



HAL
open science

Étude du sulfure d'hydrogène sur les fonctions immunitaires des kératinocytes : implication physiopathologique dans le contexte de la brûlure

Olivia Gross-Amat

► To cite this version:

Olivia Gross-Amat. Étude du sulfure d'hydrogène sur les fonctions immunitaires des kératinocytes : implication physiopathologique dans le contexte de la brûlure. Ingénierie biomédicale. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1336 . tel-03618388

HAL Id: tel-03618388

<https://theses.hal.science/tel-03618388>

Submitted on 24 Mar 2022

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 : 2020LYSE1336

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-SANTE

Spécialité de doctorat : Ingénierie biologique et médicale, Biotechnologie

Soutenue publiquement le 16/12/2020, par :
Olivia GROSS, GROSS-AMAT

Étude du sulfure d'hydrogène sur les fonctions immunitaires des kératinocytes : implication physiopathologique dans le contexte de la brûlure

Devant le jury composé de :

Pr LAMARTINE Jérôme, CNRS/LBTI
Pr BALDESCHI Christine, INSERM/EVRY
Pr LECRON Jean-Claude, CHU Poitiers
Pr FOURNIER Isabelle, UDL/PRISM
Dr LEBONVALLET Nicolas, UBO

Président
Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Examineur

Pr NATAF Serge, HCL/UCBL
Dr AUXENFANS Céline, HCL/UCBL

Directeur de thèse
Co-encadrante

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université
Président du Conseil Académique
Vice-président du Conseil d'Administration
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire
Vice-président de la Commission Recherche
Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY
M. le Professeur Hamda BEN HADID
M. le Professeur Didier REVEL
M. le Professeur Philippe CHEVALIER
M. Jean-François MORNEX
M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine
Faculté d'Odontologie
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud -Charles Mérieux
Faculté de Médecine Lyon-Est
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)

Directrice: Mme Anne-Marie SCHOTT
Doyenne: Mme Dominique SEUX
Doyenne: Mme Carole BURILLON
Doyen: M. Gilles RODE
Directeur: M. Xavier PERROT
Directrice: Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Électrique et des Procédés (GEP)
Département Informatique
Département Mécanique
École Supérieure de Chimie, Physique, Électronique (CPE Lyon)
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)
Institut National du Professorat et de l'Éducation
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1
Observatoire de Lyon
Polytechnique Lyon
UFR Biosciences
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)
UFR Faculté des Sciences

Directrice: Mme Rosaria FERRIGNO
Directeur: M. Behzad SHARIAT
Directeur M. Marc BUFFAT
Directeur: Gérard PIGNAULT
Directeur: M. Nicolas LEBOISNE
Administrateur Provisoire: M. Pierre CHAREYRON
Directeur: M. Christophe VITON
Directrice: Mme Isabelle DANIEL
Directeur: Emmanuel PERRIN
Administratrice provisoire: Mme Kathrin GIESELER
Directeur: M. Yannick VANPOULLE
Directeur: M. Bruno ANDRIOLETTI

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Christine Baldeschi et Jean-Claude Lecron d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je les remercie pour leur disponibilité, leurs retours bienveillants et leurs commentaires qui m'ont permis d'améliorer mon manuscrit.

Je remercie également Isabelle Fournier d'avoir accepté sans hésiter de faire partie de mon jury bien que la peau ne soit pas son sujet d'expertise.

Un grand merci à Jérôme Lamartine, pour sa participation dans mon jury de thèse, mais surtout pour m'avoir fait découvrir ce domaine extraordinaire qu'est la peau grâce à la création du master Biologie de la Peau et sans qui finalement je n'aurais pas réalisé ce travail. Je suis très heureuse d'avoir fait partie de la première promotion de votre master.

Je remercie tout particulièrement Nicolas Lebonvallet de faire partie de mon jury de thèse. Je te remercie surtout pour ton accueil pendant mon séjour à Brest. J'en garde un bon souvenir grâce à toi malgré la pluie persistante. Je te remercie également pour ta disponibilité et ta réactivité tout au long de cette collaboration. Les résultats n'ont certes pas abouti, pour l'instant, à une publication mais ont enrichi mes connaissances sur un domaine que je connaissais peu.

Je remercie Serge Nataf, mon directeur de thèse et Céline Auxenfans, la co-encadrante qui m'ont suivie pendant ces trois années. Merci Céline de m'avoir accueillie au sein de l'équipe et merci à Serge de m'avoir fait confiance pour réaliser le projet AFRETH. Merci pour m'avoir encadrée et pour vos précieux conseils, chacun dans votre domaine d'expertise.

Je remercie l'AFRETH qui a financé le projet et qui ont permis à cette thèse de voir le jour.

Je remercie également les personnes de l'équipe du laboratoire PRISM, notamment Michel Salzet, qui m'ont accueillie à Lille pendant quelques jours et particulièrement Jean-Pascal Gimeno qui m'a guidée pendant toute l'expérience de spectrométrie de masse.

Je tenais à remercier Bruno Chapuis de l'équipe du Ciqle qui m'a formée à l'utilisation du scanner de lames. Tu as également pris le temps de créer des macros pour nos analyses d'images avec Lucille, et de nous les expliquer. Je suis encore ébahie par ta gentillesse.

Lucille, avec qui un lien s'est tout de suite créé. On a pu partager tous nos moments de thèse ensemble et heureusement que tu étais là, particulièrement pendant cette dernière année difficile ! Tu es devenue une véritable amie et je te souhaite tout le bonheur que tu mérites ! J'ai hâte de venir te voir à la Réunion !

Adeline, je te remercie pour ta bonne humeur, pour tous ces moments de rire et tous ces midis partagés ensemble ! J'espère que tu te plairas à Besançon et que tu repasseras de temps en temps à Lyon pour boire un verre ensemble !

Marine, je te remercie pour toute ta gentillesse et ton investissement. Merci également de m'avoir formée au western blot et d'avoir toujours été réactive et disponible tout au long du projet. Et merci d'avoir pu partager avec moi la charge de gérer le B5 !

Marie-Rose, merci à toi pour ta bienveillance, tes conseils, tu t'es toujours montrée disponible malgré ton emploi du temps chargé !

Sabah, tu es la seule à avoir été présente au B5 tout au long de ma thèse. Tu es une très belle personne et je te souhaite évidemment le meilleur. Je te remercie pour tous ces moments qui m'ont permis de souffler.

Un merci à tous les autres membres de la Banque des Tissus et Cellules : Pascale, Éric, Lydia, Sophie, Dominique, Françoise.

Je remercie également Marie et Énora, les anciennes 5HU, le feeling est passé tout de suite et vous étiez top toutes les deux et heureusement que vous étiez là !

Un grand merci aux anciens membres du B5, Pierre-Emmanuel, une boule d'énergie débordante qui savait mettre l'ambiance au B5 ! Je te souhaite une réussite dans tout ce que tu entreprends !

Et évidemment un grand merci à Lara, c'est toi qui m'as tout appris au B5 : de la culture, au rangement, aux commandes, aux marquages... Tu as pris ce temps pendant ta propre thèse. Tu m'as clairement prise sous ton aile et je ne te remercierai jamais assez pour ça ! Mais évidemment merci aussi pour ta bonne humeur malgré la pression et pour ces moments partagés au B5.

Je remercie évidemment mes proches, ma famille, mes amis.

Je ne suis pas à l'aise avec cette partie-là et je n'ai pas forcément réussi à exprimer mon ressenti pour toutes les personnes ayant participé à ma vie au labo mais j'espère évidemment une réussite pour toutes les personnes qui m'entourent.

RESUMÉ

Les eaux thermales sulfurées, riches en sulfure d'hydrogène (H₂S), sont utilisées de manière ancestrale dans le traitement de pathologies dermatologiques inflammatoires (psoriasis, dermatite atopique, ulcère). L'H₂S est donc potentiellement un agent actif dont les propriétés pourraient être exploitées au plan thérapeutique. Cependant, les effets moléculaires et cellulaires exercés par l'H₂S sur les cellules de la peau ne sont pas tous répertoriés que ce soit en condition physiologique ou lors de pathologies cutanées.

Dans ce contexte, nos objectifs étaient en parallèle i) de déterminer des voies d'action de l'H₂S sur les kératinocytes primaires humains en utilisant des outils de biologie systémique puis une approche ciblée sur des processus clés liés aux processus inflammatoires cutanées et ii) d'observer l'impact de l'H₂S sur la cicatrisation d'une plaie dans un modèle de brûlure du 2^{ème} degré sur explant de peau humaine.

Ainsi nous avons pu établir que l'H₂S exerçait un ensemble complexe d'effets biologiques sur les kératinocytes : i) effet antiprolifératif, ii) effet antioxydant (stimulation de la production SOD2), iii) effet pro-inflammatoire (stimulation de l'expression de caspase-1, stimulation de la production de pro-IL-1 β , d'IL-8, de CXCL2, et d'IL-18). En parallèle, nous avons mis en place un modèle *ex vivo* de brûlure du 2^{ème} degré sur peau humaine. Les objectifs de ce modèle étaient les suivants : i) proposer une alternative aux modèles animaux sujets à critiques pour des raisons éthiques, ii) mettre en place un nouveau modèle de brûlure réalisé à partir d'explant de peau humaine iii) vérifier et étendre les résultats obtenus sur cultures pures de kératinocytes humains. Afin de mimer au mieux les conditions physiologiques, les explants de peau ont été cultivés à l'interface air/liquide et mis sous tension mécanique. Un modèle de brûlure sur explant a ensuite été caractérisé afin de vérifier son intérêt dans les tests de traitement. Ce modèle permet d'observer les premières étapes de la cicatrisation : la fermeture de la plaie, la prolifération des kératinocytes conduisant à la réépithélialisation, le remodelage tissulaire. Ce modèle nous a permis de tester l'application de l'H₂S, intégré dans un hydrogel de poloxamères, sur la cicatrisation de la brûlure. Le traitement à l'H₂S a induit principalement deux effets : i) une inhibition de la réépithélialisation et ii) un retard de la production de procollagène III, molécule participant au remodelage tissulaire du derme. Ainsi, nous avons pu vérifier dans un modèle de brûlure *ex vivo* l'impact antiprolifératif de l'H₂S observé *in vitro*. Ce retard de la fermeture de la lésion semble dû à une inhibition de la prolifération des kératinocytes.

Mots clés : peau, kératinocytes, brûlure, culture *ex vivo*, H₂S, inflammation, cicatrisation

ABSTRACT

Sulfur-rich thermal waters have been used for centuries in the treatment of inflammatory dermatological pathologies (psoriasis, atopic dermatitis, ulcer). H₂S is therefore an interesting therapeutic target. However, the molecular and cellular effects exerted by H₂S on skin cells are not all known whether in physiological conditions or during skin pathologies.

In this context, our objectives were in parallel: i) to determine the pathways of action of H₂S on human primary keratinocytes using systemic biology tools followed by a targeted approach on key processes linked to cutaneous inflammation and ii) to evaluate the impact of H₂S on wound healing in a 2nd degree burn model on human skin explants.

We were thus able to establish that H₂S exerts a complex set of biological effects on keratinocytes: i) antiproliferative effects, ii) antioxidant effects (stimulation of SOD2 production), iii) pro-inflammatory effects (stimulation of expression caspase-1, stimulation of production of pro-IL-1 β , IL-8, CXCL2, and IL-18). In parallel, we set up an *ex vivo* model of 2nd degree burn on human skin explants. The objectives of this model were as follows: i) to propose an alternative to animal models which are subjected to criticisms for ethical reasons, ii) to set up a new burn model performed on human skin explants, iii) to verify and extend the results obtained on pure cultures of human keratinocytes. In order to best mimic physiological conditions, skin explants were cultured at the air/liquid interface and submitted to a mechanical tension. Our model of burn on skin explants was then characterized in order to verify its interest for the evaluation of new treatments. This model makes it possible to observe the first stages of healing: wound closure, proliferation of keratinocytes leading to reepithelialization, tissue remodeling. This model allowed us to test the application of H₂S, integrated in a hydrogel of poloxamers, on burn healing. The H₂S treatment produced two main effects: i) an inhibition of re-epithelialization and ii) a delay in the production of procollagen III, a molecule involved in dermal tissue remodeling. Thus, we were able to confirm *ex vivo* the antiproliferative impact of H₂S, observed *in vitro*. The delay observed in the lesion closure appears to be due to an inhibition of the proliferation of keratinocytes.

Key words: skin, keratinocytes, burn, *ex vivo* culture, H₂S, inflammation, wound healing



Lieu de réalisation de la thèse

Banque des Tissus et Cellules
Hôpital Édouard Herriot
5 place d'Arsonval
69003 Lyon
France

Financement

Ce travail de thèse a été financé par l'association française pour la recherche sur les eaux thermales (AFRETH : "Association Française pour la Recherche Thermale").

Encadrement

La thèse a été encadrée par Pr Serge Nataf et Dr Céline Auxenfans.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | 12 |
| LISTE DES ILLUSTRATIONS | 13 |
| PRÉAMBULE | 15 |
| INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE | 18 |
| Chapitre 1 : Présentation de la peau | 19 |
| 1. Structure histologique de la peau | 19 |
| 1.1 L'épiderme..... | 20 |
| 1.2 Derme..... | 23 |
| 1.3 Hypoderme | 23 |
| 2. Les cellules & les annexes cutanées | 23 |
| 3. La matrice extracellulaire | 28 |
| 3.1 JDE/ membrane basale | 28 |
| 3.2 Protéines du derme | 29 |
| 4. Les kératinocytes : cellules au centre des interactions peau/ système immunitaire | 32 |
| 4.1 Différenciation dans le lignage kératinocytaire | 33 |
| 4.2 Cellules souches épidermiques | 35 |
| 4.3 Fonctions structurelles et immunitaires des kératinocytes..... | 40 |
| 4.3.1 Rôle de barrière immunitaire | 40 |
| 4.3.2 Immunocompétences des kératinocytes..... | 41 |
| 4.4 Kératinocytes et stress oxydant..... | 43 |
| 4.5 Rôle central du kératinocyte dans les interactions entre les différents types cellulaires/ différentes structures | 46 |
| 4.5.1 Interaction kératinocytes-cellules immunitaires..... | 46 |
| 4.5.2 Interaction kératinocytes-neurones | 47 |
| 5. Exemples de pathologies dermatologiques kératinocytaires | 47 |
| Chapitre 2 : La brûlure et ses modèles d'étude | 50 |
| 1. La brûlure : classification clinique et traitement | 50 |
| 1.1 Classification des brûlures..... | 50 |
| 1.1.1 Brûlure du 1 ^{er} degré | 50 |
| 1.1.2 Brûlure du 2 ^{ème} degré | 50 |
| 1.1.3 Brûlure du 3 ^{ème} degré | 51 |
| 1.1.4 Brûlure du 4 ^{ème} degré | 51 |
| 1.1.5 Traitement des brûlures | 53 |
| 1.2 Mécanismes physiopathologiques de la brûlure | 54 |
| 1.2.1 Réponse cellulaire et tissulaire..... | 54 |
| 1.2.2 Réponse systémique..... | 56 |
| 1.3 Étapes de la réparation post-brûlure..... | 57 |
| 1.3.1 Hémostase..... | 58 |
| 1.3.2 Phase inflammatoire | 59 |
| 1.3.3 Phase proliférative | 61 |

| | | |
|-------|---|----|
| 1.3.4 | Phase de maturation | 63 |
| 1.4 | Complications post-brûlure : le cas de la cicatrice hypertrophique | 64 |
| 2. | Modèles d'étude de la brûlure | 66 |
| 2.1 | Modèles in vivo | 66 |
| 2.2 | Modèles in vitro | 69 |
| 2.2.1 | Méthode « sans plaie » de brûlure <i>in vitro</i> | 69 |
| 2.2.2 | Méthode de plaie sans chaleur – scratch test | 70 |
| 2.2.3 | Méthode de plaie par chaleur | 71 |
| 2.3 | Modèle ex vivo | 73 |
| 2.3.1 | Modèles de brûlure <i>ex vivo</i> | 74 |
| a. | <i>Modèle d'Emanuelsson et Kratz</i> | 74 |
| b. | <i>Modèle de Sivamani et al.</i> | 75 |
| c. | <i>Modèle de Coolen et al.</i> | 75 |
| d. | <i>Modèle de Qu et al.</i> | 76 |
| 2.3.2 | Modèles de cicatrisation – plaie par incision | 78 |
| 2.3.3 | Avantages et limites des modèles <i>ex vivo</i> sur explant de peau..... | 78 |

Chapitre 3 : Le sulfure d'hydrogène (H₂S) : un gazotransmetteur aux multiples effets biologiques

| | | |
|-------|---|-----|
| | 82 | |
| 1. | Généralités sur H₂S | 82 |
| 1.1 | L'H ₂ S est le 3 ^{ème} gazotransmetteur | 82 |
| 1.2 | Sources d'H₂S | 83 |
| 1.2.1 | Sources exogènes..... | 83 |
| 1.2.2 | Sources endogènes chez les mammifères | 84 |
| 2. | Métabolisme de l'H₂S | 86 |
| 2.1 | La S-sulfuration | 86 |
| 2.2 | Oxydation du H₂S | 89 |
| 2.3 | Régulation métabolique | 94 |
| 3. | Manipulation et détection de l'H₂S | 96 |
| 3.1 | Donneurs d'H₂S | 96 |
| 3.2 | Détection d'H₂S | 98 |
| 4. | Localisation et concentration cellulaire et extracellulaire dans le corps humain | 99 |
| 4.1 | Dans le corps humain | 100 |
| 4.2 | Dans la peau | 101 |
| 5. | Effets biologiques de H₂S | 102 |
| 5.1 | Effets cliniques connus | 102 |
| 5.1.1 | Toxicité..... | 103 |
| 5.1.2 | Bienfaits – eaux thermales | 104 |
| 5.2 | Effets moléculaires | 105 |
| 5.2.1 | Inflammation..... | 105 |
| 5.2.2 | Sur vaisseaux sanguins – angiogenèse..... | 107 |
| 5.2.3 | Viabilité et prolifération..... | 108 |
| 5.2.4 | Oxydoréduction | 109 |
| 6. | Études <i>in vitro</i> sur les kératinocytes | 111 |

