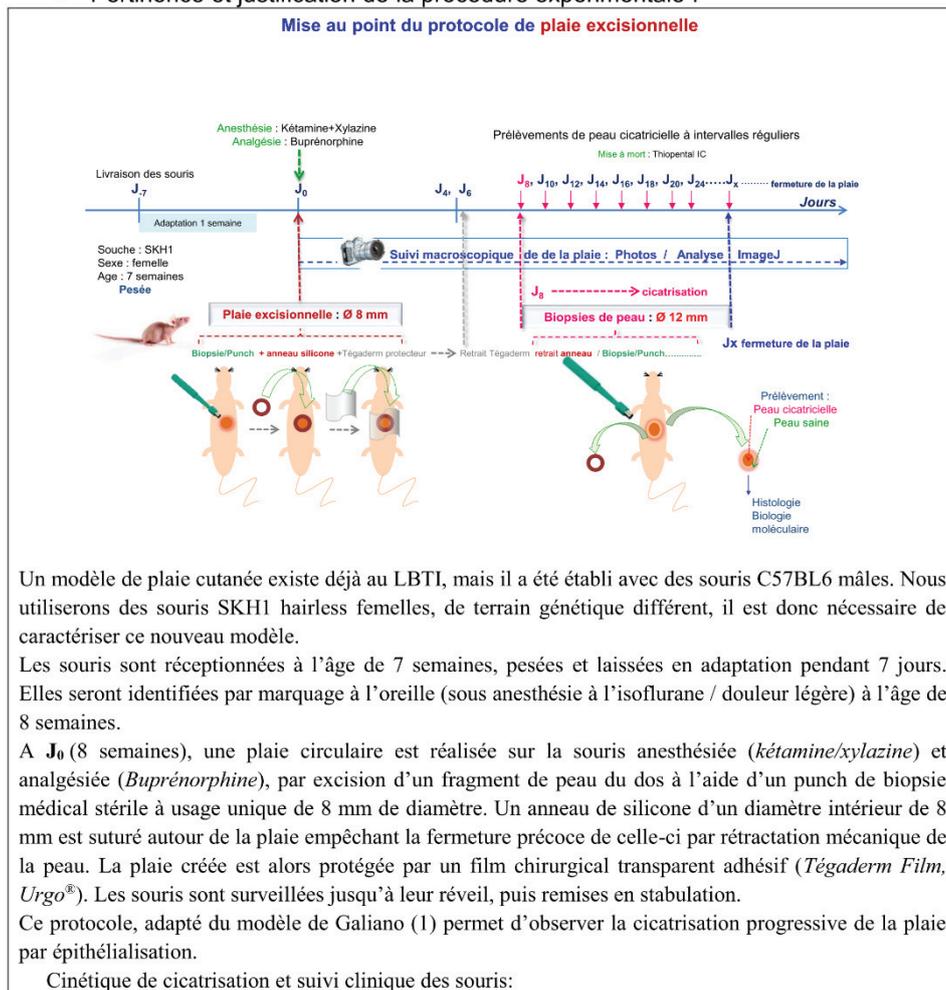
Mise au point d'un modèle de plaie excisionnelle sur souris SKH1 hairless

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

- classe légère
- classe modérée
- classe sévère
- classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :



1) L'aspect clinique de tous les animaux est observé quotidiennement, et les souris sont pesées tous les deux jours.

2) Observation macroscopique : Sur 10 souris identifiées, la fermeture de la plaie est suivie au fil du temps, jusqu'à guérison complète. Tous les 2 jours, l'aspect des plaies est observé et photographié. La surface de plaie non refermée est mesurée à l'aide du logiciel d'analyse d'image ImageJ.

3) Observation microscopique (Histologie): Sur un second lot d'animaux, à intervalles réguliers, de J+8 à J+30, six souris sont mises à mort, et une biopsie cutanée circulaire de 12 mm de diamètre est réalisée autour de la zone de cicatrisation, englobant une marge (2 mm) de tissu non cicatriciel. Ces prélèvements seront traités pour l'analyse histologique de la peau en reconstruction. Diverses colorations histochimiques seront effectuées, permettant l'identification des divers paramètres tissulaires, cellulaires et fibrillaires témoins de la cicatrisation et de la reconstruction du derme (Hématoxyline-Eosine-Safran (HES), Trichrome de Masson var. Goldner (MTG), Rouge Sirius, immunohistochimie [collagènes]). D'autres prélèvements destinés à la biologie moléculaire (mRNA, protéines) seront stockés en azote liquide.

Toutes ces observations et analyses ont pour objectif de caractériser le modèle de plaie excisionnelle cutanée SKH1 qui sera utilisé pour les études de cicatrisation et réparation tissulaire fondée sur l'utilisation de biomatériaux vecteurs de molécules thérapeutiques.

Référence bibliographique :
 Galiano RD, Michaels Jt, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. Wound Repair Regen. (2004) 12:485-492

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

Un total de 82 souris est nécessaire pour cette phase de mise au point, comme détaillé ci-dessous.

Jour	Histologie	Observation macroscopique
		10
J8	6	
10	6	
12	6	
14	6	
16	6	
18	6	
20	6	
22	6	
24	6	
26	6	
28	6	
30	6	
	72	10
Total	82	

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

--

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Avant création des plaies cutanées, toutes les souris se verront administrer par voie intra-péritonéale une anesthésie chirurgicale à base de Kétamine (100 mg/kg) (*Imalgène 500[®]*) et de Xylazine (10 mg/kg) (*Rompun[®] 2%*). Ce mélange entraîne une profonde sédation dont les effets durent jusqu'à 120 minutes et une analgésie modérée, durant jusqu'à 30 minutes, suffisante pour protéger l'animal de la douleur pouvant être engendrée par la réalisation de la plaie excisionnelle. Cependant, pour une analgésie plus poussée et durable, les animaux recevront en plus une injection sous-cutanée de Buprénorphine (*Temgesic[®]; 0.3 mg/ml*) à raison de 0.05 mg/kg x 2 à 8 heures d'intervalle. Pendant toute la durée de l'étude, les souris seront surveillées quotidiennement afin d'identifier l'apparition de troubles du comportement, léthargie, prostration, tremblements, dos vouté, pouvant traduire une douleur ou une détresse des animaux, qui seront considérés comme des points limite. Toute éventuelle infection de plaie (rare mais possible) rétive au traitement antibiotique (Ciflox / 72 heures) entrainera la mise à mort des animaux concernés. De même, une perte de poids supérieure à 20% entrainera la sortie des animaux concernés de l'expérience et leur mise à mort par injection IC de Thiopental. Le milieu de vie des souris est enrichi par l'ajout de feuilles papier à ronger (nids) et d'un abri tubulaire en PVC dans chaque cage.

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Avant création des plaies cutanées, toutes les souris seront anesthésiées par Kétamine - Xylazine et analgésiques par Buprénorphine. Pendant toute la durée de l'étude, les souris seront surveillées quotidiennement afin d'identifier l'apparition de troubles du comportement, léthargie, prostration, tremblements, dos vouté, pouvant traduire une douleur ou une détresse des animaux, qui seront considérés comme des points limite. De même, une perte de poids supérieure à 20% entrainera la sortie des animaux concernés de l'expérience et leur mise à mort par injection IC de Thiopental.

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

- o mise à mort ?
- précisez les animaux concernés :

Tous les animaux sont mis à mort en fin de procédure

- o animal gardé en vie ?