OBJECTIFS..... 113

| | |
|---|------------|
| <i>RÉSULTATS</i> | 116 |
| 1. Impact du sulfure d'hydrogène sur les kératinocytes humains..... | 117 |
| 2. Mise en place d'un modèle <i>ex vivo</i> de brûlure du 2 ^{ème} degré sur explant de peau humaine 144 | |
| 3. Analyse des effets d'une application topique de NaHS sur un modèle <i>ex vivo</i> de brûlure du 2 ^{ème} degré..... | 165 |
| <i>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</i> | 196 |
| <i>ANNEXES</i> | 207 |
| <i>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i> | 211 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|--|---|
| α-SMA : Alpha Smooth Muscle Actin | Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1 |
| ADN : Acide Désoxyribonucléique | LPS : Lipopolysaccharides |
| Ag : Antigène | LT : Lymphocytes T |
| AMP : Peptides Antimicrobiens | MCP1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1 |
| ARN : Acide Ribonucléique | MEC : Matrice Extracellulaire |
| ASCs : Adipose-derived Stem Cells | MIP : Macrophage Inflammatory Protein |
| ATP : Adénosine Triphosphate | MMP : Métalloprotéinases |
| CAT : Catalase | MST : 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransférase |
| CBS : cystathionine β synthetase | Na₂S : Sulfure de Sodium |
| CFU : Colony Forming Unit | NaHS : l'hydrosulfure de sodium |
| CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité | NGF : nerve growth factor |
| CO : Monoxyde de Carbone | NLR : NOD-like receptor family |
| CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes | NO : monoxyde d'azote |
| CS : Cellules Souches | NQO1 : NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1 |
| CSE : cystathionine γ lyase | Nrf2 : Nuclear Factor erythroid-2-related Factor 2 |
| CUL3 : Culline 3 | PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns |
| CXCL : Chemokine (C-X-C motif) Ligand | PAR-2 : type-2 proteinase-activated receptors |
| DAMPs : Damage Associated Molecular Pattern | PDGF : Platelet-Derived Growth Factor |
| DRGN : Dorsal Root Ganglion Neurons | Rbx 1 : Ring box 1 |
| FGF : Fibroblast Growth Factor | RNS : Reactive Nitrogen Species |
| G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor | ROS : Reactive Oxygen Species |
| GDF15 : Growth differentiation factor 15 | RSS : Reactive Sulfure Species |
| GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor | SOD : Superoxyde Dismutase |
| H₂S : Sulfure d'Hydrogène | SQR : Sulfure Quinone Réductase |
| HLA : Human Leukocyte Antigen | TGF : Transforming Growth Factor |
| HMGB1 : High-Mobility Group Box 1 | TLR : Toll-Like Receptors |
| IFN : Interférons | TNF-α : Tumor Necrosis Factors |
| IL : Interleukine | TRP : Transient Receptor Potential |
| JDE : Jonction Dermo-Épidermique | VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor |

LISTE DES ILLUSTRATIONS

| | |
|---|----|
| Figure 1. Schéma de la structure générale de la peau..... | 19 |
| Figure 2. Coloration H&E d'une coupe de peau..... | 20 |
| Figure 3. Les différentes couches de l'épiderme..... | 21 |
| Figure 4. Schéma détaillé de l'épiderme avec l'ensemble des populations cellulaires..... | 23 |
| Figure 5. Cellules résidentes de la peau..... | 26 |
| Figure 6. Répartition des cellules de la peau..... | 26 |
| Figure 7. Schéma des annexes cutanées : follicule pileux, glande sébacée, glandes sudoripares..... | 27 |
| Figure 8. Représentation simplifiée de la structure de la JDE..... | 28 |
| Figure 9. Composants de la matrice extracellulaire du derme..... | 30 |
| Figure 10. Le processus d'assemblage de la fibre de collagène..... | 31 |
| Figure 11. Métabolisme des fibrilles de collagène de type III..... | 32 |
| Figure 12. Formation de la couche lipidique à l'interface stratum granulosum/stratum corneum : extrusion du contenu des corps lamellaires à l'interface entre couche granulaire et couche cornée..... | 34 |
| Figure 13. Divisions de la cellule souche épidermique : asymétrique ou symétrique..... | 36 |
| Figure 14. Localisation des cellules souches épidermiques..... | 37 |
| Figure 15. Répartition des cellules souches épidermiques interfolliculaires au niveau de la couche basale avec des cellules d'amplification transitoire..... | 37 |
| Figure 16. De la division asymétrique d'une cellule souche épidermique à la formation d'une cornéocyte..... | 38 |
| Figure 17. Aspect macroscopique et classification des colonies de kératinocytes après coloration à la rhodamine..... | 39 |
| Figure 18. Identification des cellules en prolifération dans la peau humaine saine..... | 40 |
| Figure 19. Représentation de diverses cytokines et chémokines sécrétées par les kératinocytes après une lésion..... | 42 |
| Figure 20. Structure de l'inflammasome NLRP3..... | 43 |
| Figure 21. Activation de la transcription d'enzymes antioxydantes par Nrf2 et boucle de régulation..... | 46 |
| Figure 22. Interaction kératinocytes-lymphocytes T dans la mise en place et le maintien de la dermatite atopique..... | 48 |
| Figure 23. Schéma des différents degrés de brûlures..... | 52 |
| Figure 24. Les trois zones de la brûlures : zone de stase, zone de coagulation et zone d'hyperémie..... | 55 |
| Figure 25. Schéma des altérations systémiques potentiellement induite par une brûlure grave et étendue..... | 56 |
| Figure 26. Chronologie des phases de la cicatrisation..... | 57 |
| Figure 27. Schéma des différentes phases de la cicatrisation cutanée..... | 58 |
| Figure 28. Modifications de la MEC du derme au cours des phases de la cicatrisation cutanée..... | 64 |
| Figure 29. Représentation d'une cicatrice hypertrophique..... | 65 |
| Figure 30. Peau humaine versus peau de souris..... | 67 |
| Figure 31. Peau humaine versus peau de porc..... | 68 |

| | |
|--|-----|
| Figure 32. Brûlure in vitro par transfert de chaleur de la plaque en verre du four à micro-ondes à la plaque de culture en verre. | 70 |
| Figure 33. Schéma de la méthode du scratch test. | 71 |
| Figure 34. Méthode de brûlure thermique par application d'un dispositif chauffé à 100°C pendant 1s sur cellules in vitro. | 72 |
| Figure 35. Système de tension mécanique dans modèle de cicatrisation de peau humaine ex vivo. | 78 |
| Figure 36. Schéma de la synthèse d'H₂S dans des cellules de mammifères à partir de la L-cystéine par les enzymes CBS, CSE ou 3-MST. | 85 |
| Figure 37. Ratio de H₂S et HS⁻ en fonction des compartiments cellulaires. | 87 |
| Figure 38. Réaction théorique de la S-sulfuration médiée par H₂S. | 88 |
| Figure 39. Représentation du principe d'oxydoréduction entre les couples rédox Ox₂/Red₂ et Ox₁/Red₁ sur l'échelle de potentielle rédox. | 90 |
| Figure 40. H₂S n'induit pas la S-sulfuration des protéines. | 90 |
| Figure 41. L'oxydation d'H₂S conduit à a formation de produits sulfurées au niveau d'oxydation plus élevé. | 91 |
| Figure 42. Schéma du système enzymatique mitochondrial du catabolisme l'oxydation de l'H₂S | 91 |
| Figure 43. La S-sulfuration des protéines induite par des produits issus de l'oxydation de l'H₂S. | 93 |
| Figure 44. Métabolisme de l'H₂S dans la cellule. | 96 |
| Figure 45. Réaction impliquée dans la détection d'H₂S par la méthode du bleu de méthylène .. | 98 |
| Figure 46. Marquage d'H₂S par une sonde fluorescente après ajout de NaHS (150 µM) dans des cellules MCF-7 | 99 |
| Figure 47. Concentrations du sulfure d'hydrogène en fonction du pH dans la peau. | 102 |
| Figure 48. Chaîne respiratoire mitochondriale. | 104 |
| Figure 49. Stimulation d'IL-1β et IL-18 par H₂S. | 198 |
| Figure 50. Rôle antioxydant d'H₂S : voie Nrf2. | 201 |
| Figure 51. Points d'améliorations du modèle de brûlure ex vivo. | 204 |
| Figure 52. Effets de l'H₂S sur les kératinocytes humains. | 205 |
| Figure 53. Les kératinocytes stimulés au NaHS n'induisent pas la pousse des neurites de PC12. | 209 |
| Figure 54. Le NaHS ne stimule pas la sécrétion de la substance P des DRGN. | 210 |
| Tableau 1. Cellules résidentes de la peau. | 24 |
| Tableau 2. Description simplifiée de l'aspect et de leur évolution en fonction de leur niveau de profondeur. | 52 |
| Tableau 3. Modèles d'étude sur la brûlure ex vivo de peau humaine | 77 |
| Tableau 4. Modèles d'étude de la cicatrisation ex vivo de peau humaine (liste non exhaustive). | 81 |
| Tableau 5. Études in vitro sur l'impact du NaHS sur des kératinocytes | 112 |

PRÉAMBULE

La peau est un organe essentiel à la protection de l'organisme. La peau est un site d'interactions important où vont dialoguer différents types cellulaires afin de maintenir l'homéostasie de la peau en situation physiologique ou dans un contexte de « danger ». Une dérégulation de ses interactions peut conduire aux développements de pathologies inflammatoires dermatologiques telles que le psoriasis, la dermatite atopique, l'ulcère... Ces pathologies affectent un grand nombre de personnes. En France on note environ 1 million d'adultes touchés par le psoriasis (Parisi et al., 2020) et il est estimé que 4,5% de la population française, plus généralement les enfants et les adolescents, souffre ou a souffert de dermatite atopique (Richard et al., 2018). En ce qui concerne les brûlures, à l'échelle mondiale le nombre de brûlés est de 300 000 - par an, avec hospitalisations annuelles de 8 000 patients (Siah et al., 2012). La formation de cicatrices impacte grandement la qualité de vie des patients. Le développement de traitements efficaces est donc nécessaire.

Les eaux thermales riches en sulfure sont utilisées de manière ancestrale dans le traitement de pathologies dermatologiques inflammatoires. Il avait déjà été remarqué à l'époque de la Grèce antique un lien entre l'amélioration de maladies de peaux et des bains riches en sulfure, en particulier pour des pathologies telles que le psoriasis, la dermatite atopique, l'acné, l'eczéma et également dans la réparation de plaies chroniques (Gianfaldoni et al., 2017; Huang et al., 2018). En France, les cures thermales sont prescrites pour le traitement d'un nombre important de pathologies. En effet, la France est le 3^{ème} pays en Europe en ce qui concerne la fréquentation des établissements thermaux avec 600 000 curistes en 2019. Toutefois, la dermatologie ne représente en moyenne que 2,5% des indications de cures thermales (Starace, 2017) (www.medecinthermale.fr). Il est néanmoins important de comprendre les mécanismes d'action des eaux thermales sulfurées et d'explorer les effets exercés par son principal agent actif, l'H₂S sur les cellules de la peau.

L'H₂S est, après le monoxyde d'azote (NO) et le monoxyde de carbone (CO), le 3^{ème} membre identifié de la famille des gazotransmetteurs. Par rapport aux deux gazotransmetteurs plus anciennement identifiés, l'intérêt pour l'H₂S est relativement récent, justifié principalement par les bienfaits des eaux thermales sulfurées mais également par son appartenance même à la famille que le NO, molécule exerçant une multitude de rôles physiologiques et qui a été impliqué dans la physiopathologie d'un grand nombre de maladies humaines. Les effets cliniques induits par les eaux thermales sulfurées suggèrent un rôle thérapeutique de l'H₂S.

Comprendre les voies d'action de l'H₂S permettrait de déterminer son intérêt thérapeutique dans le traitement de pathologies inflammatoires cutanées.

Notre étude s'est principalement portée sur l'impact de l'H₂S sur les kératinocytes fortement impliqués dans les différentes pathologies dermatologiques de par leur rôle majeur dans la protection et le maintien de l'homéostasie de la peau mais également dans les interactions immunitaires.

Deux approches ont été mises en place afin d'évaluer l'impact de l'H₂S sur les cellules de la peau : i) approche *in vitro* utilisant des kératinocytes primaires humains, ii) approche *ex vivo* basée sur un modèle de brûlure sur explant de peau humaine.

Lors de la première approche, l'étude s'est faite principalement sur des feuillets épidermiques, utilisés pour le traitement des grands brûlés. Le feuillet épidermique est constitué de plusieurs couches de kératinocytes, reproduisant les couches basales et suprabasales observables *in vivo*. L'évaluation de l'impact de l'H₂S s'est faite à deux niveaux : i) globale, via une analyse pangénomique et protéomique, ii) ciblée avec une analyse de la viabilité, de la prolifération et de l'inflammation.

Dans une deuxième approche de l'étude, les effets de l'H₂S ont été étudiés dans un modèle *ex vivo* que nous avons mis en place de brûlure du 2^{ème} degré sur explants de peau humaine. Ce modèle a été caractérisé et validé avant de tester l'impact de l'H₂S sur la cicatrisation d'une plaie par brûlure. L'évaluation de l'impact de l'H₂S s'est centrée sur 2 axes : la fermeture de la plaie et le remodelage tissulaire.

Afin de faciliter la lecture des travaux, l'introduction bibliographique sera divisée en trois chapitres aux thèmes spécifiques :

- Présentation générale de la peau
- La brûlure et ses méthodes d'étude
- Le sulfure d'hydrogène (H₂S) ; un gazotransmetteur aux multiples effets biologiques

La partie expérimentale et les résultats seront ensuite présentés sous forme d'articles. Enfin, la discussion générale synthétise les résultats et les confrontent aux données de la littérature pour dégager l'apport de notre travail dans le contexte des connaissances actuelles.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Présentation de la peau

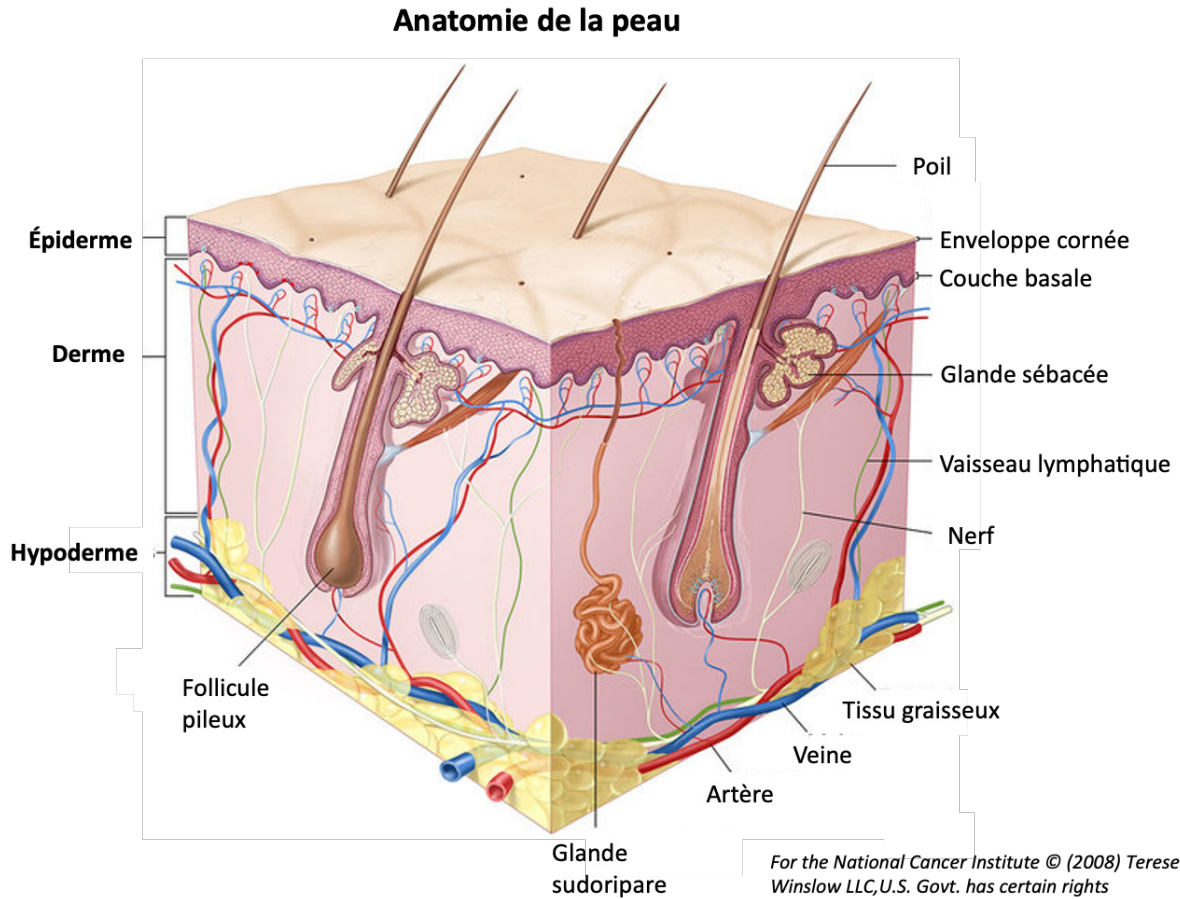


Figure 1. Schéma de la structure générale de la peau. Traduit d'après Terese Winslow. Copyright (2008)

1. Structure histologique de la peau

La peau est l'organe le plus volumineux du corps humain et recouvrant entièrement la surface externe du corps. La peau est composée de 3 couches : l'épiderme en surface, puis le derme et l'hypoderme. La peau contient également des annexes cutanées (phanères et glandes), des fibres nerveuses, des vaisseaux sanguins et lymphatiques (**Figure 1**).