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

- placement ou mise en liberté des animaux ? □
- précisez les animaux concernés :

4.2.2 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 2 :

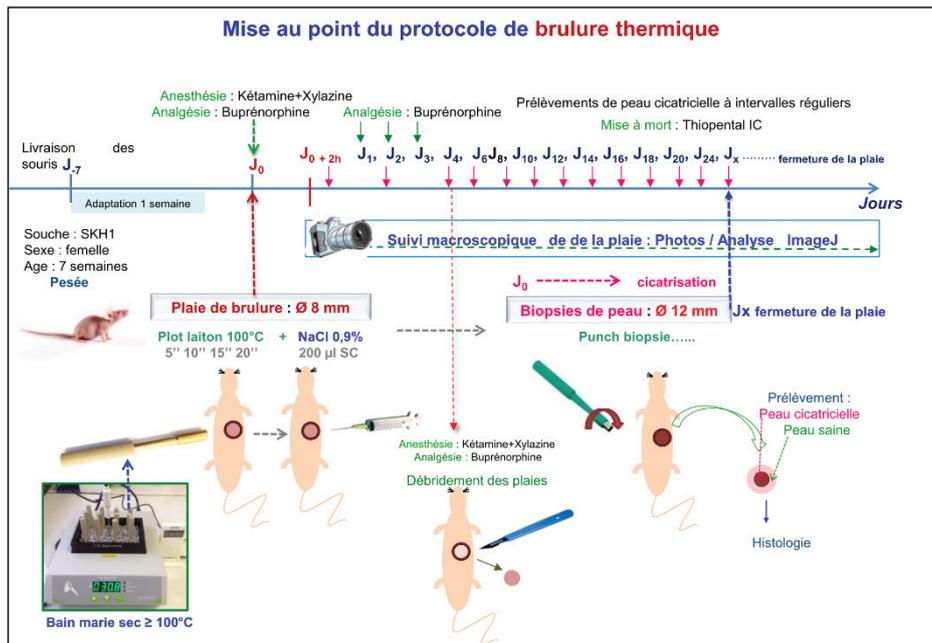
Mise au point d'un modèle de brûlure thermique sur souris SKH1 hairless

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

- classe légère
- classe modérée
- classe sévère
- classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :



Les souris sont réceptionnées à l'âge de 7 semaines, pesées et laissées en adaptation pendant 7 jours. Elles seront identifiées par marquage à l'oreille (sous anesthésie à l'isoflurane / douleur légère) à l'âge de 8 semaines.

A **J₀** (>8 semaines), les souris sont anesthésiées (kétamine + xylazine) et analgésées (Buprénorphine) comme décrit en détail ci-dessous. Une zone du dos de la souris est préalablement désinfectée à l'aide d'un tampon désinfectant. La brûlure est alors induite par application d'un plot de laiton, de section circulaire de 8 mm, préalablement porté à >100°C dans un bain marie sec. Pour tenter d'obtenir un gradient de brûlures de degré différents (1 à 3), divers temps d'application du plot seront testés (5, 10, 15, 20 secondes), à chaque fois sur des souris différentes.

La plaie créée aura une surface (50,24 mm²) équivalente à surface de la plaie réalisée avec un punch de biopsie de 8 mm de diamètre dans le modèle de plaie d'excision cutanée de Galiano *et al.*, 2004.

Immédiatement après la brûlure, on injecte 200 µl de NaCl 0,9% stérile en SC sous la plaie pour réhydrater la peau. Les souris reçoivent une deuxième injection de buprénorphine 8 heures plus tard, puis deux injections/jour à J+1, J+2 et J+3 après brûlure.

A J+4 après brûlure on effectue, sur les souris anesthésiées par le mélange Kétamine/Xylazine, et analgésée à la buprénorphine, un débridement de la plaie (enlèvement de la couche superficielle de fibrine + coagulum) à l'aide d'un scalpel chirurgical stérile. Eventuellement, comme pour la plaie excisionnelle, on posera un anneau silicone et on recouvrira la plaie par un film de Tégaderm®.

Ce protocole de brûlure thermique est adapté du modèle développé par Stevens *et al.* (1), décrit dans Dai *et al.* (2) et Lambrechts *et al.* (3).

Une photo de la brûlure est prise au temps 0. Les souris sont surveillées jusqu'à leur réveil, puis réinstallées en salle d'hébergement.

Cinétique de cicatrisation et suivi clinique des souris:

- 1) L'aspect clinique de tous les animaux est observé quotidiennement, et les souris sont pesées tous les deux jours.
- 2) Observation macroscopique : Pour chaque temps d'application, sur 5 souris identifiées (soit **20** souris), la fermeture de la plaie est suivie tous les deux jours pendant un mois. Pour cela, l'aspect des plaies est observé et photographié. La surface de plaie non refermée est mesurée à l'aide du logiciel d'analyse d'image ImageJ. Le but est d'estimer macroscopiquement quels protocoles de brûlure (de 5 à 20 secondes d'application du plot laiton) vont *a priori* induire : 1) une plaie spontanément cicatrisable, *ie* potentiellement de degré 1 ou 2, 2) une plaie lentement cicatrisable *ie* potentiellement de degré 2 profond ; 3) une plaie non cicatrisable spontanément, *ie* potentiellement de degré 3 ou 3 profond, qui sont les modèles recherchés pour tester l'efficacité thérapeutique de notre système.
- 3) Observation histologique : Afin de : 1) définir précisément au niveau histologique le degré de brûlure réellement obtenu (observable autour du 4^{ème} jour) en fonction du protocole [5 - 20 secondes], 2) en allant jusqu'à l'éventuelle cicatrisation spontanée, estimée à 3 semaines, par analogie avec la plaie d'excision, pour les brûlures les plus légères (5 secondes), 3) mais en allant à plus de trois semaines pour les brûlures plus aigües (10 à 20 sec.) afin de vérifier l'état réel du tissu *post* 3 semaines), sur un second lot d'animaux (**280**), tous les 2 jours de J₀ (h+2) à J+30 (*cf* schéma ci-dessus et tableau ci-dessous), cinq souris sont mises à mort, et une biopsie cutanée circulaire de 12 mm de diamètre est réalisée autour de la zone de brûlure, englobant une marge (2 mm) de tissu sain non brûlé. Ces prélèvements seront traités pour l'analyse histologique de la peau en reconstruction. Diverses colorations histochimiques seront effectuées, permettant l'identification

des divers paramètres tissulaires, cellulaires et fibrillaires témoins de la cicatrisation et de la reconstruction du derme (Hématoxyline-Eosine-Safran (HES), Trichrome de Masson var. Goldner (MTG), Rouge Sirius, immunohistochimie [collagènes]). D'autres prélèvements destinés à la biologie moléculaire (mRNA, protéines) seront stockés en azote liquide.

Toutes ces observations et analyses ont pour objectif de caractériser sur une base histologique le modèle de brûlure thermique cutanée (notamment par la définition de différents grades obtenus en fonction du temps d'application du plot laiton), qui sera utilisé pour les études de cicatrisation et réparation tissulaire fondée sur l'utilisation de biomatériaux vecteurs de molécules thérapeutiques.

Références bibliographiques :

- (1) Stevens, E., Ryan, C., Friedberg, J., Barnhill, R., Yarmush, M., and Tompkins, R. A quantitative model of invasive Pseudomonas infection in burn injury. The Journal of burn care & rehabilitation 15, 232, 1994.
- (2) Dai, T., Kharkwal, G., Tanaka, M., Huang, Y.-Y., Bil de Arce, V., and Hamblin, M. Animal models of external traumatic wound infections. Virulence 2, 296, 2011.
- (3) Lambrechts, S., Demidova, T., Aalders, M., Hasan, T., and Hamblin, M. Photodynamic therapy for Staphylococcus aureus infected burn wounds in mice. Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology 4, 503, 2005.

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

Un total de **300** souris est nécessaire pour cette phase de mise au point, comme détaillé ci-dessous. Cinq souris par lot seront utilisées à chaque temps pour permettre la réalisation de tous les prélèvements nécessaires aux analyses prévues. Les effets de la brûlure évoluant en s'amplifiant les premiers jours, il est nécessaire d'effectuer des prélèvements quotidiens dès les premiers jours.