La peau va assurer essentiellement 3 fonctions : i) des fonctions de barrière contre des agents pathogènes, rayons UV, produits chimiques, blessures mécanique, ii) la participation à l'homéostasie corporelle via la régulation de la température et de la perte hydrique, iii) des fonctions sensorielles (Blanpain and Fuchs, 2006; Yousef et al., 2020).

La peau, bien que conservant une structure homogène dans tous l'organisme, présente des variations d'épaisseur des différentes couches, et quant à la quantité et la qualité des poils et de leurs annexes (Yousef et al., 2020).

Nous allons présenter la structure histologique générale de la peau avant de détailler les cellules et les principales protéines matricielles qui la composent.

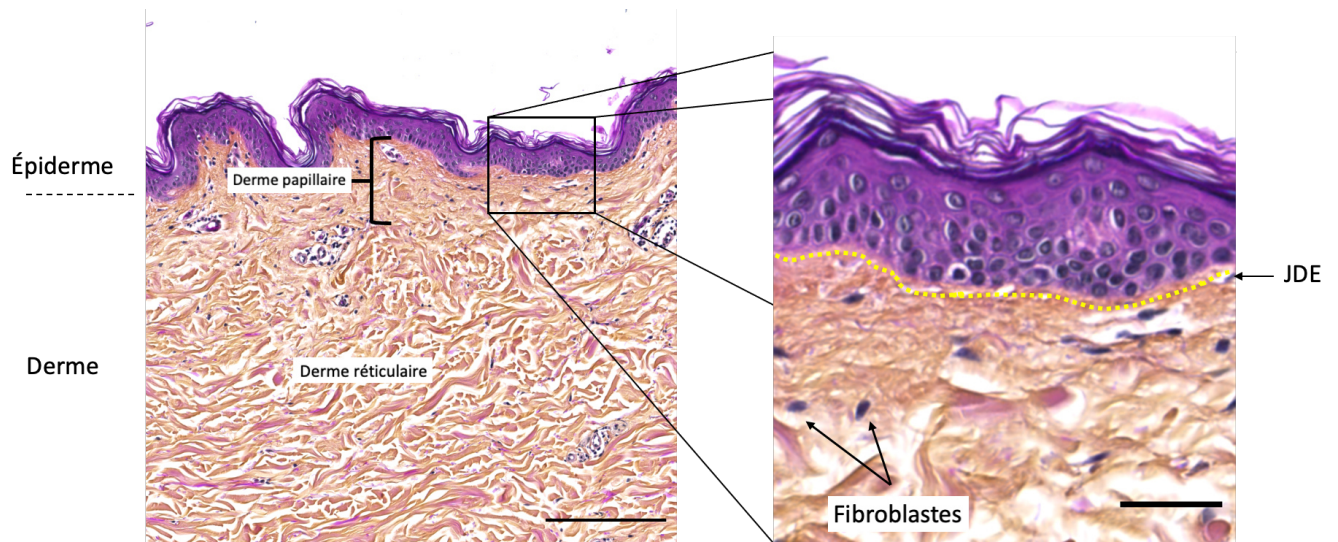


Figure 2. Coloration H&E d'une coupe de peau. À gauche, localisation du derme papillaire et du derme réticulaire (barre d'échelle : 100 µm). À droite, grossissement de la zone délimitée sur l'interface épiderme/derme avec délimitation de la JDE (jaune) (barre d'échelle : 20 µm).

1.1 L'épiderme

L'épiderme constitue la couche la plus superficielle de la peau, et en contact direct avec l'extérieur. L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié, formé majoritairement par les kératinocytes (90%). Les kératinocytes au cours de leur différenciation migrent et forment les différentes couches de l'épiderme.

Du plus profond au plus superficiel se trouvent : i) le stratum basale (= couche basale), ii) le stratum spinosum (= couche épineuse), iii) le stratum granulosum (= couche granuleuse) et iv) le stratum corneum (= couche cornée) (**Figure 3**, schéma simplifié des couches et **Figure 4**, schéma détaillé avec les différentes populations de cellules de l'épiderme). Les différentes couches restent les mêmes dans l'ensemble du revêtement cutané excepté au niveau des paumes des mains et des plantes des pieds où se développe une couche supplémentaire, le stratum lucidum que l'on ne développera pas par la suite (Yousef et al., 2020).

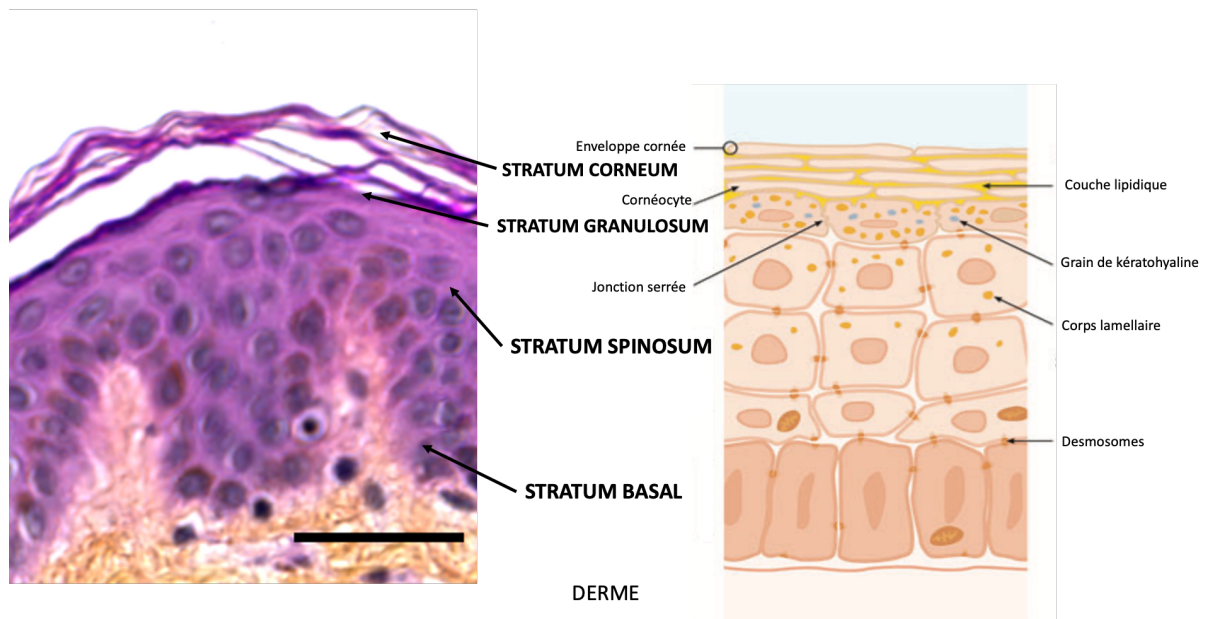


Figure 3. Les différentes couches de l'épiderme. A gauche, coloration H&E d'une coupe de peau saine (barre d'échelle : 20 μ m). A droite, schéma des différentes couches de l'épiderme. Adaptée de (Proksch et al., 2009)

i) La couche basale

Il est question ici de la couche la plus profonde, ancrée au derme par la membrane basale grâce aux hémidesmosomes. Cette couche est constituée de kératinocytes indifférenciés de forme cubique reliés entre eux par des desmosomes. Dans cette couche, des cellules souches épidermiques vont proliférer afin d'assurer le renouvellement de l'épiderme. On y trouve les corps cellulaires de mélanocytes (5% de la population totale de la couche basale).

ii) La couche épineuse

La couche épineuse contient 8 à 10 couches de cellules de forme polygonale reliées entre elles par des desmosomes, eux-mêmes reliés aux tonofilaments du cytosquelette (filaments intermédiaires de kératine 1 et 10). C'est également dans la couche épineuse que se situent les cellules de Langerhans, cellules immunitaires appartenant à la famille des cellules dendritiques.

iii) La couche granuleuse

La couche granuleuse est composée de 3 à 5 couches de cellules en forme de diamant, contenant des granules de kératohyaline et des granules lamellaires. Les grains de kératohyaline contiennent des précurseurs de kératine qui, au fur et à mesure de la différenciation cellulaire,

finissent par s'agréger pour former des faisceaux. Les granules lamellaires contiennent des glycolipides qui vont être sécrétés à la surface des cellules formant alors un ciment maintenant les cellules entre elles.

iv) La couche cornée

La couche cornée est la couche la plus superficielle et contient entre 20 et 30 couches de cellules appelées cornéocytes. Il s'agit de l'état de différenciation terminale des kératinocytes. Les cornéocytes sont des cellules anucléées, reliées par des desmosomes nommés cornéodesmosomes et dont le volume cytoplasmique est essentiellement occupé par des molécules de kératine (Simpson et al., 2011). Cette couche est la première protection de l'épiderme, c'est la première zone de contact avec l'environnement extérieur.

Le renouvellement de l'épiderme est constant et nous verrons plus loin que le maintien de l'homéostasie de l'épiderme par les cellules souches épidermiques s'effectue via un processus de renouvellement qui dure en moyenne 30 jours.

On trouve dans l'épiderme de nombreuses terminaisons nerveuses et une absence de système lymphatique et de vaisseaux sanguins, l'apport en nutriments se faisant par imbibition en provenance du derme (Braverman, 2000).

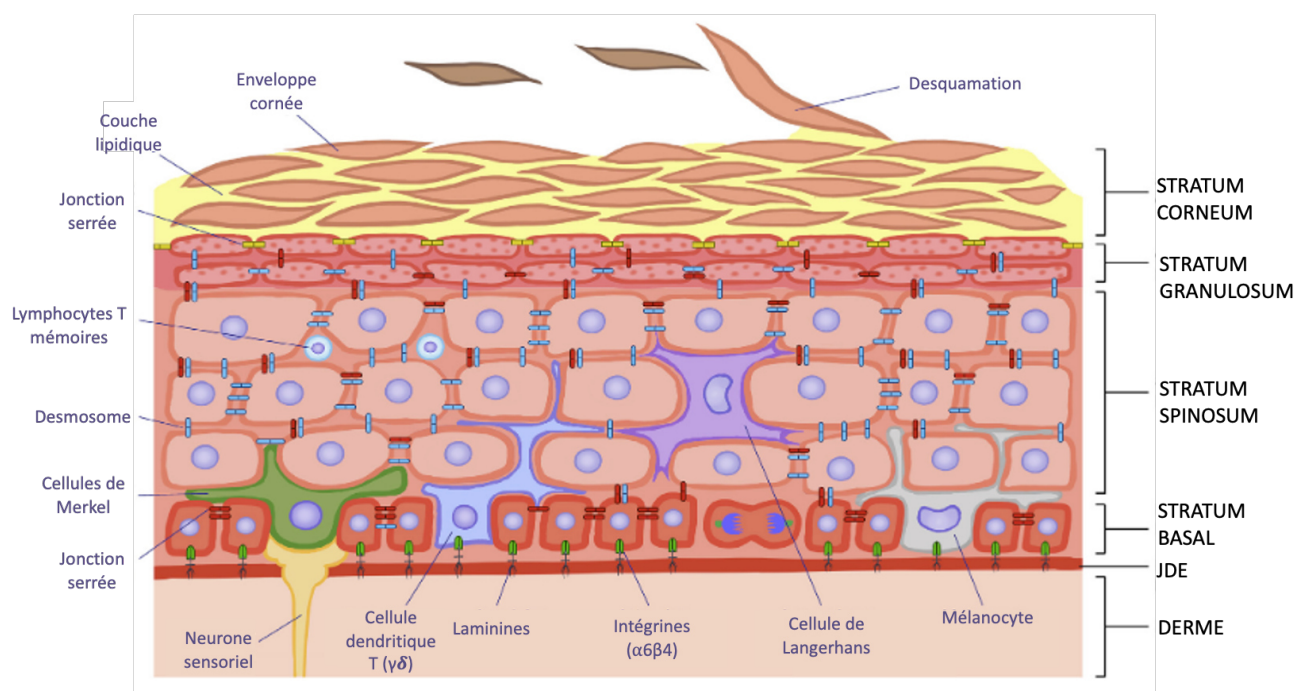


Figure 4. Schéma détaillé de l'épiderme avec l'ensemble des populations cellulaires. Traduit de (Gonzales and Fuchs, 2017)

1.2 Derme

Le derme est situé sous l'épiderme, compartimenté par la membrane basale ou jonction dermo-épidermique. Le derme est un tissu conjonctif composé de 2 couches : le derme papillaire et le derme réticulaire (Yousef et al., 2020) Les cellules sont non jointives et entourées d'une matrice extracellulaire très développée (**Figure 2**). Les fibroblastes sont les cellules majoritaires du derme et les principales cellules synthétisant les protéines de la matrice extracellulaire (Brown and Krishnamurthy, 2020). Celle-ci est principalement composée de fibres de collagènes, de tissu élastique et de liquide interstitiel (eau, sels minéraux et glycoprotéines). On observe également dans le derme de nombreux vaisseaux sanguins ou lymphatiques, des terminaisons nerveuses ainsi que des annexes cutanées (follicules pileux et des glandes) (Brown and Krishnamurthy, 2020) (**Figure 1**).

Le derme joue un rôle majeur dans le maintien des propriétés mécaniques de la peau. La structure du derme, notamment les papilles dermiques et également les fibres de collagènes et élastiques, confèrent au derme et à la peau son élasticité et sa résistance (Langton et al., 2017).

1.3 Hypoderme

L'hypoderme est un tissu conjonctif situé sous le derme, richement vascularisé et innervé. L'hypoderme est principalement composé d'adipocytes organisés en lobules maintenus par un tissu conjonctif. Ce réservoir énergétique a un rôle essentiel dans la thermorégulation ainsi que dans la protection des structures sous-jacentes (Abdallah et al., 2017).

L'hypoderme ne sera pas plus développé, n'étant pas intégré dans mon travail de thèse.

2. Les cellules & les annexes cutanées

❖ Les cellules de l'épiderme et du derme

L'ensemble des cellules résidentes sont détaillés ci-dessous, **Tableau 1**, ainsi qu'en **Figure 5**. Leur localisation dans la peau est indiquée **Figure 6**.

Tableau 1. Cellules résidentes de la peau.

| Cellules | Rôles | Références |
|-------------------------------|---|--|
| Épiderme | | |
| Kératinocytes | Cellules majoritaires de l'épiderme ; forment l'épithélium kératinisé constituant l'épiderme | (Yousef et al., 2020) |
| Mélanocytes | Cellules Photo-protectrices : spécialisées dans la synthèse de mélanine, pigment naturel de la peau | (Wulf et al., 2004) |
| Cellules de Langherans | Cellules dendritiques de l'épiderme (2-4% de l'épiderme). Étendent leurs ramifications entre les kératinocytes Cellules présentatrices d'antigènes pouvant migrer jusqu'aux ganglions pour présenter l'Ag aux LT naïfs. | (Strid et al., 2009; Tay et al., 2014) |
| Cellules de Merkel | Rôle mécanorécepteur et transmission informations aux terminaisons nerveuses | (Yousef et al., 2020) |
| Lymphocytes T mémoires | Lymphocytes mémoires, résidants dans une zone précédemment infectée, spécifiques d'un virus | (Heath and Carbone, 2013) |
| Derme | | |
| Fibroblastes | Synthétisent et sécrètent la majorité des composants la matrice du derme et participent à son renouvellement en synthétisant les MMP, enzymes de dégradation ainsi que leurs inhibiteurs | (Rippa et al., 2019) |

| | | |
|---------------------------------------|---|---|
| Cellules dendritiques du derme | <p>Cellules phagocytaires. Population très hétérogène.</p> <p>Cellules présentatrices d'antigènes (CPA) : migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques pour présenter l'antigène aux LT naïfs</p> <p>Participe à la génération d'une immunité adaptative contre les pathogènes et à la tolérance aux auto-antigènes.</p> | (Tay et al., 2014) |
| Macrophages | <p>Population hétérogène de phagocytes mononuclés.</p> <p>Population clé agissant comme sentinelle lors d'une invasion de pathogène ou lors d'un dommage</p> <p>Population de cellules hématopoïétique la plus importante en condition physiologique : rôle dans le maintien de l'intégrité et des fonctions de la peau.</p> <p>Peuvent produire une grande variété de cytokines et chémokines.</p> | (Tay et al., 2014) |
| Mastocytes | <p>Localisés principalement à proximité des vaisseaux sanguins du derme</p> <p>Participent à la défense contre les pathogènes, pendant la cicatrisation cutanée ; rôle pro et anti-inflammatoire.</p> <p>Implication dans les allergies : possèdent un récepteur spécifique au IgE dont l'activation est responsable du phénomène de dégranulation des mastocytes.</p> | (Tay et al., 2014) |
| Lymphocytes T mémoires | <p>Lymphocytes T mémoires résidents, antigène-spécifiques pouvant notamment reconnaître des antigènes dérivant d'agent infectieux.</p> <p>Permet une réponse immunitaire rapide lors d'une 2^{ème} infection.</p> | (Heath and Carbone, 2013) |
| Cellules endothéliales | <p>Forment les systèmes vasculaires sanguins et lymphatiques</p> | (Braverman, 2000; Skobe and Detmar, 2000) |

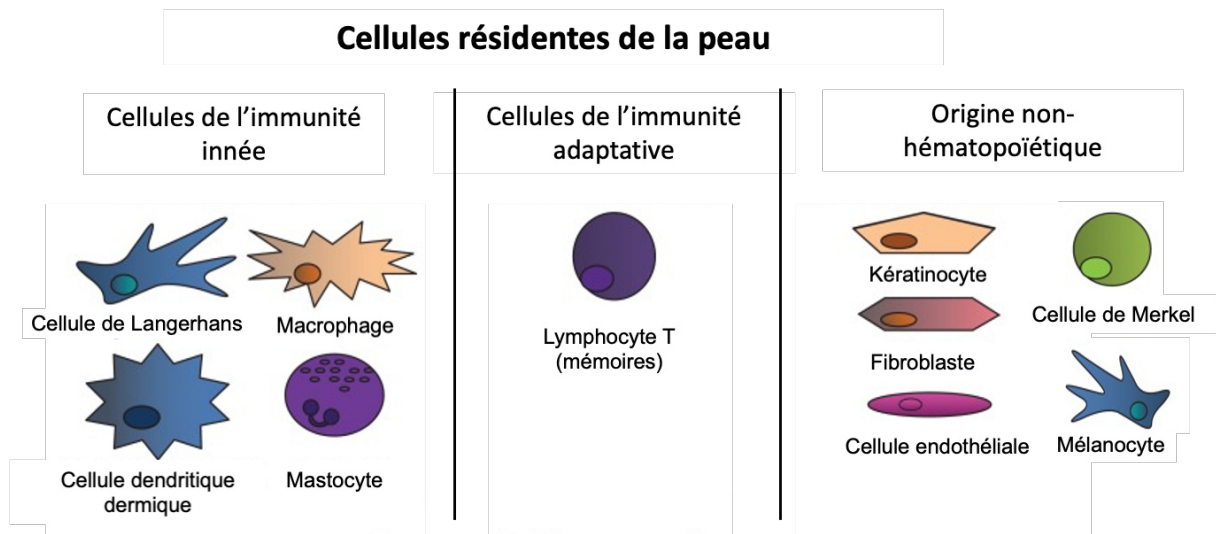


Figure 5. Cellules résidentes de la peau. Adaptée et traduit de (Richmond and Harris, 2014)

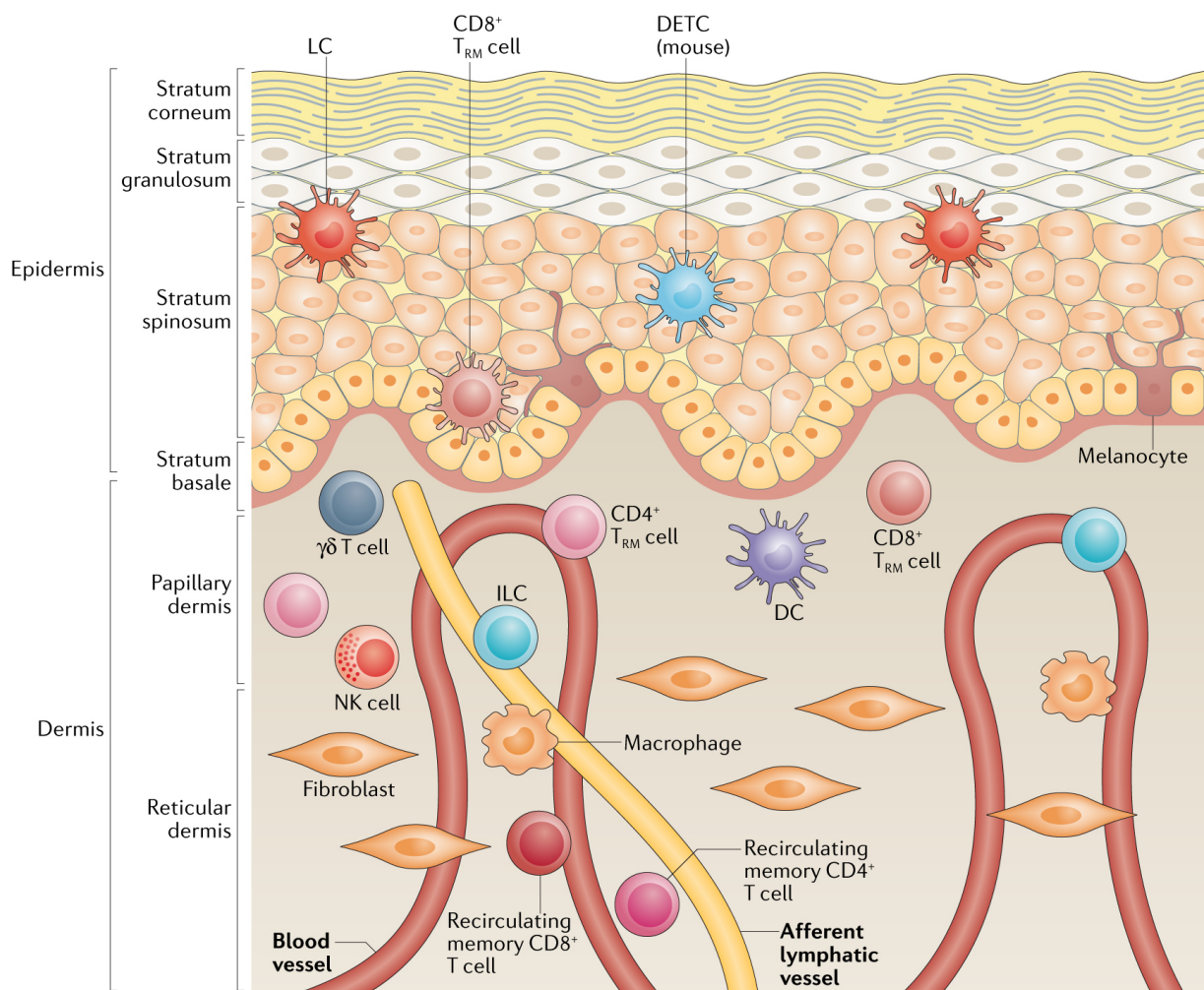


Figure 6. Répartition des cellules de la peau. Modifiée et traduite de (Ho and Kupper, 2019)

❖ Les annexes cutanées

On trouve dans la peau différentes annexes cutanées : les follicules pileux, les glandes sudoripares, les glandes sébacées (**Figure 7**) qui participent notamment à la thermorégulation (sécrétion de la sueur) et à la sécrétion de sébum.

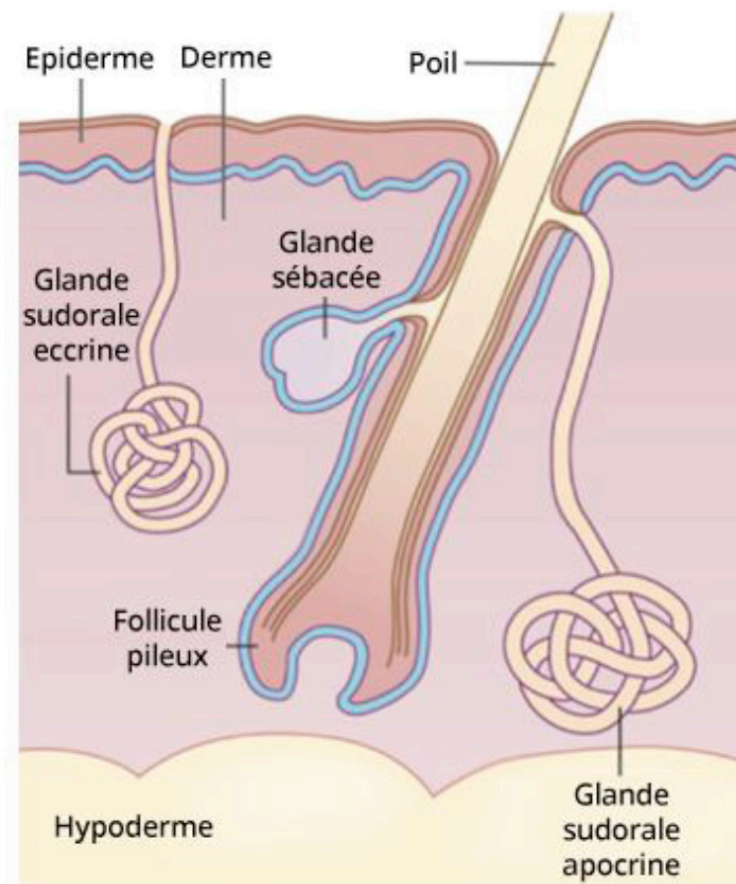


Figure 7. Schéma des annexes cutanées : follicule pileux, glande sébacée, glandes sudoripares (apocrine ou eccrine) (Twarog, 2017).

❖ Fibres nerveuses

La peau est également innervée par différents types de fibres nerveuses : sensorielles et autonomes. Les fibres nerveuses autonomes sont principalement situées dans le derme au niveau des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des glandes et des follicules pileux. Elles vont pouvoir moduler leur activité après la réception de stimulus. Les fibres sensorielles innervent toutes les couches de la peau et ont pour fonction générale de transmettre à l'aide de récepteurs spécifiques des informations telles que la pression mécanique (via des mécanorécepteurs), la

douleur (via des nocicepteurs), la température (via des thermorécepteurs) (Laverdet et al., 2015).

3. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire, ensemble protéique/moléculaire entourant les cellules du derme, occupe une place importante dans le maintien de la structure et de l'intégrité de la peau. Elle participe également aux échanges avec les cellules.

Nous allons décrire brièvement : i) la JDE, une zone spécifique de la matrice extracellulaire permettant l'ancrage de l'épiderme au derme, ii) les protéines du derme.

3.1 JDE/ membrane basale

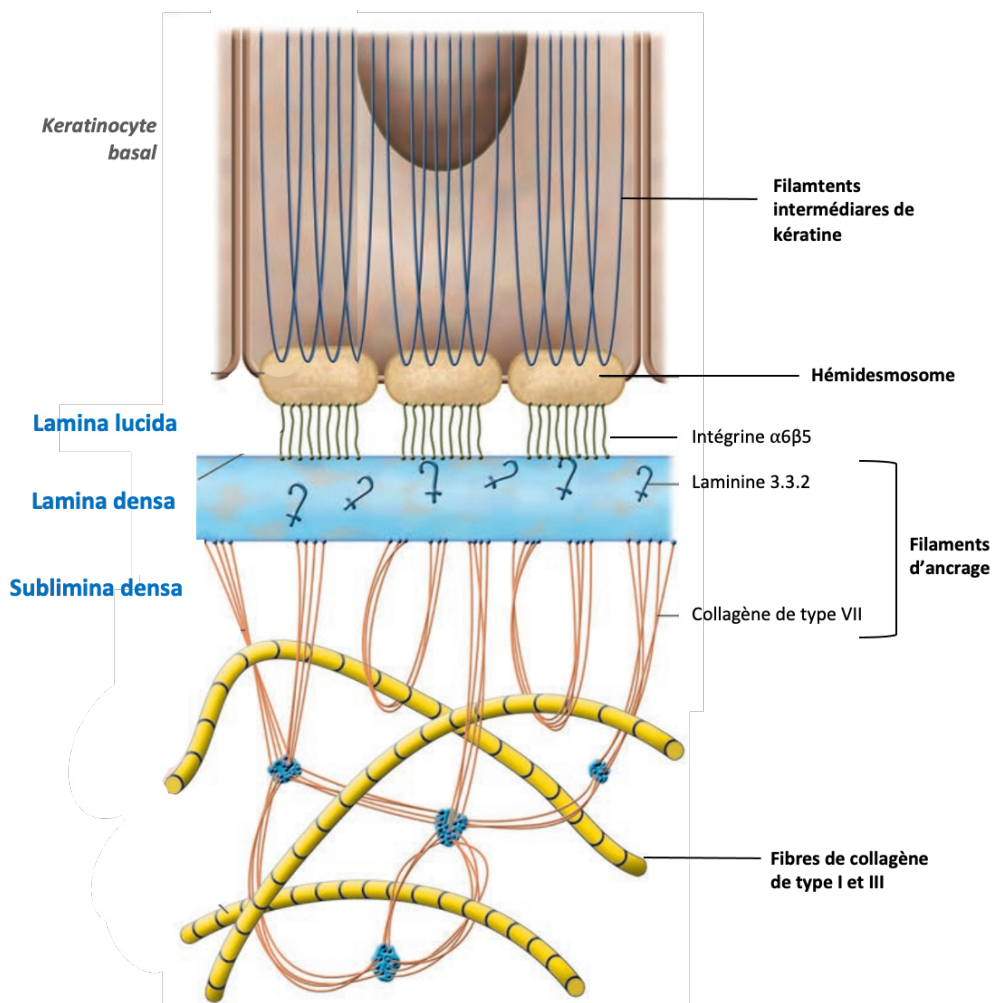


Figure 8. Représentation simplifiée de la structure de la JDE. Adaptée de (Yancey, 2005)

La jonction dermo-épidermique (JDE) est une membrane basale localisée à l'interface entre l'épiderme et le derme. Il s'agit d'une matrice extracellulaire hautement spécialisée, principalement sécrétée par les kératinocytes de la couche basale mais également par les fibroblastes du derme papillaire. Cette zone peut être divisée en différentes régions : i) les hémidesmosomes reliant la membrane plasmique des cellules de la couche basale de l'épiderme aux structures sous-jacentes, ii) la lamina lucida, traversée par des laminines qui relient les cellules au derme, iii) la lamina densa, constituée de laminines, collagène IV et protéoglycanes, et iv) la zone fibrillaire, qui contient des filaments d'ancrage de **collagène de type VII** (Breitkreutz et al., 2009) (**Figure 8**).

La membrane basale va permettre l'ancrage de la couche basale, et plus globalement de l'épiderme dans le derme. Les hémidesmosomes permettent de rattacher les filaments de kératines présents dans les kératinocytes à intégrine $\alpha 6\beta 4$, une protéine kératinocytaire transmembranaire (dans la zone lamina lucida). Cet ensemble interagit avec la laminine 3.3.2 (dans la lamina lucida) (Breitkreutz et al., 2013). Les fibrilles d'ancrage, comme le collagène VII, s'étendent de la lamina densa jusqu'au derme papillaire, permettant ainsi de rattacher la membrane basale aux fibres de collagène du derme. Ainsi, le **collagène de type VII** joue un rôle essentiel dans la stabilisation de la fixation de la zone membranaire cutané-basale au derme sous-jacent (Xue and Jackson, 2015). Comme mentionné plus haut, le rôle principal de la JDE est l'ancrage de l'épiderme. Mais elle va également contrôler les échanges moléculaires entre le derme et l'épiderme et déterminer la polarité des cellules de la couche basale. En effet, l'adhérence cellulaire induite par les intégrines contrôle la transcription de nombreux gènes impliqués dans la croissance et la différenciation des kératinocytes (O'Toole, 2001).

Par ailleurs la JDE exerce des fonctions essentielles dans les processus de cicatrisation cutanée en servant de support pour la migration des kératinocytes lors de la fermeture de la plaie (Iorio et al., 2015).

3.2 Protéines du derme

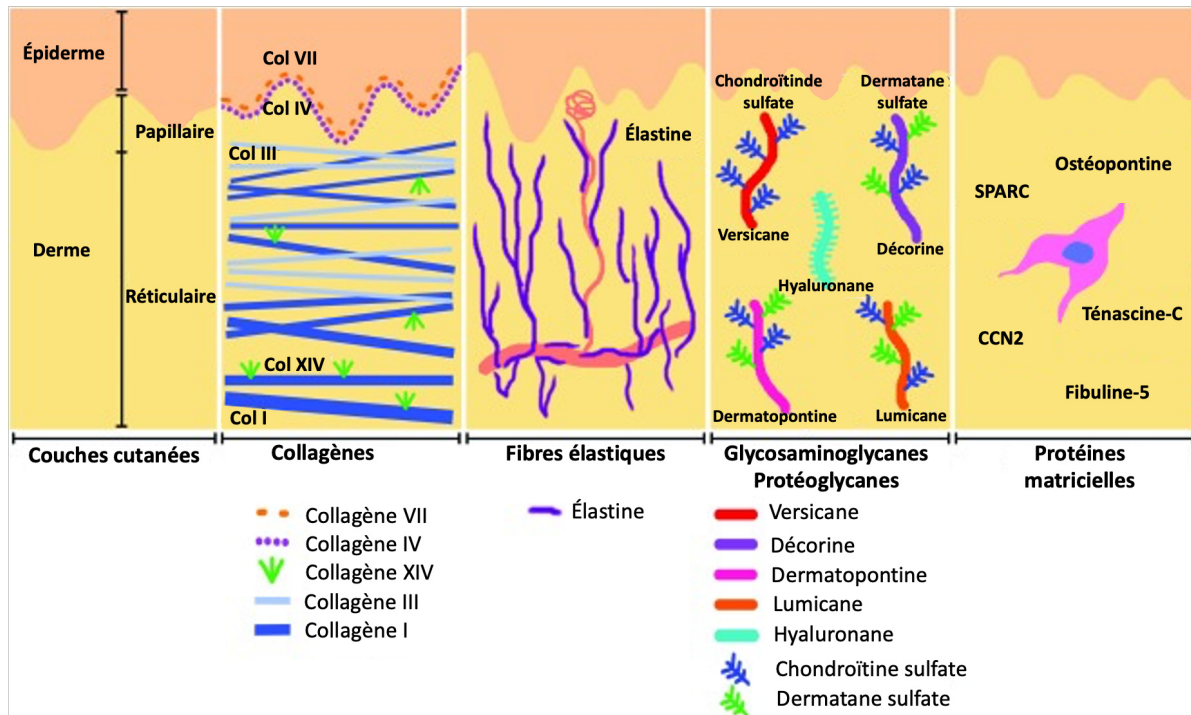


Figure 9. Composants de la matrice extracellulaire du derme. Présence de fibres de collagènes déterminant la rigidité mécanique de la peau, et de fibres élastiques conditionnant les propriétés élastiques de la peau. Les protéoglycane et les glycoprotéines créent un espace interstitiel hydraté osmotiquement actif. Les protéines matricielles ne contribuent pas à la structure mécanique de l'ECM mais agissent plutôt comme des molécules de signalisation paracrine. Traduit de (Tracy et al., 2016)

Le derme est un tissu conjonctif, donc majoritairement composé d'une matrice extracellulaire. Les collagènes sont la principale composante, représentant 90% de la MEC. Ils vont former un réseau entremêlé à des fibres élastiques et entouré d'un liquide interstitiel formé de protéoglycane, glycoprotéines, d'eau et d'acide hyaluronique (**Figure 9**). Le réseau de protéines fibreuses sert de soutien architectural tridimensionnel.