Jour	Temps d'application du plot					Total Histologie	Observation macroscopique
	5''	10''	15''	20''	-		
J0+2h	5	5	5	5	-	20	5 souris x 4 temps
J2	5	5	5	5	-	20	
J4	5	5	5	5	-	20	
J6	5	5	5	5	-	20	
J8	5	5	5	5	-	20	
J10	5	5	5	5	-	20	
J12	5	5	5	5	-	20	
J14	5	5	5	5	-	20	
J16	5	5	5	5	-	20	
J18	5	5	5	5	-	20	
J20	5	5	5	5	-	20	
J22	5	5	5	5	-	20	
J24	-	5	5	5	-	15	
J26	-	-	5	5	-	10	
J28	-	-	5	5	-	10	
J30	-	-	-	5	-	5	
	Total					280	20
Total						300	

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

Sur le lot de 280 animaux, tous les 2 jours de J0 (h+2) à J+30 (cf schéma et tableau ci-dessus), cinq souris sont mises à mort, et une biopsie cutanée circulaire de 12 mm de diamètre est réalisée autour de la zone de brûlure, englobant une marge (2 mm) de tissu sain non brûlé. Ces prélèvements seront traités pour l'analyse histologique de la peau en reconstruction.

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'anxiété (liste des médicaments - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Avant création de la plaie de brûlure, toutes les souris se verront administrer par voie intra-péritonéale une anesthésie chirurgicale à base de Kétamine (100 mg/kg) (*Imalgène 500*[®]) et de Xylazine (10 mg/kg) (*Rompun*[®] 2%). Ce mélange entraîne une profonde sédation dont les effets durent jusqu'à 120 minutes et une analgésie modérée, durant jusqu'à 30 minutes, protégeant l'animal de la douleur pendant la réalisation de la plaie. Pour une analgésie plus poussée et durable, les animaux recevront en plus une injection sous-cutanée de Buprénorphine (*Temgesic*[®]; 0.3 mg/ml) à raison de 0.05 mg/kg juste avant réalisation de la plaie (J0), puis à J+1, J+2 et J+3 après réalisation de la plaie. A chaque jour d'analgésie on administre deux doses de buprénorphine à 8 heures d'intervalle. Juste après la brûlure, 200 µl de sérum physiologique stérile seront administrés par voie sous-cutanée, sous la plaie, pour réhydratation du tissu.

Pendant toute la durée de l'étude, les souris seront surveillées quotidiennement afin d'identifier l'apparition de troubles du comportement, léthargie, prostration, tremblements, dos voûté, pouvant traduire une douleur ou une détresse des animaux, qui seront considérés comme des points limite.

Toute éventuelle infection de plaie (rare mais possible) rétive au traitement antibiotique (Ciflox / 72 heures) entrainera la mise à mort des animaux concernés. De même, une perte de poids supérieure à 20% entrainera la sortie des animaux concernés de l'expérience et leur mise à mort.

Le milieu de vie des souris est enrichi par l'ajout de feuilles papier à ronger (nids) et d'un abri tubulaire en PVC dans chaque cage.

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Avant création de la plaie de brûlure, toutes les souris seront anesthésiées par Kétamine + Xylazine et analgésiées par Buprénorphine. L'analgésie sera répétée à J+1, J+2 et J+3 après réalisation de la plaie.

Pendant toute la durée de l'étude, les souris seront surveillées quotidiennement afin d'identifier l'apparition de troubles du comportement, léthargie, prostration, tremblements, dos voûté, pouvant traduire une douleur ou une détresse des animaux, qui seront considérés comme des points limite. De même, une perte de poids supérieure à 20% entrainera la sortie des animaux concernés de l'expérience et leur mise à mort.

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

mise à mort ?



précisez les animaux concernés :

Tous les animaux seront mis à mort en fin de procédure

animal gardé en vie ?



précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

placement ou mise en liberté des animaux ?



précisez les animaux concernés :

4.2.3 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 3 :

Mise au point d'un modèle de souris diabétique de type I sur souris SKH1

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

classe légère

classe modérée

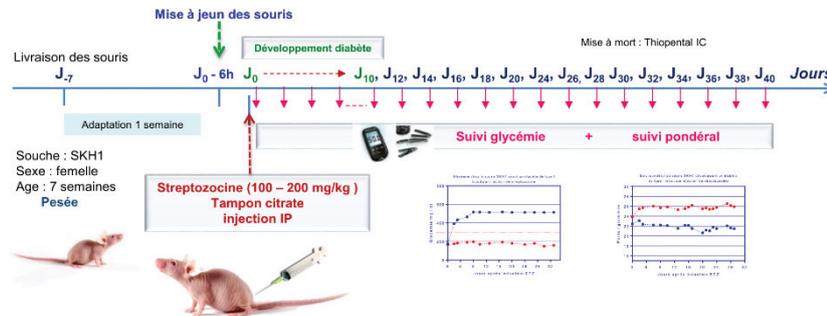
classe sévère

classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

Mise au point du protocole d'induction chimique de diabète de type I



Les effets des inducteurs chimiques de diabète expérimentaux varient en fonction de l'espèce animale utilisée, de la race, de la souche mais aussi de l'âge, du poids et du sexe. Les effets diabétogènes de la streptozocine ont déjà fait l'objet d'essais au LBTI. Mais il s'agissait de souris C57BL/6 de sexe mâle. Nous utiliserons des souris SKH1 de sexe femelle pour toutes les raisons explicitées plus haut, et il est donc nécessaire de reprendre cette étude.

Les souris sont réceptionnées à l'âge de 7 semaines, pesées et laissées en adaptation pendant 7 jours. Elles seront identifiées par marquage à l'oreille (sous anesthésie à l'isoflurane / douleur légère) à l'âge de 8 semaines.

A l'âge de > 8 semaines, cinq groupes de douze souris sont constitués, correspondant aux cinq concentrations de streptozocine testées (0, 100, 150, 175, 200 mg/kg).

A J₀, six heures avant l'injection de l'inducteur chimique les souris sont mises à jeun en les privant d'accès à l'aliment. A h+6, les souris sont alors pesées, et la glycémie de départ est mesurée à l'aide d'un lecteur de glycémie à bandelettes (Roche Diagnostics®) en pratiquant une petite incision indolore, à la pointe d'un scalpel stérile, au niveau de la veine de la queue de la souris.

La streptozocine (STZ) induit un diabète de type I à dose unique élevée chez la souris. Nous utiliserons la forme médicamenteuse (ZANOSAR®), utilisée à d'autres fins à l'hôpital, qui contient la molécule de streptozocine cristallisée, et de l'acide citrique anhydre, à reprendre en eau pour injection. Cette forme est donc strictement identique au principe actif (streptozocine) disponible chez certains fournisseurs de réactifs biologiques, qui doit être diluée dans du tampon citrate 0.09M pH 4.8. Elle est injectée par voie intrapéritonéale. *Ce produit étant très toxique (notamment cancérigène puissant) sa préparation (pesée et dilution) requiert une attention particulière et le port d'EPI adaptés (blouse, gants, masque respiratoire). Une signalétique de sécurité est affichée en salle d'hébergement.*

La STZ est injectée en une seule fois par voie IP aux quatre concentrations testées (100, 150, 175, 200 mg/kg). Un groupe de souris contrôle reçoit une solution de tampon citrate 0.09M pH 4.8 solvant de la STZ. Les souris sont remises en salle d'hébergement et l'accès à la nourriture est facilité pour limiter la perte de poids généralement constatée après traitement à la STZ.

Quotidiennement de J1 à J5, **puis tous les 2 jours de J8 à J40**. : Suivi de la glycémie et du poids pendant > un mois comme indiqué dans le schéma ci-dessus, afin de vérifier la stabilité du diabète induit. Les souris développant une glycémie stable ≥ 300 mg/dl, vs ± 150 mg/dl en moyenne pour des souris normales, seront considérées comme diabétiques. Nous utilisons 12 souris par groupe, car une grande variation interindividuelle est généralement observée lors de ces traitements. L'objectif de cette procédure est : 1) de déterminer la concentration optimale de STZ, c'est à dire la concentration minimale induisant un diabète significatif stable (Glycémie > 300 mg/dl) avec le moins d'effets secondaires possible (perte de poids drastique notamment), 2) de déterminer le délai d'obtention de l'état diabétique stable (plateau), 3) d'utiliser ce protocole d'induction de diabète dans les deux modèles de plaie cutanée, excision et brûlure thermique, envisagés dans notre étude. Les individus diabétiques cicatrisent difficilement, et ces modèles permettront de tester l'étendue de l'efficacité de nos biomatériaux « médicalisés ».