La MEC diffère entre le derme papillaire et le derme réticulaire. En effet, dans le derme papillaire, les fibres de collagènes sont minces et peu organisées, alors qu'elles sont très épaisses et très finement organisées dans le derme réticulaire (Tracy et al., 2016).

Sur les 29 collagènes découverts, 14 sont détectés dans la peau (Sherman et al., 2015). On retrouve principalement du **collagène de type I** (60-80%) et du **collagène de type III** (15-25%) (Bode; Brown and Krishnamurthy, 2020; O'Toole, 2001; Watt and Fujiwara, 2011; Xue and Jackson, 2015). Ces collagènes forment des fibres qui vont exercer un rôle majeur dans la résistance cutanée aux tensions (O'Toole, 2001), ainsi que le maintien de la structure du derme et, de manière générale, de l'intégrité de la peau (Xue and Jackson, 2015). De manière

simplifiée : un gène codant pour le procollagène va être transcrit. Des modifications post traductionnelles et une sécrétion extracellulaire du procollagène conduisent ensuite à la formation de fibres de collagène (**Figure 10**) (Gelse et al., 2003).

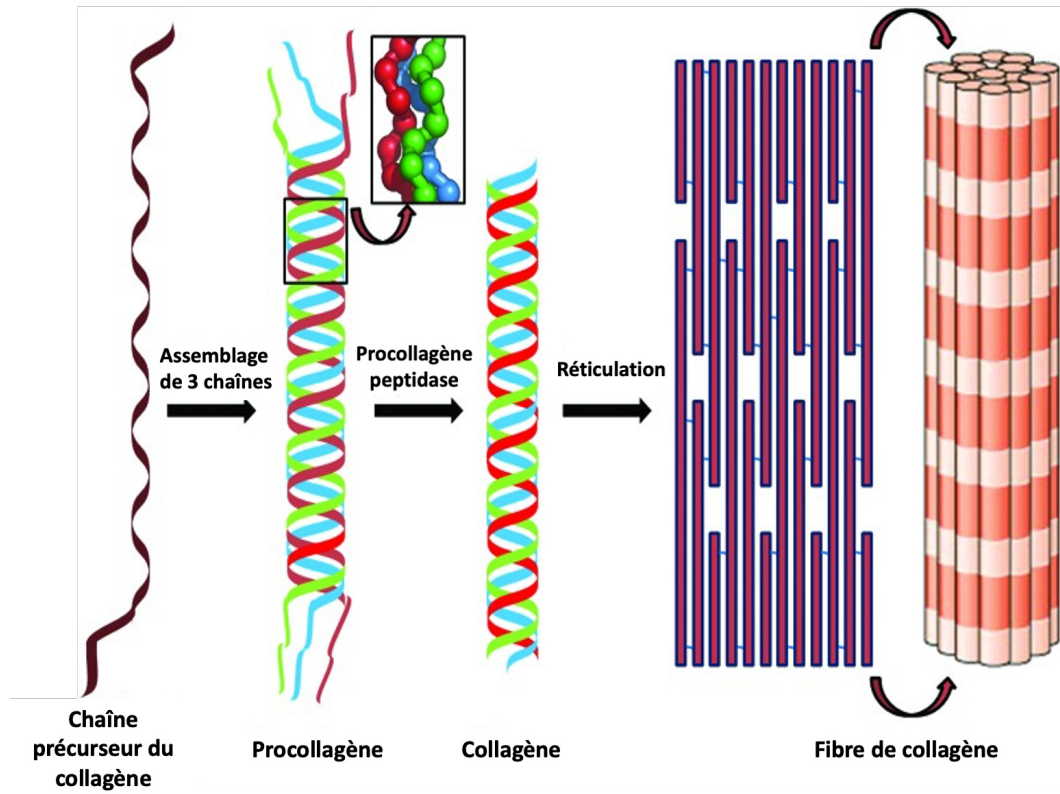


Figure 10. Le processus d'assemblage de la fibre de collagène. Traduit de (Xue and Jackson, 2015)

Lors de la formation de collagène III, les modifications post-traductionnelles du **procollagène III** entraînent la libération de différents peptides, notamment le **peptide PIINP** (**Figure 11**). Ce peptide étant présent lors de la sécrétion du procollagène III puis détruit après le clivage, un immunomarquage de du peptide PIINP permet alors d'observer la synthèse de collagène III.

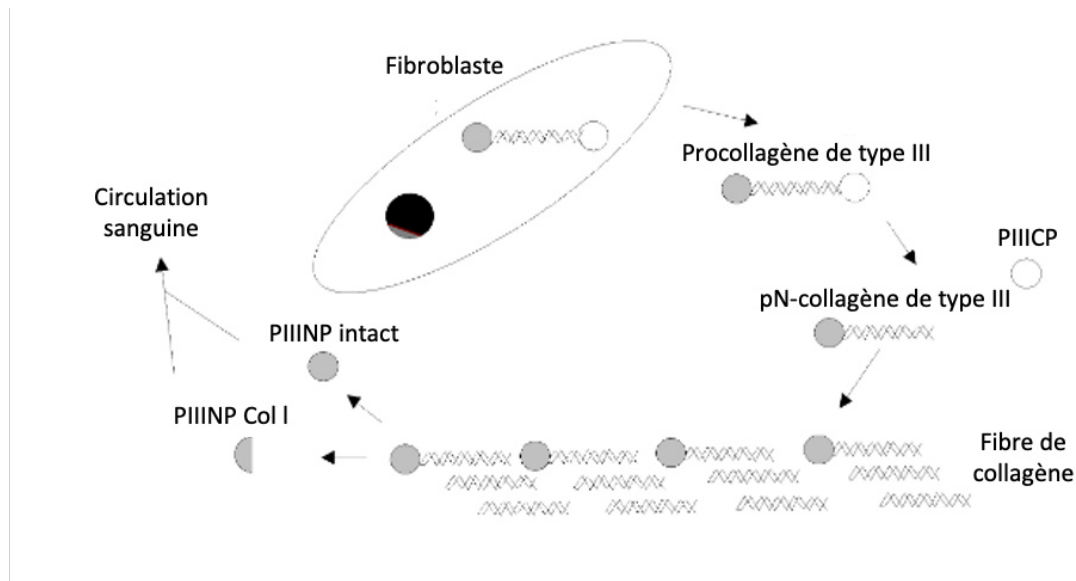


Figure 11. Métabolisme des fibrilles de collagène de type III. (Bode)

Les protéines dans le derme sont nombreuses (**Figure 9**). Les collagènes non fibrillaires vont permettre par exemple aider à l'organisation des autres fibres de collagènes. (Tracy et al., 2016). Des protéines matricielles sont également présentes dans la MEC, il s'agit d'un groupe récemment décrit de protéines locales sécrétées interagissant dans la signalisation autocrine ou paracrine de la matrice cellulaire tout en ne contribuant pas de manière significative à la structure mécanique de la MEC (**Figure 9**).

Les kératinocytes ont également un rôle important dans le renouvellement de la MEC en participant à sa dégradation par l'expression et la sécrétion de métalloprotéinases matricielles (MMP) en réponse à des signaux (cytokines, facteurs de croissance, hormones). Les kératinocytes peuvent synthétiser la MMP-A, MMP-2 et MMP-9 (Abdallah et al., 2017; O'Toole, 2001). Lors de la cicatrisation cutanée, il est nécessaire de dégrader les tissus endommagés, les kératinocytes peuvent alors participer à cette dégradation. De plus lors de la réparation cutanée, les kératinocytes du front de migration, en bordure de plaie sont la source prédominante de collagénase interstitielle. Seules quelques molécules de la matrice sont clivées par la collagénase et dans le cadre de la cicatrisation, il s'agit probablement de collagènes natifs de type I et III (O'Toole, 2001).

4. Les kératinocytes : cellules au centre des interactions peau/ système immunitaire

Comme avons pu le voir précédemment avec la présentation des différentes couches de l'épiderme, les kératinocytes sont les cellules structurales et majoritaires de l'épiderme. Il est estimé que les kératinocytes représentent en effet 90% des cellules de l'épiderme (Abdallah et al., 2017). Nous envisagerons d'abord les mécanismes cellulaires régissant le renouvellement des kératinocytes à partir des cellules souches de la couche basale et passerons en revue les principales caractéristiques de cette catégorie de cellules souches. Les fonctions immunes des kératinocytes seront ensuite détaillées.

4.1 Différenciation dans le lignage kératinocytaire

La différenciation des kératinocytes débute au stade de cellules souches épidermiques au niveau de la couche basale et s'achève au stade de cornéocyte au niveau de la couche la plus superficielle de l'épiderme. Les différentes couches de l'épiderme décrites plus haut correspondent ainsi à différentes phases de différenciation au sein du lignage kératinocytaire (Figure 12). La peau se renouvelle durant le processus de différenciation des kératinocytes, processus qui dure en moyenne 30 jours :

- i) Dans la majorité des cas, des divisions cellulaires asymétriques se produisent dans la couche basale (voir détail ci-dessous), l'une des deux cellules filles va migrer vers la couche supérieure alors que l'autre cellule fille reconstitue le pool de cellules souches
- ii) Les cellules migrent dans la couche épineuse et commencent à synthétiser des molécules de kératohyaline.
- iii) Les cellules migrent ensuite dans la couche granuleuse, elles s'aplatissent, adoptent une forme dite « en diamant » et présentent une accumulation cytoplasmique de grains de kératohyaline.
- iv) Au dernier stade de différenciation correspondant à l'état de cornéocyte, les kératinocytes deviennent anucléés s'aplatissent au fur et à mesure de leur migration vers la couche la plus superficielle et perdent leurs organelles. Leur cytoplasme renferme des structures fibrillaires composées de molécules de kératine et de kératohyaline. Une coque protéique, appelée enveloppe cornée, prend la place de la membrane plasmique. Cette enveloppe sert de support aux lipides extracellulaires qui forment le ciment (ou ciment selon les auteurs) intercornéocytaire (Simpson et al., 2011). Les cornéocytes qui ne sont pas en contact direct avec l'interface peau/air, sont reliée par de nombreux desmosomes nommés cornéodesmosomes. Les protéines et lipides de la couche cornée

sont sensibles aux modifications biochimiques induites par l'environnement. On peut considérer que les cornéocytes sont "actifs" (en tous cas réactifs) malgré la perte de leur noyau et organelles (Quaresma, 2019; Yousef et al., 2020). De plus, de par leur fonction de barrière, ils participent aux défenses immunitaires (Quaresma, 2019; Yousef et al., 2020).

- v) Les cornéocytes atteignant la surface épidermique vont être éliminées par protéolyse enzymatique des desmosomes : c'est le processus de desquamation (Yousef et al., 2020). Des frictions mécaniques permettent alors le décollement et l'élimination des cellules. Certains auteurs désignent sous le terme de "couche desquamante" la couche cellulaire la plus superficielle de l'épiderme.

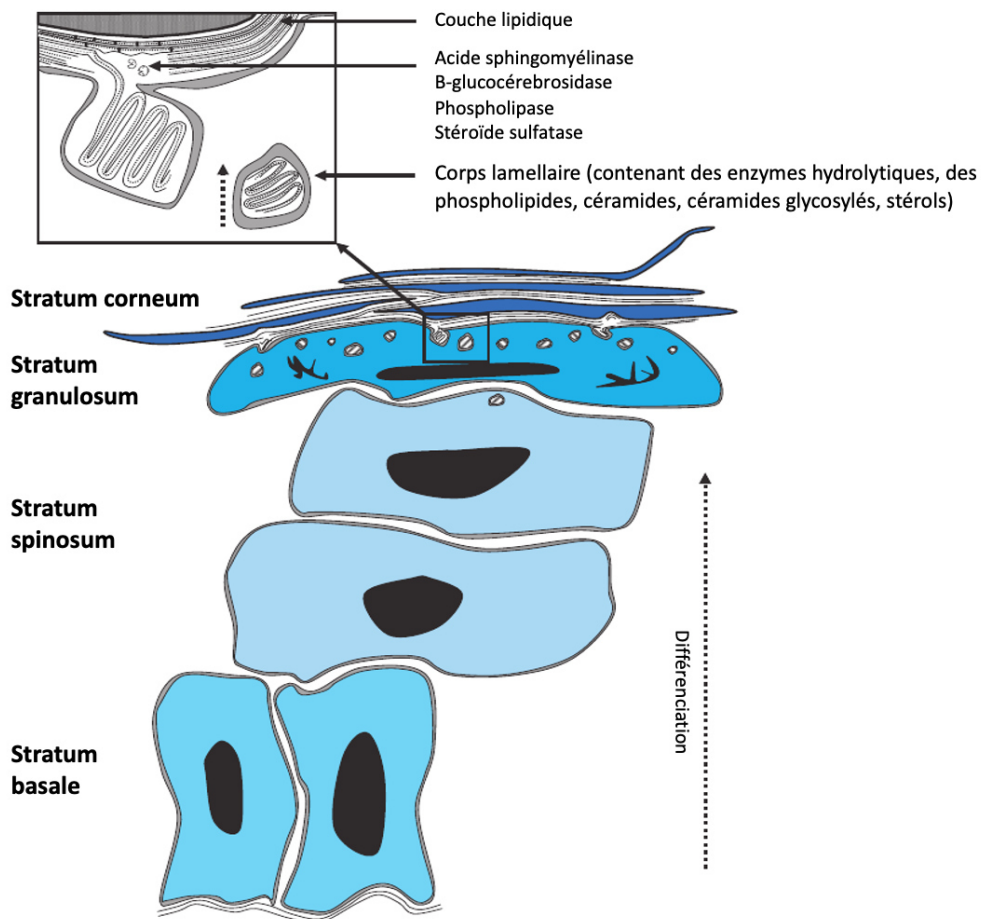


Figure 12. Formation de la couche lipidique à l'interface stratum granulosum/stratum corneum : extrusion du contenu des corps lamellaires à l'interface entre couche granulaire et couche cornée. Traduit de (Proksch et al., 2008).

Le processus de différenciation s'effectue constamment afin de maintenir une barrière efficace, d'où l'importance des cellules souches (CS) épidermiques qui vont avoir un rôle essentiel dans l'homéostasie de la peau mais également suite à une blessure lors de la cicatrisation.

4.2 Cellules souches épidermiques

Pour rappel, les cellules souches sont des cellules possédant une durée de vie longue, sont capables d'auto-renouvellement et peuvent se différencier en cellules matures, spécialisées. Les CS sont généralement maintenues dans un état quiescent et leur entrée en cycle cellulaire est étroitement contrôlée du fait de leur fort potentiel mitotique. Elles résistent également à l'apoptose.

Les CS épidermiques présentent l'ensemble des caractéristiques communes à l'ensemble de cellules souches, et se différencient exclusivement en kératinocytes *in vivo*. Elles sont dites unipotentes. Leur potentiel de différenciation *in vitro* est toutefois plus large puisqu'elles peuvent générer des cellules glandulaires de glandes mammaires, de glandes lacrymales, sébacées ou salivaires.

Les CS qui entrent en cycle cellulaire suivent un processus de division qui peut être symétrique ou asymétrique (**Figure 13**). Il est maintenant admis que la division s'effectue le plus souvent de manière asymétrique (84%). Une des cellules filles est identique à la cellule mère et va rester localisée dans la niche des cellules souches épidermiques (c'est-à-dire en contact avec la JDE) alors que l'autre cellule fille va migrer dans la couche supérieure. Cette cellule, appelée cellule d'amplification transitoire ("transit amplifying cell" en anglais) ou cellule progénitrice, va se diviser plusieurs fois avant de commencer à maturer. La cellule progénitrice issue de la CS, va se diviser de manière symétrique et former ainsi un groupe de cellules identiques (Clayton et al., 2007; Watt and Fujiwara, 2011).

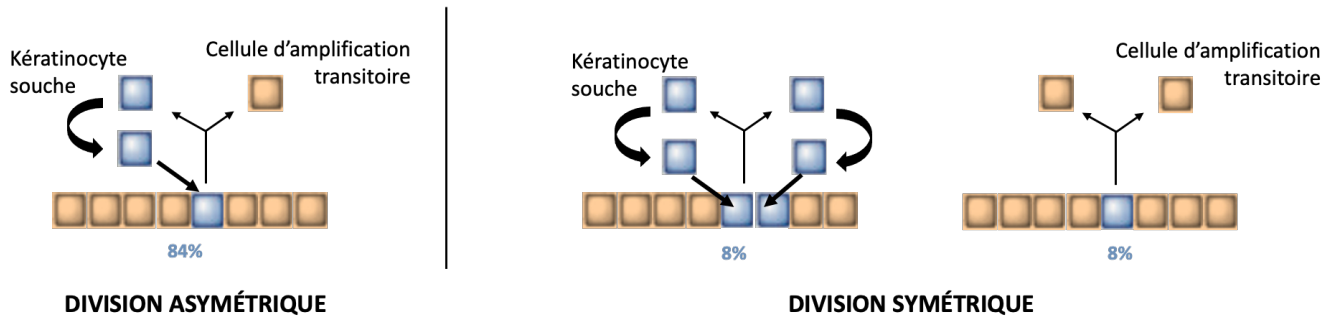


Figure 13. Divisions de la cellule souche épidermique : asymétrique ou symétrique. La division asymétrique (84%) reproduit une cellule souche et produit une cellule d'amplification transitoire. La division symétrique produit deux cellules identiques, soit deux cellules souches (8%) soit deux cellules d'amplification transitoire (8%).

On observe des CS épidermiques au niveau du renflement des follicules pileux, mais également à proximité des glandes sébacées et dans l'épiderme interfolliculaire, au niveau de la couche basale de l'épiderme, où elles sont réparties le long de la jonction épidermique (Watt and Fujiwara, 2011) (**Figure 14**). Les CS du renflement des follicules pileux servent de réservoir pour les cellules souches épidermiques (Blanpain and Fuchs, 2006).