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

Nous utiliserons 60 souris :

Concentration STZ	Nombre d'animaux
0	12
100	12
150	12
175	12
200	12
Total	60

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

La glycémie est mesurée, chaque jour les 5 premiers jours, puis tous les deux jours en suite jusqu'à 40 jours post-induction, par prélèvement d'une goutte de sang au niveau de la veine de la queue. A cette fin, une légère incision est effectuée à l'aide d'une pointe de scalpel stérile.

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Pendant toute la durée de l'étude, les souris seront surveillées quotidiennement afin d'identifier l'apparition de troubles du comportement, léthargie, prostration, tremblements, dos vouté, pouvant traduire une douleur ou une détresse des animaux, qui seront considérés comme des points limite. Leur poids sera particulièrement surveillé, car chez les souris ayant un diabète chimiquement induit élevé, on observe souvent une perte de poids importante, pouvant parfois atteindre 25%. Ce seuil sera, dans le cas précis du modèle diabétique, retenu comme point limite. Un traitement par insuline est possible, mais est susceptible de biaiser les résultats attendus. L'accès facilité de l'aliment et de l'eau de boisson (disposés dans des coupelles et changés chaque jour) a montré qu'il évite une perte de poids trop importante chez les animaux affaiblis, et entraîne en 2-3 jours un gain de poids de plusieurs grammes (2-4) chez les souris les plus amaigries. Une perte de poids supérieure à 25% entraînera la sortie des animaux concernés de l'expérience et leur mise à mort. Le milieu de vie des souris est enrichi par l'ajout de feuilles papier à ronger (nids) et d'un abri tubulaire en PVC dans chaque cage.

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

- mise à mort ?

précisez les animaux concernés :

- animal gardé en vie ?

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

- placement ou mise en liberté des animaux ?

précisez les animaux concernés :

4.2.4 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 4 :

Traitements chez la souris SKH1 de plaies cutanées profondes, d'excision ou de brûlure, par des nanomatériaux vecteurs de molécules thérapeutiques. Exploration de la reconstruction tissulaire par des analyses histologiques et histochimiques, et par des mesures physiologiques de la fonctionnalité de la peau.

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

- classe légère
- classe modérée
- classe sévère
- classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

Cette procédure sera réalisée en parallèle sur souris saines et sur souris diabétiques.
 Les souris sont réceptionnées à l'âge de 7 semaines, pesées et laissées en adaptation pendant 7 jours.
 Elles seront identifiées par marquage à l'oreille (sous anesthésie à l'isoflurane / douleur légère) à l'âge de 8 semaines.

A l'âge de > 8 semaines, les animaux sont allotés aléatoirement et des groupes sont constitués.

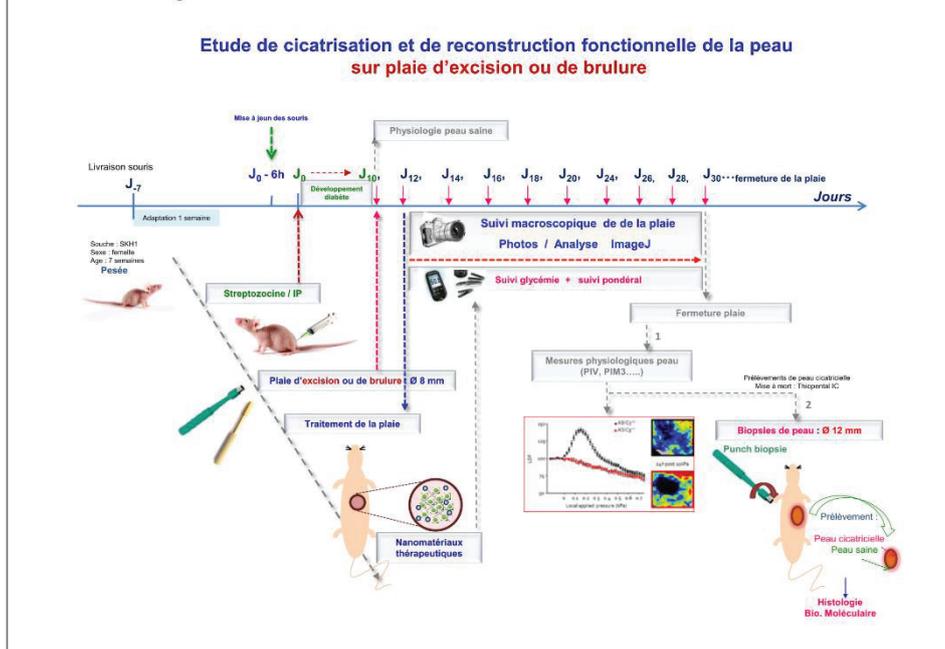
200 souris seront rendues diabétiques par injection unique par voie IP de STZ, à la concentration optimale définie dans la procédure 3. Les 200 autres animaux (« contrôles ») recevront une injection IP de tampon citrate (solvant de la STZ).

Les souris qui ne développeront pas de diabète seront sorties du lot et mises à mort.

Après Y jours, correspondant au temps d'atteinte du plateau d'hyperglycémie déterminé dans la procédure 3, toutes les souris devenues diabétiques (STZ) et les animaux contrôles non diabétiques (citrate) sont mis en expérimentation. Ils subissent alors soit une plaie d'excision, soit une plaie de brûlure (de degré 2+ spontanément lentement cicatrisable, ou de degré 3 non spontanément cicatrisable, tels que définis dans la procédure 2), selon les protocoles décrits dans les procédures 1 et 2 respectivement.

Les traitements thérapeutiques seront ensuite appliqués par voie topique, directement sur la plaie. Ils sont fondés sur l'utilisation de nanomatériaux (nano particules ou/et nanofibres) « chargés » de molécules thérapeutiques 1) favorisant la ré-épithélialisation de la peau (facteur de croissance des fibroblastes / FGF-2), ou 2) atténuant les effets délétères de l'inflammation (antioxydant / vitamine E) ou 3) protégeant la plaie des infections potentielles / antibiotique ou antiseptique). Ces molécules étant utilisées seules ou de manière simultanée.

Le rationnel de la procédure est décrit dans le schéma ci-dessous.



Pour mesurer l'efficacité des traitements sur la cicatrisation et la reconstruction fonctionnelle, plusieurs approches sont envisagées :

- Pour l'analyse de revascularisation du derme, l'exploration de la microcirculation sanguine sera réalisée après anesthésie des animaux. Trois mesures physiologiques seront effectuées pour évaluer la fonctionnalité de la peau reconstruite (à \geq J30 après traitement) vs la peau saine :
 - 1) La PIV (Pressure Induced Vasodilatation) mesurant la fonction neurovasculaire de la peau ; puis deux tests pharmacologiques : 2) la iontophorèse ACh (mesurant la fonctionnalité des cellules endothéliales vasculaires) et 3) la iontophorèse SNP (mesurant la fonctionnalité des muscles lisses vasculaires).
 Pour affiner l'étude de revascularisation, la microcirculation cutanée sera évaluée par mesure laser-Doppler (PeriScan PIM3).
- Ces tests sont non invasifs et indolores, et ne requièrent l'anesthésie des animaux que dans un but d'immobilisation nécessaire à la bonne qualité des enregistrements. Pendant toute la durée de ces mesures, les animaux anesthésiés sont maintenus sur un tapis thermostaté afin de stabiliser leur température cutanée à $34 \pm 0,2^\circ\text{C}$, mesurée à l'aide d'une sonde cutanée reliée à un thermocouple [Model BAT-12, Physitemp Instruments INC, Clifton, USA].
- Pour évaluer la cinétique de cicatrisation, sur les souris anesthésiées par l'isoflurane, les plaies seront observées et photographiées tous les 2 jours jusqu'à guérison complète. La surface de plaie non refermée sera mesurée à l'aide du logiciel d'analyse d'image ImageJ. Ce test est non invasif et indolore, et ne requière l'anesthésie des animaux que dans un but d'immobilisation nécessaire à la bonne qualité des enregistrements.
- Pour analyser et évaluer la reconstruction tissulaire du derme, une biopsie de peau de 12 mm de diamètre, plus large que la plaie initiale afin d'englober du tissu sain périphérique, sera réalisée au niveau de la zone cicatrisée, selon le protocole décrit dans les procédures 1 et 2. Elle sera traitée à des fins d'analyse histologique ou moléculaire, comme décrit dans les procédures 1 et 2. Ces prélèvements permettront l'analyse de l'architecture du derme reconstruit par le biais d'observations cyto-histologiques (cellules, fibres, vaisseaux sanguins), histochimiques et immunofluorescence (facteurs sécrétés, récepteurs cellulaires) ou moléculaires (protéines / western blots ; RNAs / RT-PCR).