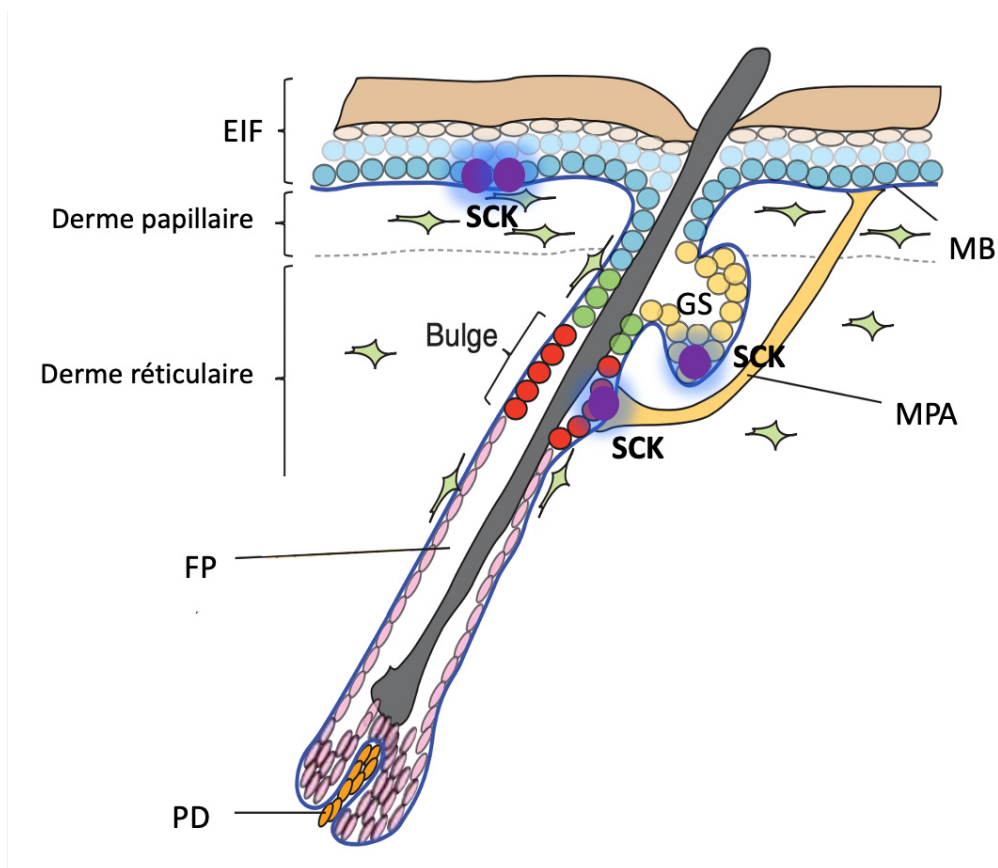


Figure 14. Localisation des cellules souches épidermiques. Niches : le bulge du follicule pileux, l'épiderme inter folliculaire, enfin la glande sébacée. SCK : Cellules souches épidermiques ; EIF : épiderme interfolliculaire; MB : membrane basale ; FP : follicule pileux; GS : glande sébacée; PD : papille dermique ; MPA : muscle pilo arrecteur - les différentes (Watt and Fujiwara, 2011)

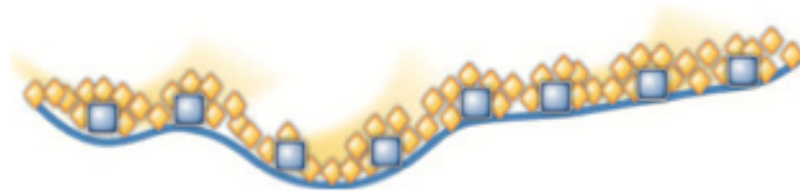


Figure 15. Répartition des cellules souches épidermiques interfolliculaires au niveau de la couche basale avec des cellules d'amplification transitoire (Dahl, 2012).

Nous allons nous intéresser plus particulièrement aux CS interfolliculaires, situées dans la couche basale et qui ont un rôle direct et plus important dans le renouvellement de la peau. Elles constituent environ 4 à 10 % des cellules basales de l'épiderme (**Figure 15**). La cellule amplificatrice transitoire issue de CS épidermique perd son adhérence à la membrane basale. Une colonne cellulaire va alors se former avec la montée des cellules d'amplification et de leur progénie dans les couches supérieures (Figure 16). On retrouve dans ces colonnes les différentes composantes cellulaires des couches épidermiques. Le maintien de l'homéostasie de la peau dépend alors de la division asymétrique des CS qui va permettre de fournir les kératinocytes permettant le renouvellement de la peau (Dahl, 2012). En revanche en condition de blessure cutanée une augmentation du nombre de CS est obtenue par augmentation des divisions symétriques.

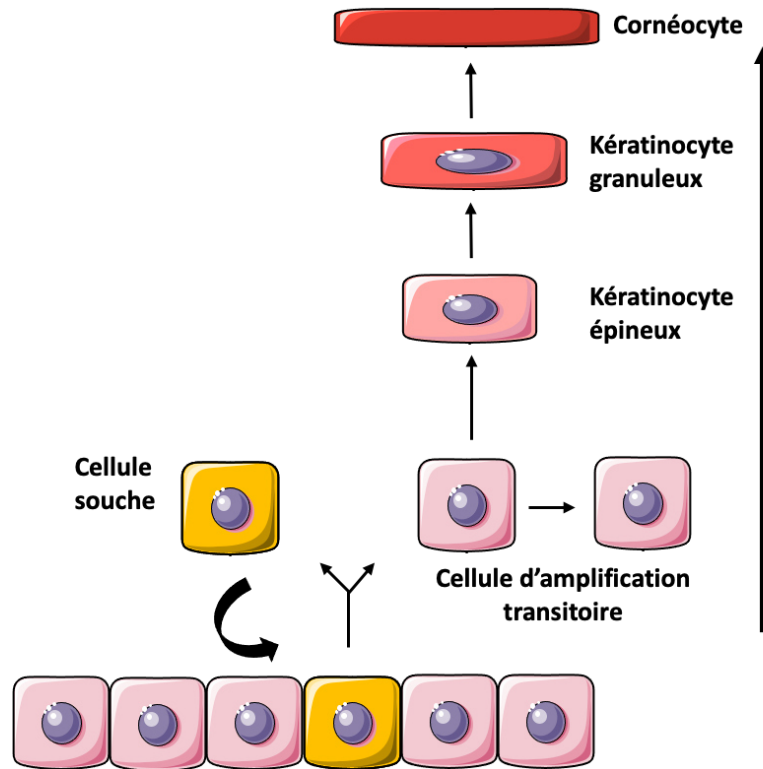


Figure 16. De la division asymétrique d'une cellule souche épidermique à la formation d'une cornéocyte. La division asymétrique conduit à la formation d'une cellule souche et d'une cellule d'amplification transitoire. La cellule d'amplification transitoire va se différencier en progressant dans les couches de l'épiderme pour devenir un kératinocyte granuleux, un kératinocyte granuleux puis en cornéocyte. Adaptée de (Piccerelle)

Le maintien de l'état souche des CS est essentiellement due à des facteurs extrinsèques liés au microenvironnement des CS. Ce sont les signaux délivrés au niveau de la niche des CS qui vont déterminer le maintien en quiescence ou l'entrée en cycle cellulaires des CS. Des modifications moléculaires ou structurelles de la composition de cette niche peuvent ralentir ou accélérer la prolifération et la différenciation des CS.

Les CS épidermiques n'expriment pas des marqueurs spécifiques et il est difficile de différencier les CS des autres cellules de la couche basale. De même qu'il est impossible de distinguer formellement au plan morphologique et phénotypique les cellules d'amplification transitoire des CS. Cependant lorsqu'elles sont mises en culture, les CS vont former de larges colonies arrondies aux contours bien délimités et formées de cellules de petite taille. Ces colonies correspondent à une prolifération clonale de CS et sont nommées holoclones. Les cellules d'amplification transitoire forment rarement des clones de plus de 40 cellules ; ces colonies, nommée méroclones, ont une taille plus faible que les holoclones et un périmètre

irrégulier. Des colonies de petite taille nommées paraclones sont formées essentiellement de cellules aplaties non proliférantes (Barrandon and Green, 1987) (**Figure 17**). À partir d'une préparation cellulaire inhomogène, il est ainsi possible de mettre en évidence et de quantifier les CS *in vitro*. Dans ce test, on compte le nombre de clones [**Colony Forming Unit (CFU)**] et le pourcentage de cellules formant des clones [Colony Forming Efficiency (CFE)] après ensemencement d'une suspension de kératinocytes à faible densité (10 à 20 cellules/cm²) (Barrandon and Green, 1987). Seuls les holoclones et méroclones sont comptés.

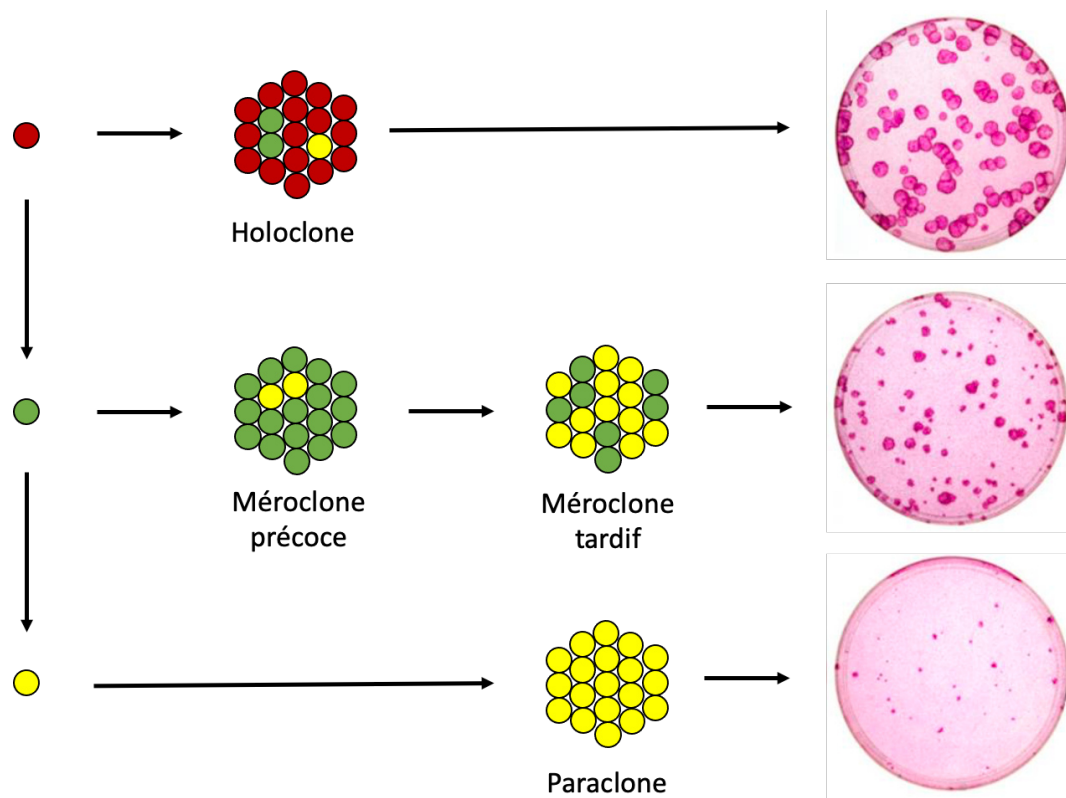


Figure 17. Aspect macroscopique et classification des colonies de kératinocytes après coloration à la rhodamine. La CS épidermique (rouge) va se diviser et donner des grandes colonies d'aspect régulier, les holoclones. Les cellules d'amplification transitoire (en vert) vont donner des colonies intermédiaires (méroclones). Les cellules différenciées (jaune) vont donner des paraclones, des petites colonies irrégulières. Modifiée de (Rochat and Barrandon, 2009).

In vivo, il est également possible d'identifier les kératinocytes mitotiquement actifs (CS en division ou cellules d'amplifications transitoires) en réalisant un **immunomarquage de Ki67** sur des coupes de peau humaine (**Figure 18**). Ki67 est un antigène présent sur une protéine exprimée pendant la prolifération et localisée au niveau des chromosomes lors de la mitose (Cuylen et al., 2016). Dans la peau humaine, les cellules amplificatrices transitoires de l'épiderme ne peuvent se diviser qu'environ cinq fois (Dahl, 2012).

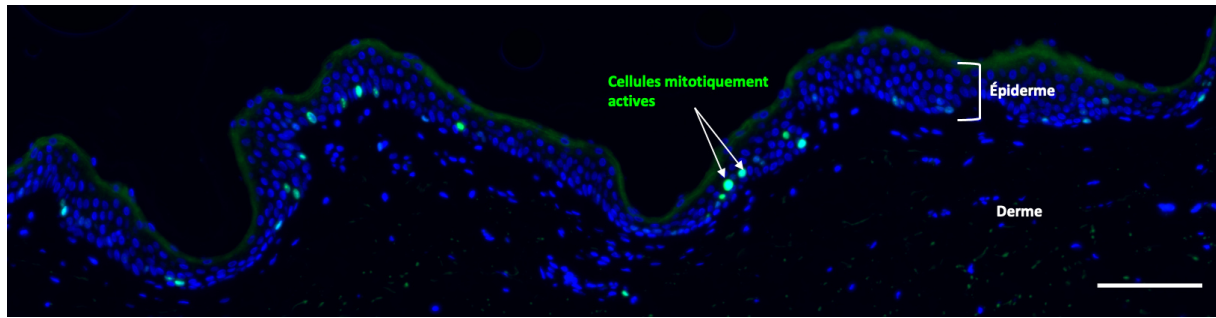


Figure 18. Identification des cellules en prolifération dans la peau humaine saine. Immunomarquage du marqueur de prolifération Ki67.

4.3 Fonctions structurales et immunitaires des kératinocytes

4.3.1 Rôle de barrière immunitaire

L'immunité définit la capacité des organismes multicellulaires à maintenir leur composition macromoléculaire en éliminant les molécules étrangères. Ainsi, pour construire un système de défense immunologique pour l'organisme, l'existence d'une barrière appropriée suffisamment efficace pour restreindre la pénétration et/ou identifier l'invasion d'un agent pathogène est essentielle. À ce titre, la peau est un organe de revêtement qui peut être considéré comme exerçant des fonctions de barrière immunitaire au même titre par exemple que les muqueuses. C'est l'épiderme qui constitue ainsi la première ligne de défense contre des agents pathogènes présents dans l'environnement extérieur. Il a pu être comparé à un mur protecteur où les briques sont les kératinocytes et le ciment les jonctions serrées (Tsepkolenko et al., 2019). Au sein de l'épiderme, c'est la couche cornée qui exerce les fonctions de barrière les plus importantes. Les cornéocytes, forment une couche de cellules jointives, reliées par des cornéodesmosomes et intégrées dans une matrice extracellulaire enrichie en lipides dont certains présentent des propriétés antibactériennes (Proksch et al., 2008)(Quaresma, 2019). C'est cette richesse en lipides antibactériens de même que le pH acide de la couche cornée qui contribuent à lui conférer des fonctions spécifiques de barrière immunitaire. Mais il est également important de souligner le rôle des cellules souches épidermiques qui vont permettre le maintien de l'homéostasie de l'épiderme assurant par conséquent l'intégrité de la barrière en condition physiologique mais également lors de la réparation des tissus (Tsepkolenko et al., 2019).

4.3.2 Immunocompétences des kératinocytes

Comme mentionné plus haut, des cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative sont présentes dans la peau à l'état physiologique, en particulier dans l'épiderme et le derme. L'immunité de la peau est également conditionnée par la présence de cellules non immunes mais qui présentent néanmoins un certain niveau d'immunocompétence.

Un nombre croissant de travaux ont ainsi mis en évidence **l'immunocompétence des kératinocytes** notamment en ce qui concerne les réponses immunitaires innées (Tsepkenko et al., 2019). L'essentiel de ces compétences immunes sont décrites ci-dessous ;

Reconnaissance des signaux danger

Les kératinocytes sont considérés comme de véritables sentinelles immunitaires (Abdallah et al., 2017). Les kératinocytes sont capables de reconnaître les agents pathogènes par des récepteurs spécifiques comme les récepteurs de type Toll (TLR pour « Toll-like receptors »). Ils vont reconnaître des PAMPs (« Pathogen Associated Molecular Patterns », motif moléculaire exprimés par les pathogènes) exprimés par des microorganismes et/ou les DAMPs ("Damage-Associated Molecular Patterns", motifs moléculaire associés à la survenue de lésions tissulaires) relargués par les cellules cutanées lésées. Les kératinocytes expriment ainsi une grande variété de TLR : TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR9 et TLR10 de manière constitutive ou inductible (Lebre et al., 2007; Pivarsci et al., 2003). L'activation des TLR kératinocytaires par les PAMPs et/ou les DAMPS est cruciale pour le déclenchement des réponses immunitaires dermiques (Quaresma, 2019).

Expression de cytokines/chémokines et autres molécules de l'inflammation

Les kératinocytes expriment un large éventail de molécules impliquées dans les réponses immunes innées, notamment : **des cytokines (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-7, G-CSF, GM-CSF, TGF- β , IL-12, IL-15, IL-16, IL-18 et IL-20)** et des chémokines (**IL-8, CXCL2, IP-10**), de facteurs de croissance (IL-6, GM-CSF et TGF- α), d'AMP (β -defensins, cathelicidines, membres de la famille S100 et sébum) (Abdallah et al., 2017; Feliciani et al., 1996; Heath and Carbone, 2013; Kanda et al., 2011; Kunz et al., 2006; Quaresma, 2019; Tsepkenko et al., 2019). Les AMP, peptides antimicrobiens font partie d'un mécanisme de défense hautement conservé des cellules eucaryotes ; ils vont être exprimés après invasion d'un agent pathogène lorsque l'épithélium est lésé (Quaresma, 2019).

On peut voir **Figure 19**, l'étendue du spectre d'expression de protéines à activité immunitaire par les kératinocytes (Tsepkenko et al., 2019).