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

Les lots seront constitués comme décrit dans le tableau suivant.

Souris	Pré-traitement des animaux	Plaie	Traitements des plaies									
			PBS (cicatrisation spontanée)	NPs nues	Matrice nue	NPs:FGF2	NPs:VitE	NPs:FGF2:VitE	FGF2	VitE	FGF2+VitE	Matrice+NPs:FGF2:VitE
SKHI	Streptozocin	Excision	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Brûlure degré 2	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Brûlure degré 3	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Tampon Citrate	Excision	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Brûlure degré 2	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Brûlure degré 3	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Sous-totaux lots			48	48	48	48	48	48	48	48	48	
Total manip			480									
Total général (répétition manip)			960									

Les lots seront de 8 animaux afin d'assurer au mieux la significativité des résultats obtenus, tout en permettant une gestion contrôlée des lots en expérimentation. L'efficacité des traitements ne sera en effet pas objectivée totalement par la mesure de constantes biologiques ou de paramètres exactement quantifiés

(paramètres physiologiques), mais aussi par l'évolution qualitative des plaies (observations histologiques) et/ou leur évolution relative (cinétique de cicatrisation des plaies traitées vs plaies non traitées, des plaies d'animaux diabétiques vs animaux normaux...etc..). L'expérimentation sera répétée une fois afin de s'assurer de la fiabilité et de la reproductibilité des résultats.

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

Avant la réalisation des plaies, des tests de physiologie de peau témoin (PIV, Ach, SNP et PIM3) seront effectués sur souris saines et diabétiques à J+10 post STZ.
 Chez les animaux traités à la STZ, la glycémie sera mesurée à J0, J5 et J10 puis une fois par semaine ensuite jusqu'à 30 jours post-induction, par prélèvement d'une goutte de sang au niveau de la veine de la queue. A cette fin, une légère incision est effectuée à l'aide d'une pointe de scalpel stérile.
 Trois semaines environ après réalisation des plaies cutanées ($ie \geq J+30$ après le début de l'expérimentation (*administration STZ*)), tous les animaux seront

- 1) Anesthésiés par un mélange Kétamine / Xylazine comme décrit dans les procédures 1 et 2, et soumis aux tests physiologiques de fonctionnalité de la peau,
- 2) Puis mis à mort par injection IC de thiopental. Les prélèvements cutanés seront alors effectués comme indiqué dans les procédures 1 et 2 aux fins d'analyses histologiques.

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Avant création de la plaie d'excision ou de brûlure, toutes les souris se verront administrer par voie intrapéritonéale une anesthésie chirurgicale à base de Kétamine (100 mg/kg) (*Imalgène 500[®]*) et de Xylazine (10 mg/kg) (*Rompun[®] 2%*). Ce mélange entraîne une profonde sédation dont les effets durent jusqu'à 120 minutes et une analgésie modérée, durant jusqu'à 30 minutes, protégeant l'animal de la douleur pendant la réalisation de la plaie. Pour une analgésie plus poussée et durable, les animaux recevront en plus une injection sous-cutanée de Buprénorphine (*Temgesic[®]; 0.3 mg/ml*) à raison de 0.05 mg/kg juste avant réalisation de la plaie (J0), avec un rappel à + 8 heures, puis à J+1, J+2 et J+3, deux fois par jour, après réalisation de la plaie pour les animaux ayant une plaie de brûlure. Juste après la brûlure, 200 µl de sérum physiologique stérile seront administrés par voie sous-cutanée, sous la plaie, pour réhydratation du tissu.
 Pendant toute la durée de l'étude, les souris seront surveillées quotidiennement afin d'identifier l'apparition de troubles du comportement, léthargie, prostration, tremblements, dos voûté, pouvant traduire une douleur ou une détresse des animaux, qui seront considérés comme des points limite.
 Toute éventuelle infection de plaie (rare mais possible) rétive au traitement antibiotique (Ciflox / 72 heures) entrainera la mise à mort des animaux concernés. De même, une perte de poids supérieure à 20% pour les souris non diabétique et 25% pour les souris diabétiques entrainera la sortie des animaux concernés de l'expérience et leur mise à mort. Le milieu de vie des souris est enrichi par l'ajout de feuilles papier à ronger (nids) et d'un abri tubulaire en PVC dans chaque cage.

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

En fin de procédure les animaux seront mis à mort par injection IC de Thiopental

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

- o mise à mort ?

précisez les animaux concernés :

- o animal gardé en vie ?

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

- o placement ou mise en liberté des animaux ?

précisez les animaux concernés :

4.3. Si le projet utilise des animaux réutilisés d'un projet antérieur :

- GRAVITÉ RÉELLE DES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES ANTÉRIEURES :

- légère
- modérée
- sévère

Précisez les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation pour autant que les animaux n'aient pas été utilisés plus d'une fois dans une procédure expérimentale entraînant une douleur intense, de l'angoisse ou une souffrance équivalente :

- Effet cumulatif de cette réutilisation sur les animaux :

- L'avis vétérinaire est-il favorable en prenant en considération le sort de l'animal concerné sur toute sa durée de vie ? **Ooui Onon**

- L'animal réutilisé a-t-il pleinement recouvré son état de santé et de bien-être général ? **Ooui Onon**

4.4. Cas particulier des projets contenant une procédure expérimentale impliquant une douleur, une angoisse ou une souffrance sévère et susceptible de se prolonger sans qu'il soit possible de les soulager

- De quelle(s) procédure(s) expérimentale(s) du projet s'agit-il ?

- Justifiez scientifiquement les raisons à l'origine d'une demande de dérogation :

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier*. Exp Dermatol, 2008. **17**(12): p. 1063-72.
2. Eckert, R.L., *Structure, function, and differentiation of the keratinocyte*. Physiol Rev, 1989. **69**(4): p. 1316-46.
3. Downey, J.A., C.E. Huckaba, and R.C. Darling, *The effect of skin and central cooling on human thermoregulation*. Int J Biometeorol, 1971. **15**(2): p. 171-5.
4. Bangert, C., P.M. Brunner, and G. Stingl, *Immune functions of the skin*. Clin Dermatol, 2011. **29**(4): p. 360-76.
5. Delmas, P., J. Hao, and L. Rodat-Despoix, *Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(3): p. 139-53.
6. Voets, T., et al., *The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels*. Nature, 2004. **430**(7001): p. 748-54.
7. Holick, M.F., *Vitamin D: A millenium perspective*. J Cell Biochem, 2003. **88**(2): p. 296-307.
8. Avram, A.S., M.M. Avram, and W.D. James, *Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue*. J Am Acad Dermatol, 2005. **53**(4): p. 671-83.
9. Boulais, N. and L. Misery, *The epidermis: a sensory tissue*. Eur J Dermatol, 2008. **18**(2): p. 119-27.
10. Senoo, M., *Epidermal Stem Cells in Homeostasis and Wound Repair of the Skin*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2013. **2**(6): p. 273-282.
11. Eckhart, L., et al., *Cell death by cornification*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(12): p. 3471-80.
12. Debeer, S., et al., *Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin*. Eur J Dermatol, 2013. **23**(4): p. 456-66.
13. Lin, J.Y. and D.E. Fisher, *Melanocyte biology and skin pigmentation*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 843-50.
14. Boulais, N. and L. Misery, *Merkel cells*. J Am Acad Dermatol, 2007. **57**(1): p. 147-65.
15. Xiao, Y., J.S. Williams, and I. Brownell, *Merkel cells and touch domes: more than mechanosensory functions?* Exp Dermatol, 2014. **23**(10): p. 692-5.
16. Clausen, B.E. and J.M. Kel, *Langerhans cells: critical regulators of skin immunity?* Immunol Cell Biol, 2010. **88**(4): p. 351-60.
17. Lopez, O., et al., *New arrangement of proteins and lipids in the stratum corneum cornified envelope*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(3): p. 521-9.

Références bibliographiques

18. Fischer, J. and U. Meyer-Hoffert, *Regulation of kallikrein-related peptidases in the skin - from physiology to diseases to therapeutic options*. Thromb Haemost, 2013. **110**(3): p. 442-9.
19. Prost-Squarcioni, C., et al., *[Functional histology of dermis]*. Ann Dermatol Venereol, 2008. **135**(1 Pt 2): p. 1S5-20.
20. Singer, A.J. and R.A. Clark, *Cutaneous wound healing*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 738-46.
21. Gurtner, G.C., et al., *Wound repair and regeneration*. Nature, 2008. **453**(7193): p. 314-21.
22. Paul Richard Wheater, et al., *Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater*. Organes et appareils, Chapitre 9: PEAU, ed. D.B. Supérieur. 2015. 455.
23. Gray, R. *Blessures de guerre: Principes de prise en charge chirurgicale*. Blessures de guerre : principes de prise en charge chirurgicale : principes et pratiques de la prise en charge chirurgicale de plaies produites par des missiles ou des explosions 1994 31 décembre 1994]; Available from: <https://shop.icrc.org/icrc/pdf/view/id/156>.
24. T. Leclerc, et al., *Brûlures en situation opérationnelle: description et épidémiologie*. Médecine et armées, 2015. **43**(2): p. 133-138.
25. Renz, E.M. and L.C. Cancio, *Acute burn care. Chapter 12*. Combat Casualty Care: Lessons Learned From OEF and OIF, 2012: p. 593-638.
26. Monstrey, S., et al., *Assessment of burn depth and burn wound healing potential*. Burns, 2008. **34**(6): p. 761-9.
27. A. Cirodde, et al., *Prise en charge du brûlé de guerre à l'avant*. Médecine et armées, 2015. **43**(2): p. 139-148.
28. Jackson, D.M., *[The diagnosis of the depth of burning]*. Br J Surg, 1953. **40**(164): p. 588-96.
29. Evers, L.H., D. Bhavsar, and P. Mailander, *The biology of burn injury*. Exp Dermatol, 2010. **19**(9): p. 777-83.
30. Berthet, M., et al., *Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment?* Trends Biotechnol, 2017. **35**(8): p. 770-784.
31. Pereira, R.F. and P.J. Bartolo, *Traditional Therapies for Skin Wound Healing*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2016. **5**(5): p. 208-229.
32. Werner, S. and R. Grose, *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines*. Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 835-70.
33. Auf dem Keller, U., et al., *Reactive oxygen species and their detoxification in healing skin wounds*. J Investig Dermatol Symp Proc, 2006. **11**(1): p. 106-11.
34. Shechter, R. and M. Schwartz, *CNS sterile injury: just another wound healing?* Trends Mol Med, 2013. **19**(3): p. 135-43.
35. Middelkoop, E., et al., *Porcine wound models for skin substitution and burn treatment*. Biomaterials, 2004. **25**(9): p. 1559-67.

Références bibliographiques

36. Dai, T., et al., *Animal models of external traumatic wound infections*. Virulence, 2011. **2**(4): p. 296-315.
37. Gaines, C., et al., *Development of a porcine deep partial thickness burn model*. Burns, 2013. **39**(2): p. 311-9.
38. Tory P. Sullivan, M., et al., *The pig as a model for human wound healing*. Wound repair and regeneration 2001. **9**(2): p. 66–76.
39. Wong, V.W., et al., *Surgical approaches to create murine models of human wound healing*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 969618.
40. Lau, K., et al., *Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing*. Exp Dermatol, 2009. **18**(11): p. 921-33.
41. Blanpain, C., *Stem cells: Skin regeneration and repair*. Nature, 2010. **464**(7289): p. 686-7.
42. Grose, R. and S. Werner, *Wound healing studies in transgenic and knockout mice. A review*. Methods Mol Med, 2003. **78**: p. 191-216.
43. Fang, R.C. and T.A. Mustoe, *Animal models of wound healing: utility in transgenic mice*. J Biomater Sci Polym Ed, 2008. **19**(8): p. 989-1005.
44. David M. Ansell, Kirsty A. Holden, and M.J. Hardman, *Animal models of wound repair: Are they cutting it?* Experimental Dermatology: Viewpoint, 2012. **21**: p. 581–585.
45. Benavides, F., et al., *The hairless mouse in skin research*. J Dermatol Sci, 2009. **53**(1): p. 10-8.
46. Konger, R.L., et al., *Comparison of the acute ultraviolet photoresponse in congenic albino hairless C57BL/6J mice relative to outbred SKH1 hairless mice*. Exp Dermatol, 2016. **25**(9): p. 688-93.
47. Davidson, J.M., *Animal models for wound repair*. Arch Dermatol Res, 1998. **290** Suppl: p. S1-11.
48. Wang, X., et al., *The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation*. Nat Protoc, 2013. **8**(2): p. 302-9.
49. Mendoza-Garcia, J., et al., *Optimization of an ex vivo wound healing model in the adult human skin: Functional evaluation using photodynamic therapy*. Wound Repair Regen, 2015. **23**(5): p. 685-702.
50. Xie, Y., et al., *Development of a three-dimensional human skin equivalent wound model for investigating novel wound healing therapies*. Tissue Eng Part C Methods, 2010. **16**(5): p. 1111-23.
51. Marx, U., et al., *'Human-on-a-chip' developments: a translational cutting-edge alternative to systemic safety assessment and efficiency evaluation of substances in laboratory animals and man?* Altern Lab Anim, 2012. **40**(5): p. 235-57.
52. Planz, V., C.M. Lehr, and M. Windbergs, *In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery*. J Control Release, 2016. **242**: p. 89-104.

Références bibliographiques

53. Chigurupati, S., et al., *Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes, fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing*. *Biomaterials*, 2013. **34**(9): p. 2194-201.
54. Fumakia, M. and E.A. Ho, *Nanoparticles Encapsulated with LL37 and Serpin A1 Promotes Wound Healing and Synergistically Enhances Antibacterial Activity*. *Mol Pharm*, 2016. **13**(7): p. 2318-31.
55. Frankova, J., et al., *Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model*. *J Appl Biomater Funct Mater*, 2016. **14**(2): p. e137-42.
56. Krausz, A.E., et al., *Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent*. *Nanomedicine*, 2015. **11**(1): p. 195-206.
57. Leu, J.G., et al., *The effects of gold nanoparticles in wound healing with antioxidant epigallocatechin gallate and alpha-lipoic acid*. *Nanomedicine*, 2012. **8**(5): p. 767-75.
58. Chereddy, K.K., et al., *Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity*. *J Control Release*, 2013. **171**(2): p. 208-15.
59. Moreno, E., et al., *Assessment of beta-lapachone loaded in lecithin-chitosan nanoparticles for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis in L. major infected BALB/c mice*. *Nanomedicine*, 2015. **11**(8): p. 2003-12.
60. Chereddy, K.K., et al., *PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing*. *J Control Release*, 2014. **194**: p. 138-47.
61. Boonkaew, B., et al., *Cytotoxicity testing of silver-containing burn treatments using primary and immortal skin cells*. *Burns*, 2014. **40**(8): p. 1562-9.
62. Chereddy, K.K., et al., *Combined effects of PLGA and vascular endothelial growth factor promote the healing of non-diabetic and diabetic wounds*. *Nanomedicine*, 2015. **11**(8): p. 1975-84.
63. Sun, T., et al., *Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents*. *J Biotechnol*, 2006. **122**(3): p. 372-81.
64. Mak, V.H., et al., *Barrier function of human keratinocyte cultures grown at the air-liquid interface*. *J Invest Dermatol*, 1991. **96**(3): p. 323-7.
65. Wiegand, C., et al., *Dermal xenobiotic metabolism: a comparison between native human skin, four in vitro skin test systems and a liver system*. *Skin Pharmacol Physiol*, 2014. **27**(5): p. 263-75.
66. Alepee, N., et al., *State-of-the-art of 3D cultures (organs-on-a-chip) in safety testing and pathophysiology*. *ALTEX*, 2014. **31**(4): p. 441-77.
67. Gordon, S., et al., *Non-animal models of epithelial barriers (skin, intestine and lung) in research, industrial applications and regulatory toxicology*. *ALTEX*, 2015. **32**(4): p. 327-78.
68. Reijnders, C.M., et al., *Development of a Full-Thickness Human Skin Equivalent In Vitro Model Derived from TERT-Immortalized Keratinocytes and Fibroblasts*. *Tissue Eng Part A*, 2015. **21**(17-18): p. 2448-59.