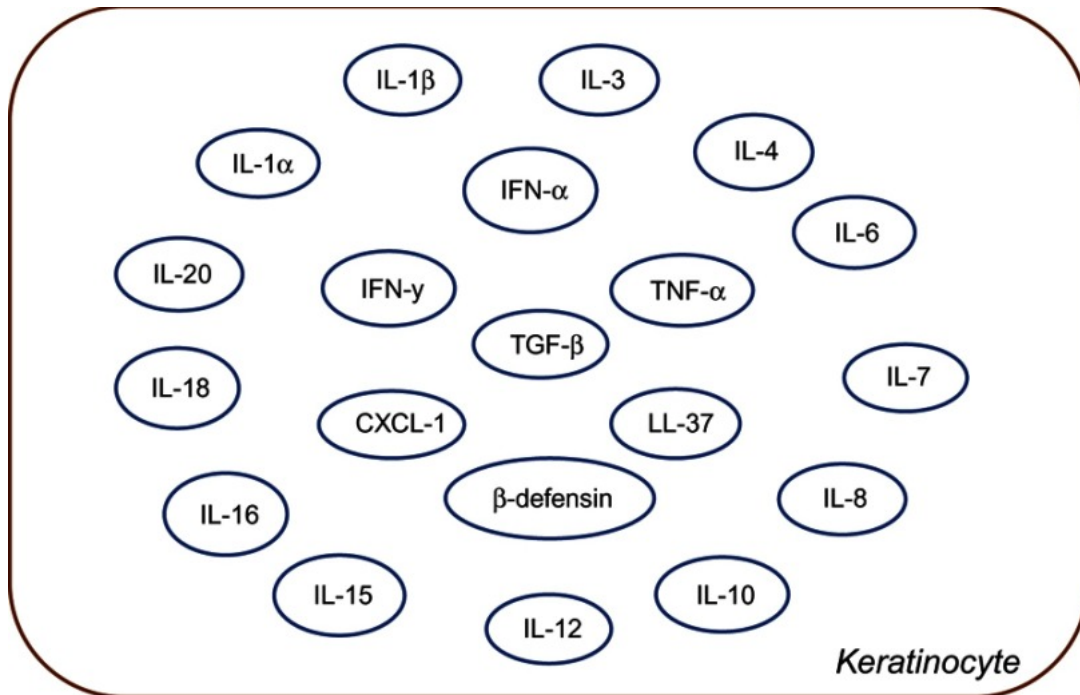


Figure 19. Représentation de diverses cytokines, chimiokines et molécules inflammatoires sécrétées par les kératinocytes après une lésion. (Tsepkenko et al., 2019)

Nous ne détaillerons pas les nombreux récepteurs aux cytokines/chimiokines exprimés par les kératinocytes.

Inflammasome

Les kératinocytes expriment les composants moléculaires de l'inflammasome (Li et al., 2020). L'inflammasome est un complexe protéique de l'immunité innée, pouvant être activé suite à la réception d'un signal danger. Ce complexe protéique est constitué d'une protéine NLR (« NOD-like receptor family»), d'une protéine d'adaptation ASC (« apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain ») qui permet de faire le lien avec une pro-caspase.

Il existe 22 types de NLR et 12 caspases exprimés par l'être humain : des caspases inflammatoires (**caspase-1**, 4 et 5) et des caspases apoptotiques (caspase-2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10).

La caspase-1 est la principale caspase inflammatoire, elle va permettre de générer des cytokines pro-inflammatoires telles que l'**IL-1 β** et l'**IL-18**.

L'activation de l'inflammasome par un signal de danger entraîne le clivage de la procaspase-1 ce qui libère alors la caspase-1 active. L'activation de la caspase-1 entraîne le clivage de la pro-interleukine-1 β (**pro-IL-1 β**) et de la pro-IL-18. L'IL-1 β et l'IL-18 matures pourront alors être sécrétés et entraînant ainsi une augmentation du signal inflammatoire (**Figure 20**) (Quaresma, 2019; Tsepkolenko et al., 2019).

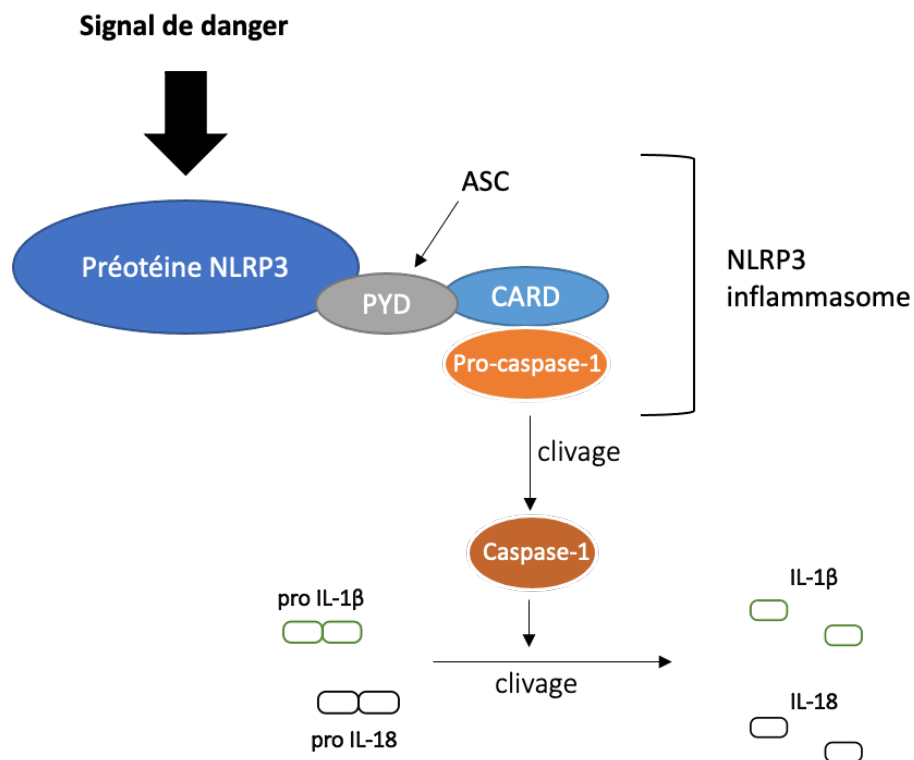


Figure 20. Structure de l'inflammasome NLRP3. L'inflammasome NLRP3 est constitué de 3 composants majeurs : la protéine NLRP3, la protéine d'adaptation ASC et la protéine effectrice procaspase-1. Un signal de danger active l'inflammasome qui entraîne le clivage de la procaspase-1 en caspase-1 active. La caspase-1 active va à son tour cliver les cytokines pro-inflammatoires proIL-1 β et proIL-18 en IL-1 β et IL-18. Adaptée de (Tourkochristou et al., 2019)

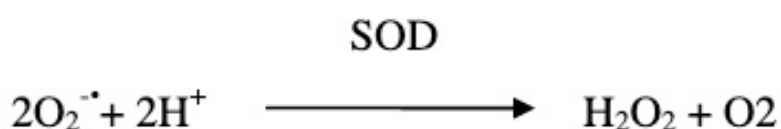
4.4 Kératinocytes et stress oxydant

La peau est exposée à de nombreux stress oxydatifs environnementaux : agents polluants, fumée, rayons UV. Le recrutement et l'activation de macrophages, notamment lors d'infections cutanées par des microorganismes (bactéries, virus...) s'accompagne de l'accumulation locale de fortes concentrations de dérivés oxygénés (ROS pour "reactive oxygen species"). De la même façon une brûlure cutanée provoque une augmentation des ROS

(Trenam et al., 1992). Ces molécules sont des radicaux libres, molécules très réactives, présentant un électron non apparié. La balance oxydo-réductrice est très importante pour maintenir à des niveaux physiologiques la quantité de ROS. Une quantité excessive de ROS peut en effet altérer définitivement les protéines, les lipides et/ou l'ADN des cellules. En particulier, l'oxydation des lipides par les ROS peut endommager les structures cellulaires et provoquer une mort cellulaire prématurée (Kandola et al., 2015; Schäfer and Werner, 2011). Quel que soit le tissu considéré, un stress oxydant prolongé peut aboutir à terme à un vieillissement cellulaire précoce, à des réactions inflammatoires ou encore à l'apparition de cancers.

Dans le cas de la peau, une quantité excessive de ROS a été associée à de nombreuses pathologies inflammatoires cutanées. Par exemple le taux de malondialdéhyde (MDA), produit lipidique issu d'une réaction induite par les ROS, est plus élevé dans les ulcères chroniques que dans les plaies aiguës (Xu et al., 2017). Les kératinocytes expriment des enzymes de détoxification, comme les **superoxydes dismutases, SOD** ; la catalase (CAT) et la peroxydase du glutathion (GSH-péroxydase), permettant de transformer les ROS en espèces moins toxiques (Xie et al., 2016b). Les kératinocytes expriment également des molécules antioxydantes comme le glutathion, l'acide urique, l'acide ascorbique (vit C) et l' α -tocophérol (vit E). Ces molécules de défense contre le stress antioxydant sont exprimés en plus grande quantité dans les kératinocytes suprabasaux (Schäfer and Werner, 2011). On peut également noter que dans la couche cornée, on détecte une grande quantité de la protéine SPRR (small proline-rich protein), ayant des propriétés antioxydantes (Vermeij and Backendorf, 2014).

En s'intéressant un peu plus aux SOD, on note qu'il existe trois formes de superoxyde dismutase : superoxyde dismutase de cuivre-zinc (CuZnSOD) (dans le cytosol), superoxyde dismutase de manganèse (MnSOD) ou **SOD2** (dans la mitochondrie) et la superoxyde dismutase extracellulaire (EC-SOD) (dans la matrice extracellulaire). Le mécanisme d'action de SOD pour transformer les ROS est de catalyser la dismutation de deux ions $O_2^{\cdot-}$ en peroxyde d'hydrogène à pH neutre :



Certaines voies de signalisation conduisent à la stimulation des mécanismes antioxydants de la cellule. Une voie bien connue est celle du **facteur nucléaire erythroid-2-related factor 2 (Nrf2)** associé à la protéine Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) qui régule l'expression de la plupart des antioxydants endogènes (Kandola et al., 2015). Nrf2 est un facteur de transcription de la famille des Cap'n'Collar qui entraîne la transcription de gènes antioxydants, et protège ainsi la cellule du stress oxydant. Parmi les gènes induits par Nrf2, on retrouve notamment SOD2 (Dong et al., 2008; Glory and Averill-Bates, 2016) mais également NQO1 (Glory and Averill-Bates, 2016; Yuan et al., 2017). En condition physiologique, Nrf2 est associé à Keap1 et **Cul3-Rbx1**. Le complexe Cul3-Rbx1, est un complexe régulateur qui entraîne l'ubiquitination de Keap1 qui va alors être dégradé. Nrf2 est ainsi constamment dégradé en situation physiologique (**Figure 21**). En condition de stress oxydatif, Nrf2 va se dissocier de Keap1, va être transloqué dans le noyau et entraîner la transcription de gènes codant des enzymes antioxydantes (Kandola et al., 2015; Kaspar and Jaiswal, 2010; Li et al., 2019; Yuan et al., 2017). L'existence d'une boucle de régulation de Nrf2 a été démontrée. En effet, Nrf2 entraîne également la transcription de Cul3 et Rbx1. Donc Nrf2 régule l'expression de Cul3-Rbx1 en contrôlant la régulation de leur expression et l'induction de Cul3-Rbx1 contrôle Nrf2 en augmentant sa dégradation (**Figure 21**) (Kaspar and Jaiswal, 2010).

La détoxification des ROS par les kératinocytes est régie par les mécanismes généraux décrits ci-dessus. Comme nous avons pu le voir, ces mécanismes sont essentiels au maintien de l'homéostasie cutanée mais également pour la protection contre des ROS produits suite à une exposition à des agents toxiques ou lors de processus de défense contre des pathogènes.

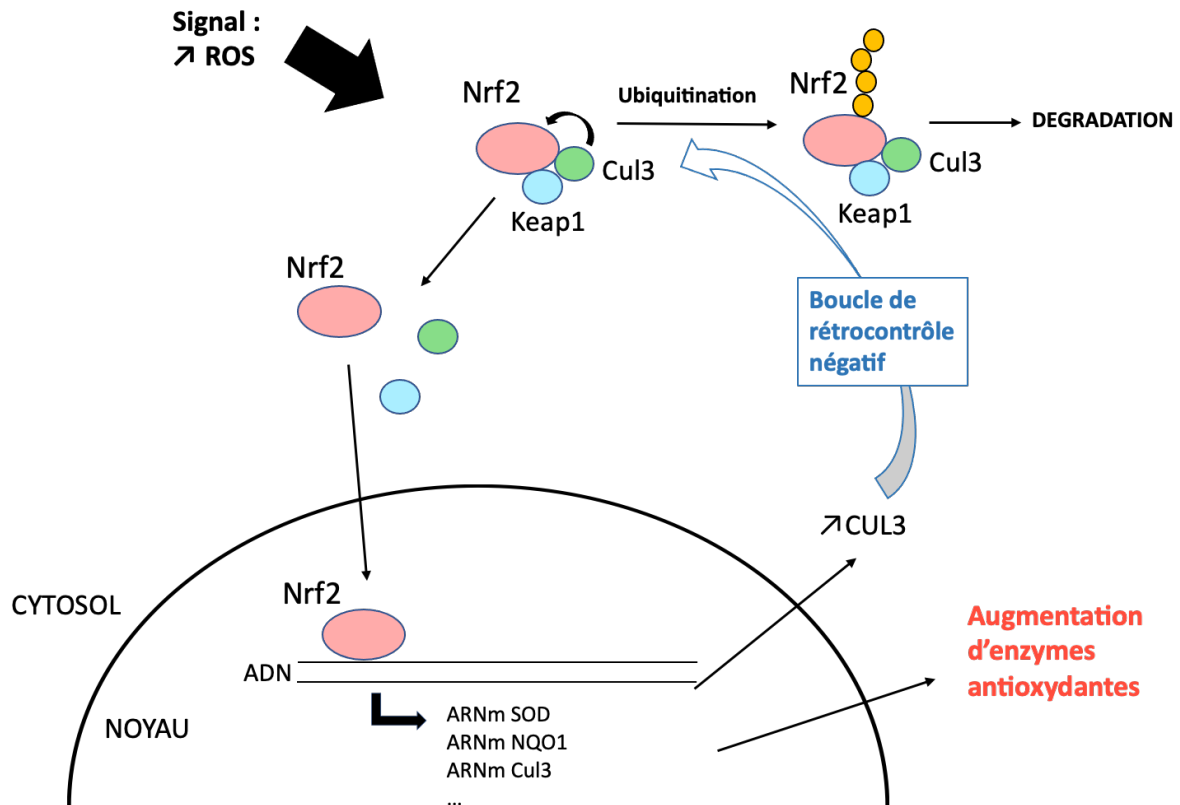


Figure 21. Activation de la transcription d'enzymes antioxydantes par Nrf2 et boucle de régulation. Activation de la transcription d'enzymes antioxydantes par Nrf2 et boucle de régulation. En condition normale, Cul3 entraîne l'ubiquitination de Nrf2 ce qui conduit à une dégradation constante de Nrf2. Suite à un signal (ex : ROS), Nrf2 est dissocié de son complexe Keap1-Cul3. Il va alors être transloqué dans le noyau où il active la transcription de gènes d'antioxydants. Il active notamment la transcription de cul3 qui va permettre de réguler le signal en dégradant Nrf2.

4.5 Rôle central du kératinocyte dans les interactions entre les différents types cellulaires/ différentes structures

4.5.1 Interaction kératinocytes-cellules immunitaires

Les kératinocytes expriment les glycoprotéines du CMH de classe I et peuvent également exprimer celles du CMH de classe II. Ainsi, les kératinocytes peuvent présenter les antigènes aux cellules immunitaires (Quaresma, 2019). De plus, comme mentionné plus haut, les kératinocytes peuvent à la fois recruter les cellules immunitaires au niveau de sites cutanés inflammatoires (par exemple la sécrétion kératinocytaire d'**IL-8** induit le recrutement de neutrophiles) mais aussi activer ces cellules (par exemple l'**IL-1β** synthétisées par les

kératinocytes participe à l'activation des lymphocytes T et des cellules dendritiques) (Quaresma, 2019).

Évidemment, le dialogue se fait dans les deux sens. Les kératinocytes exprimant de nombreux récepteurs de cytokines et leur activité peut être modulée par les cellules immunitaires. Nous reviendrons plus tard sur certains de ces échanges mais pour donner un exemple lors de la cicatrisation, les cytokines vont pouvoir stimuler la prolifération des kératinocytes afin de refermer la plaie. Les kératinocytes ont également un rôle important dans le maintien des lymphocytes T mémoires en leur apportant en situation physiologique des cytokines nécessaires à leur survie (IL-7, IL-15, TGF- β) (Klicznik et al., 2018).

4.5.2 Interaction kératinocytes-neurones

De récents travaux montrent que les kératinocytes ont la capacité d'initier la nociception, selon un mécanisme similaire à celui qui permet l'activation de fibres nerveuses nociceptives, en réponse à divers stimuli, grâce à la présence de récepteur spécifiques TRP (Talagas and Misery, 2019). La participation des kératinocytes à la fonction de nociception est rendue possible par la sécrétion de neurotransmetteurs synthétisés par les kératinocytes activés et captés par les terminaisons nerveuses localisées à proximité (Słoniecka et al., 2015).

5. Exemples de pathologies dermatologiques kératinocytaires

Les kératinocytes ayant un rôle central de médiateur cellulaire et moléculaire au sein de la peau, il est logique de les voir impliqués dans de nombreuses pathologies cutanées : le psoriasis, la dermatite atopique, l'acné, les ulcères.... Nous aborderons 2 exemples de pathologies kératinocytaires : la dermatite atopique et le psoriasis.