Références bibliographiques

69. Dezutter-Dambuyant, C., et al., *Evolutionary skin reconstructions: from the dermal collagen-glycosaminoglycan-chitosane substrate to an immunocompetent reconstructed skin*. Biomed Mater Eng, 2006. **16**(4 Suppl): p. S85-94.
70. Bechetoille, N., et al., *A new organotypic model containing dermal-type macrophages*. Exp Dermatol, 2011. **20**(12): p. 1035-7.
71. Trotter, V., et al., *IFATS collection: Using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes*. Stem Cells, 2008. **26**(10): p. 2713-23.
72. Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. Nat Protoc, 2007. **2**(2): p. 329-33.
73. Bhise, N.S., et al., *Organ-on-a-chip platforms for studying drug delivery systems*. J Control Release, 2014. **190**: p. 82-93.
74. Dreifke, M.B., A.A. Jayasuriya, and A.C. Jayasuriya, *Current wound healing procedures and potential care*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015. **48**: p. 651-62.
75. Meier, B., et al., *Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha*. Biochem J, 1989. **263**(2): p. 539-45.
76. Wientjes, F.B. and A.W. Segal, *NADPH oxidase and the respiratory burst*. Semin Cell Biol, 1995. **6**(6): p. 357-65.
77. O'Toole, E.A., M. Goel, and D.T. Woodley, *Hydrogen peroxide inhibits human keratinocyte migration*. Dermatol Surg, 1996. **22**(6): p. 525-9.
78. Cerutti, P.A. and B.F. Trump, *Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis*. Cancer Cells, 1991. **3**(1): p. 1-7.
79. Nachbar, F. and H.C. Korting, *The role of vitamin E in normal and damaged skin*. J Mol Med (Berl), 1995. **73**(1): p. 7-17.
80. Wagener, F.A., C.E. Carels, and D.M. Lundvig, *Targeting the redox balance in inflammatory skin conditions*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(5): p. 9126-67.
81. Fridovich, I., *The biology of oxygen radicals*. Science, 1978. **201**(4359): p. 875-80.
82. Michiels, C., et al., *Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 1994. **17**(3): p. 235-48.
83. Shindo, Y., et al., *Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin*. J Invest Dermatol, 1994. **102**(1): p. 122-4.
84. Barrientos, S., et al., *Growth factors and cytokines in wound healing*. Wound Repair Regen, 2008. **16**(5): p. 585-601.
85. Gainza, G., et al., *Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration*. Nanomedicine, 2015. **11**(6): p. 1551-73.
86. Ornitz, D.M. and N. Itoh, *The Fibroblast Growth Factor signaling pathway*. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2015. **4**(3): p. 215-66.

Références bibliographiques

87. Powers, C.J., S.W. McLeskey, and A. Wellstein, *Fibroblast growth factors, their receptors and signaling*. *Endocr Relat Cancer*, 2000. **7**(3): p. 165-97.
88. Sogabe, Y., et al., *Basic fibroblast growth factor stimulates human keratinocyte motility by Rac activation*. *Wound Repair Regen*, 2006. **14**(4): p. 457-62.
89. Sasaki, T., *The effects of basic fibroblast growth factor and doxorubicin on cultured human skin fibroblasts: relevance to wound healing*. *J Dermatol*, 1992. **19**(11): p. 664-6.
90. Gallo, L.H., et al., *Functions of Fibroblast Growth Factor Receptors in cancer defined by novel translocations and mutations*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015. **26**(4): p. 425-49.
91. Touat, M., et al., *Targeting FGFR Signaling in Cancer*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(12): p. 2684-94.
92. Simona Vagni, et al., *Vitamin E Bioavailability: Past and Present Insights* *Food and Nutrition Sciences*, 2011. **2**: p. 1088-1096
93. Fessi H, Devissaguet J.P, and P. F, *Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1989. **55**(1): p. R1-R4.
94. Keloglu, N., et al., *Controlled association and delivery of nanoparticles from jet-sprayed hybrid microfibrillar matrices*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016. **140**: p. 142-9.
95. Ankrum, J.A., et al., *Engineering cells with intracellular agent-loaded microparticles to control cell phenotype*. *Nat Protoc*, 2014. **9**(2): p. 233-45.
96. Rancan, F., et al., *Investigation of polylactic acid (PLA) nanoparticles as drug delivery systems for local dermatotherapy*. *Pharm Res*, 2009. **26**(8): p. 2027-36.
97. Zhang, Y., et al., *Design of Controlled Release PLGA Microspheres for Hydrophobic Fenretinide*. *Mol Pharm*, 2016. **13**(8): p. 2622-30.
98. Yun, Y.R., et al., *Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration*. *J Tissue Eng*, 2010. **2010**: p. 218142.
99. Andreopoulos, F.M. and I. Persaud, *Delivery of basic fibroblast growth factor (bFGF) from photoresponsive hydrogel scaffolds*. *Biomaterials*, 2006. **27**(11): p. 2468-76.
100. Cai, S., et al., *Injectable glycosaminoglycan hydrogels for controlled release of human basic fibroblast growth factor*. *Biomaterials*, 2005. **26**(30): p. 6054-67.
101. Beenken, A. and M. Mohammadi, *The FGF family: biology, pathophysiology and therapy*. *Nat Rev Drug Discov*, 2009. **8**(3): p. 235-53.
102. Galiano, R.D., et al., *Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing*. *Wound Repair Regen*, 2004. **12**(4): p. 485-92.
103. Stevens, E.J., et al., *A quantitative model of invasive Pseudomonas infection in burn injury*. *J Burn Care Rehabil*, 1994. **15**(3): p. 232-5.
104. Cohen, I., *Experimental Models of diabetes*, in *New England Journal of Medicine*, J.H. McNeill, Editor. 2000.

Références bibliographiques

105. Paik, S.G., N. Fleischer, and S.I. Shin, *Insulin-dependent diabetes mellitus induced by subdiabetogenic doses of streptozotocin: obligatory role of cell-mediated autoimmune processes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(10): p. 6129-33.
106. Chereddy, K.K., G. Vandermeulen, and V. Preat, *PLGA based drug delivery systems: Promising carriers for wound healing activity*. Wound Repair Regen, 2016. **24**(2): p. 223-36.
107. Constant, J.S., et al., *Lactate elicits vascular endothelial growth factor from macrophages: a possible alternative to hypoxia*. Wound Repair Regen, 2000. **8**(5): p. 353-60.
108. Nurhasni, H., et al., *Nitric oxide-releasing poly(lactic-co-glycolic acid)-polyethylenimine nanoparticles for prolonged nitric oxide release, antibacterial efficacy, and in vivo wound healing activity*. Int J Nanomedicine, 2015. **10**: p. 3065-80.
109. Losi, P., et al., *Fibrin-based scaffold incorporating VEGF- and bFGF-loaded nanoparticles stimulates wound healing in diabetic mice*. Acta Biomater, 2013. **9**(8): p. 7814-21.
110. Zhou, Y., et al., *Effective modulation of transforming growth factor-beta1 expression through engineered microRNA-based plasmid-loaded nanospheres*. Cytotherapy, 2015. **17**(3): p. 320-9.
111. Abla, M.J. and A.K. Banga, *Formulation of tocopherol nanocarriers and in vitro delivery into human skin*. Int J Cosmet Sci, 2014. **36**(3): p. 239-46.
112. Musumeci, T., et al., *PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel*. Int J Pharm, 2006. **325**(1-2): p. 172-9.
113. E. Yenilmez *, E. Bas, aran, and Y. Yazan, *Release characteristics of vitamin E incorporated chitosan microspheres and in vitro–in vivo evaluation for topical application*. Carbohydrate Polymers, 2011. **84**: p. 807–811.
114. Maria J. Ramalho, et al., *PLGA nanoparticles as a platform for vitamin D-based cancer therapy*. Beilstein J. Nanotechnol. , 2015. **6**: p. 1306–1318.
115. Rancan, F., et al., *Particle-based transcutaneous administration of HIV-1 p24 protein to human skin explants and targeting of epidermal antigen presenting cells*. J Control Release, 2014. **176**: p. 115-22.
116. Climent, N., et al., *Loading dendritic cells with PLA-p24 nanoparticles or MVA expressing HIV genes induces HIV-1-specific T cell responses*. Vaccine, 2014. **32**(47): p. 6266-76.
117. Lamalle-Bernard, D., et al., *Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity*. J Control Release, 2006. **115**(1): p. 57-67.
118. Chu, Y., et al., *Nanotechnology promotes the full-thickness diabetic wound healing effect of recombinant human epidermal growth factor in diabetic rats*. Wound Repair Regen, 2010. **18**(5): p. 499-505.
119. Butt, H., et al., *Protective role of vitamin E preconditioning of human dermal fibroblasts against thermal stress in vitro*. Life Sci, 2017. **184**: p. 1-9.
120. Jin, X., et al., *Protective efficacy of vitamins C and E on p,p'-DDT-induced cytotoxicity via the ROS-mediated mitochondrial pathway and NF-kappaB/FasL pathway*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e113257.

Références bibliographiques

121. Yatin, S.M., S. Varadarajan, and D.A. Butterfield, *Vitamin E Prevents Alzheimer's Amyloid beta-Peptide (1-42)-Induced Neuronal Protein Oxidation and Reactive Oxygen Species Production*. *J Alzheimers Dis*, 2000. **2**(2): p. 123-131.
122. Park, S.A., et al., *Importance of defining experimental conditions in a mouse excisional wound model*. *Wound Repair Regen*, 2015. **23**(2): p. 251-61.
123. Davidson, J.M., F. Yu, and S.R. Opalenik, *Splinting Strategies to Overcome Confounding Wound Contraction in Experimental Animal Models*. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2013. **2**(4): p. 142-148.
124. Lambrechts, S.A., et al., *Photodynamic therapy for Staphylococcus aureus infected burn wounds in mice*. *Photochem Photobiol Sci*, 2005. **4**(7): p. 503-9.
125. Krausz, A.E., et al., *Biafine topical emulsion accelerates excisional and burn wound healing in mice*. *Arch Dermatol Res*, 2015. **307**(7): p. 583-94.
126. Huang, L., et al., *Synergistic combination of chitosan acetate with nanoparticle silver as a topical antimicrobial: efficacy against bacterial burn infections*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55**(7): p. 3432-8.
127. Chu, C.Y., et al., *Nanohybrids of silver particles immobilized on silicate platelet for infected wound healing*. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e38360.
128. Singer, A.J., et al., *Does pressure matter in creating burns in a porcine model?* *J Burn Care Res*, 2010. **31**(4): p. 646-51.
129. Papp, A., et al., *The progression of burn depth in experimental burns: a histological and methodological study*. *Burns*, 2004. **30**(7): p. 684-90.
130. Watts, A.M., et al., *Burn depth and its histological measurement*. *Burns*, 2001. **27**(2): p. 154-60.
131. Chang, K.C., et al., *The optimal time for early burn wound excision to reduce pro-inflammatory cytokine production in a murine burn injury model*. *Burns*, 2010. **36**(7): p. 1059-66.
132. Fear, V.S., et al., *Timing of excision after a non-severe burn has a significant impact on the subsequent immune response in a murine model*. *Burns*, 2016. **42**(4): p. 815-24.
133. Lee, J.A., et al., *Acupuncture accelerates wound healing in burn-injured mice*. *Burns*, 2011. **37**(1): p. 117-25.
134. Robson, M.C., et al., *Prevention of dermal ischemia after thermal injury*. *Arch Surg*, 1978. **113**(5): p. 621-5.
135. Langer, S., et al., *New model for in vivo investigation after microvascular breakdown in burns: use of intravital fluorescent microscopy*. *Burns*, 2005. **31**(2): p. 168-74.
136. Nguyen, C.T., et al., *Preparation and in vitro evaluation of FGF-2 incorporated carboxymethyl chitosan nanoparticles*. *Carbohydr Polym*, 2017. **173**: p. 114-120.
137. Gospodarowicz, D. and J. Cheng, *Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation*. *J Cell Physiol*, 1986. **128**(3): p. 475-84.

Références bibliographiques

138. DeBlois, C., M.F. Cote, and C.J. Doillon, *Heparin-fibroblast growth factor-fibrin complex: in vitro and in vivo applications to collagen-based materials*. Biomaterials, 1994. **15**(9): p. 665-72.
139. Vemuri, S., et al., *The stability of bFGF against thermal denaturation*. J Pharm Pharmacol, 1994. **46**(6): p. 481-6.
140. Prestrelski, S.J., G.M. Fox, and T. Arakawa, *Binding of heparin to basic fibroblast growth factor induces a conformational change*. Arch Biochem Biophys, 1992. **293**(2): p. 314-9.
141. Huang, S., et al., *Wound dressings containing bFGF-impregnated microspheres*. J Microencapsul, 2006. **23**(3): p. 277-90.
142. Mori, Y., et al., *Preparation and characterization of low-molecular-weight heparin/protamine nanoparticles (LMW-H/P NPs) as FGF-2 carrier*. Int J Nanomedicine, 2010. **5**: p. 147-55.
143. Nishiyama, N. and K. Kataoka, *Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery*. Pharmacol Ther, 2006. **112**(3): p. 630-48.
144. Blanquaert, F., D. Barritault, and J.P. Caruelle, *Effects of heparan-like polymers associated with growth factors on osteoblast proliferation and phenotype expression*. J Biomed Mater Res, 1999. **44**(1): p. 63-72.
145. Hirschi, K.K., et al., *Vascular assembly in natural and engineered tissues*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **961**: p. 223-42.
146. Jeon, O., et al., *Long-term and zero-order release of basic fibroblast growth factor from heparin-conjugated poly(L-lactide-co-glycolide) nanospheres and fibrin gel*. Biomaterials, 2006. **27**(8): p. 1598-607.
147. Li, X., et al., *EGF and curcumin co-encapsulated nanoparticle/hydrogel system as potent skin regeneration agent*. Int J Nanomedicine, 2016. **11**: p. 3993-4009.
148. Dardenne Christophe, Pipy Bernard, and Lamoise Michel, *Method of microscopic and macroscopic analysis of the progression of wound healing*, E.P. Office, Editor. 2017: France. p. 18.
149. Pereira, G.G., et al., *Microparticles of Aloe vera/vitamin E/chitosan: microscopic, a nuclear imaging and an in vivo test analysis for burn treatment*. Eur J Pharm Biopharm, 2014. **86**(2): p. 292-300.