La dermatite atopique

La dermatite atopique, plus communément appelé eczéma, est caractérisée par une inflammation cutanée, une altération de la barrière cutanée et un prurit chronique (Furue et al., 2019). La maladie est déclenchée par un allergène qui va activer les kératinocytes. Les kératinocytes vont alors recruter les cellules immunitaires. Les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques du derme vont présenter un antigène allergène aux lymphocytes T

conduisant à une production de cytokines qui à leur tour vont entretenir l'activation des kératinocytes (**Figure 22**).

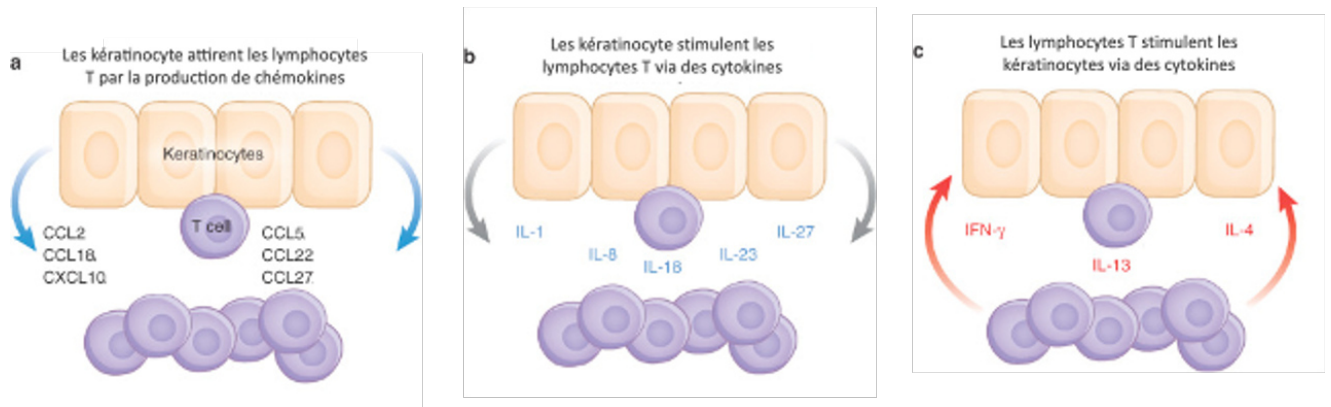


Figure 22. Interaction kératinocytes-lymphocytes T dans la mise en place et le maintien de la dermatite atopique. (a) Les kératinocytes vont recruter les lymphocytes T par la production de chimiokines. (b) Les kératinocytes vont ensuite stimuler les lymphocytes T par la sécrétion de cytokines. (c) Les lymphocytes T activés vont stimuler à leur tour les kératinocytes via des cytokines. Traduit de (Werfel, 2009)

Cette stimulation inflammatoire chronique, sous l'effet de l'allergène et de la réponse T, conduit à une différenciation anormale des kératinocytes se traduisant par un épaissement de l'épiderme avec une présence de noyaux dans les cornéocytes et d'un infiltrat inflammatoire dans le derme (Avena-Woods, 2017). Une boucle d'amplification du signal se met alors en place et entraînant le maintien de la pathologie.

Il est par ailleurs intéressant de noter que la présence d'une mutation fonctionnelle de la filaggrine, protéine kératinocytaire participant à la matrice intracornéocytaire, conduit à une anomalie de la fonction barrière qui augmente d'un facteur 3 les risques de développer la maladie.

Le psoriasis

Le psoriasis est caractérisé par une hyperplasie épidermique, une parakératose et une infiltration leucocytaire du derme et de l'épiderme. Des facteurs environnementaux et génétiques augmentent les risques de développer cette pathologie (Danilenko, 2016).

On retrouve comme pour la dermatite atopique, une boucle inflammatoire qui va se mettre en place : i) un signal non encore clairement identifié va déclencher une réponse inflammatoire au niveau des kératinocytes, ii) les cellules de l'immunité innée sont recrutées et activées (notamment les CD), iii) les lymphocytes T sont recrutés à leur tour, activent les cellules de la

peau, notamment les kératinocytes, entraînant ainsi une boucle inflammatoire (Albanesi et al., 2018).

Le signal et les molécules impliquées diffèrent de la dermatite atopique et conduisent dans le cas du psoriasis (importance de l'IL-17/IL-23 et IL-22) à une **hyperprolifération** des kératinocytes. Il a également été observé une altération de l'expression de certaines kératines, comme la kératine 16 (surexpression étant un marqueur de prolifération) (Danilenko, 2016; Eberle et al., 2016).

La place des kératinocytes comme "moteur ou simple exécutant" reste encore à démontrer et fait toujours débat. L'implication des kératinocytes reste néanmoins centrale et la prolifération des kératinocytes induite par des cytokines est démontrée (Ni and Lai, 2020). La possibilité de mécanismes autocrines est suggérée par différentes observations : i) les kératinocytes synthétisent des cytokines et expriment leurs récepteurs (Eberle et al., 2016), ii) les kératinocytes de patients atteints de psoriasis expriment de manière aberrante certaines cytokines (Woo et al., 2017).

Ce qui est néanmoins sûr dans les 2 pathologies présentées, c'est que c'est bien l'interaction entre les kératinocytes et les cellules immunitaires qui va permettre le maintien de la pathologie en entraînant une boucle d'amplification du signal inflammatoire.

Nous avons pu voir l'implication des kératinocytes dans des pathologies cutanées peut être multiples : altération de la différenciation, de la prolifération. Les kératinocytes sont également impliqués lors d'une lésion, qui entraîne une destruction d'une partie de l'épiderme. Nous allons dans le chapitre suivant nous intéresser à un cas particulier de plaie : la brûlure.

Chapitre 2 : La brûlure et ses modèles d'étude

1. La brûlure : classification clinique et traitement

D'après les rapports de l'OMS, 180 000 personnes meurent de brûlure par an à travers le monde (rapport de 2018). Il existe différents types de brûlures : i) les brûlures thermiques – contact avec du liquide bouillant, du métal chaud, de la vapeur ou des flammes, ii) les brûlures dues aux radiations, iii) des brûlures causées par des produits chimiques et iv) les brûlures électriques. Chez les enfants, 70 % des brûlures sont provoquées par du liquide bouillant alors que chez l'adulte 50% des brûlures sont causées par des flammes (Hettiaratchy and Dziewulski, 2004).

1.1 Classification des brûlures

Les brûlures sont classées en fonction de la profondeur de la lésion du plus superficiel vers au plus profond : 1^{er} degré, 2^{ème} degré, 3^{ème} degré et 4^{ème} degré (**Figure 23 et Tableau 2**) (Hall et al., 2017).

1.1.1 Brûlure du 1^{er} degré

Le 1^{er} degré correspond à une atteinte des couches superficielles de l'épiderme. Les cellules de la couche basale de l'épiderme ne sont pas atteintes. D'aspect, la lésion apparaît rouge, sans développement de phlyctène. Ces brûlures guérissent spontanément dans les 2-5 jours sans séquelle (Hall et al., 2017). La peau brûlée au 1^{er} degré est érythémateuse (rouge) et sans ampoule. C'est l'exemple du coup de soleil.

1.1.2 Brûlure du 2^{ème} degré

Ces brûlures sont classées en 2 sous-catégories : superficielles ou profondes. Les brûlures du 2^{ème} degré superficiel s'étendent sur une partie du derme (derme papillaire), sans atteinte des crêtes épidermiques et des annexes cutanées (follicules pileux, glandes sudoripares). Ces brûlures sont caractérisées par la présence de phlyctènes dont le plancher, après excision, est rouge, bien vascularisé et très sensible. La cicatrisation des brûlures du 2^{ème} degré superficiel

est généralement spontanée et se fait entre 7 et 14 jours. La fermeture de la plaie s'effectue par les cellules souches épidermiques localisées en bordure de plaies et qui sont au niveau des crêtes épidermiques (Jeschke et al., 2018). Ces cellules souches peuvent elles-mêmes provenir des follicules pileux (plus précisément de la zone du « bulge », à l'interface entre le follicule pileux et la glande sébacée qui lui est associé) (Jeschke et al., 2018).

Les brûlures du 2^{ème} degré profond s'étendent dans le derme (derme papillaire ainsi qu'une partie du derme réticulaire), sans affecter la totalité de sa structure. Les annexes sont souvent endommagées. (Hall et al., 2017). Ces brûlures présentent, comme celles du deuxième degré superficiel, des phlyctènes mais, après excision, le plancher de celles-ci apparaît blanc-rosé, mal vascularisé, peu sensible. La cicatrisation spontanée à partir des annexes est possible mais longue (2 à 4 semaines). Bien souvent, l'état général du patient ou une surinfection locale, entraînera une aggravation secondaire des lésions par destruction des quelques cellules épidermiques survivantes, ce qui ne permettra pas la cicatrisation spontanée (Jeschke et al., 2018; Saeidinia et al., 2017). La brûlure du 2^{ème} degré profond implique la formation d'une cicatrice (Jeschke et al., 2018; Saeidinia et al., 2017).

1.1.3 Brûlure du 3^{ème} degré

Il s'agit de brûlures dites « de pleine profondeur » qui détruisent la totalité de l'épiderme et du derme et touchent souvent l'hypoderme (Hall et al., 2017). La brûlure du 3^{ème} degré se présente comme une nécrose cutanée adhérente, sans phlyctène, de couleur plus ou moins foncée (allant du blanc au noir en passant par le marron), avec perte totale de la sensibilité. Ces brûlures ne peuvent pas cicatriser spontanément. La fermeture cutanée définitive ne peut alors être obtenue que par greffe de peau, c'est à dire par l'implantation de tissus épidermiques autologues (prélevés sur une zone de peau intacte) ou dérivant d'un autre sujet (greffe allogénique). Cette greffe ne sera possible qu'après excision de la nécrose cutanée. La cicatrisation de ces brûlures entraînent la formation de cicatrices et de rétractions sur une longue période.

1.1.4 Brûlure du 4^{ème} degré

Ces brûlures s'étendent à travers la peau jusqu'au tissu sous-jacents (muscles et/ou os) (Hall et al., 2017). Une intervention chirurgicale est nécessaire.

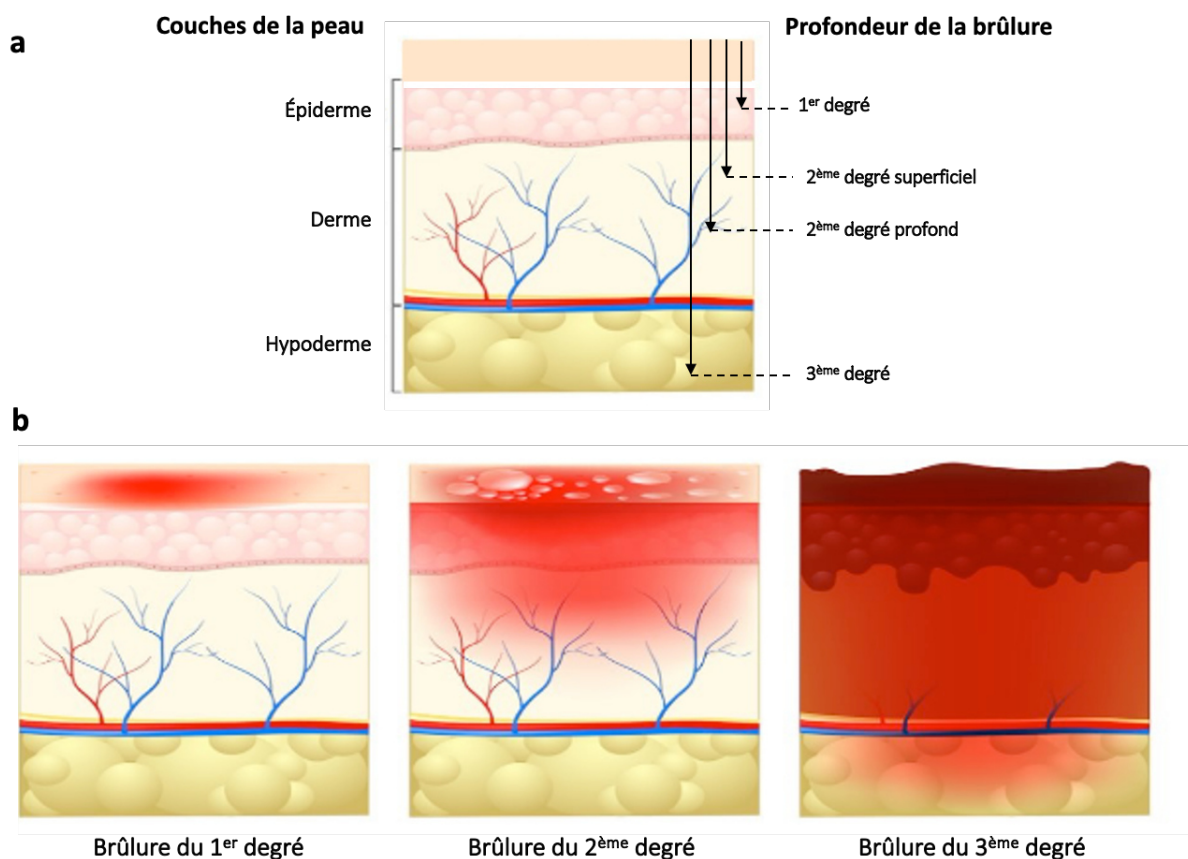


Tableau 2. Description simplifiée de l'aspect et de leur évolution en fonction de leur niveau de profondeur (Kolanek; Lafourcade; Lalouette).

| | <i>1^{er} degré</i> | <i>2^{ème} degré superficiel</i> | <i>2^{ème} degré profond</i> | <i>3^{ème} degré</i> |
|--------------------------|-----------------------------|---|--|--|
| <i>Niveau d'atteinte</i> | Épiderme | Épiderme et derme papillaire | Épiderme et derme réticulaire | Épiderme, la totalité du derme et parfois de l'hypoderme |
| <i>Aspect clinique</i> | Lésion rouge, érythémateuse | Peau rouge, moite avec apparition de phlyctènes | Phlyctènes à fond rouge/brun | Peau nécrosée, sans phlyctène |

| | | | | |
|--|--------------------------|----------------------------------|--|---|
| <i>Guérison</i> | Spontanée 2 à 5 jours | Spontanée 1 à 2 semaines | Rarement spontanée 2 à 4 semaines (en absence d'infection) | Pas de guérison spontanée |
| <i>Formation d'une cicatrice</i> | Pas de cicatrices | En général, pas de cicatrices | Formation de cicatrices | Formation de cicatrices importantes |

1.1.5 Traitement des brûlures

Comme nous l'avons évoqué plus haut, les brûlures du 1^{er} degré guérissent spontanément sans formation de cicatrice et ne nécessitent pas de prise en charge médicale.

A partir du 2^{ème} degré profond, sur des brûlures étendues, un recouvrement du brûlé est une urgence vitale, la première nécessité est de restaurer rapidement la fonction barrière de la peau. En effet, lorsque la brûlure est recouvre plus de 20% de la surface totale de la surface corporelle, on parle alors de « grands brûlés » et 5% pour les brûlures du 3^{ème} degré (Legrand et al., 2020; Schaefer and Nunez Lopez, 2020). La méthode standard utilisée depuis les années 1970 est l'excision de la peau brûlée et une autogreffe afin de couvrir la plaie. Cette méthode, quand elle est possible, reste la meilleure des prises en charges (Jeschke et al., 2018). En revanche lorsque la peau saine du donneur n'est pas en quantité suffisante, des allogreffes de peau ou des substituts cutanés cellularisés (par exemple des feuillets épidermiques, comme c'est le cas au centre de traitement des brûlés des HCL) et/ou acellulaire sont utilisés pour couvrir la plaie dans le cas des « grands brûlés ».

Les brûlures de 2^{ème} degré superficiel sont généralement traitées par applications topiques de pansements ou de crèmes. Il existe une grande variété de ses traitements topiques, chacun présentant des avantages et des inconvénients. Il n'y a **pas de traitement standard** universel bien qu'il s'agisse en grande majorité d'agents ayant des propriétés antimicrobiennes. En effet, l'épiderme étant détruit il n'assure plus sa fonction barrière vis à vis des agression externes et notamment microbiennes, fonction vitale pour l'organisme. Une des priorités dans le traitement des brûlures du 2^{ème} degré va être de prévenir le développement d'une infection (Daryabeigi et al., 2010; Jeschke et al., 2018). L'application topique d'une crème contenant 1% de sulfadiazine d'argent (Flamazine) est actuellement la méthode la plus utilisée à travers le monde pour traiter

les brûlures du 2^{ème} degré superficiel (Daryabeigi et al., 2010; Legrand et al., 2020; Saeidinia et al., 2017). Cette crème a plusieurs avantages : activité antibactérienne, absence d'effet algique, faible toxicité. En revanche, elle présente également des inconvénients : une nécrose toxique de l'épiderme peut survenir ainsi qu'une résistance à l'antibiothérapie, une pigmentation de la peau, un retard de la contraction de la plaie et/ou de la réépithélialisation conduisant parfois à une cicatrisation incomplète. Par ailleurs, bien que de pénétration généralement limitée dans la profondeur des lésions, la Flamazine peut parfois provoquer des réactions systémiques de type neutropénie (Daryabeigi et al., 2010; Saeidinia et al., 2017). On voit donc que bien qu'utilisé couramment, la crème de sulfadiazine d'argent présente de nombreux désavantages et qu'il est donc important de développer de nouveaux traitements qui permettent à la fois de prévenir l'infection, de limiter les phénomènes douloureux post-brûlure ainsi que d'accélérer la cicatrisation et/ou d'améliorer ses caractéristiques qualitatives (fonctionnalité, esthétique, douleur résiduelle) (Saeidinia et al., 2017).

1.2 Mécanismes physiopathologiques de la brûlure

Contrairement aux autres types de blessures, la chaleur excessive va rayonner du point d'impact vers l'extérieur entraînant alors une réponse locale qui par la suite peut elle-même provoquer une réponse systémique.

1.2.1 Réponse cellulaire et tissulaire

La brûlure est caractérisée par 3 zones, telles que décrites par Jackson en 1947 (**Figure 24**) (Hettiaratchy and Dziewulski, 2004).

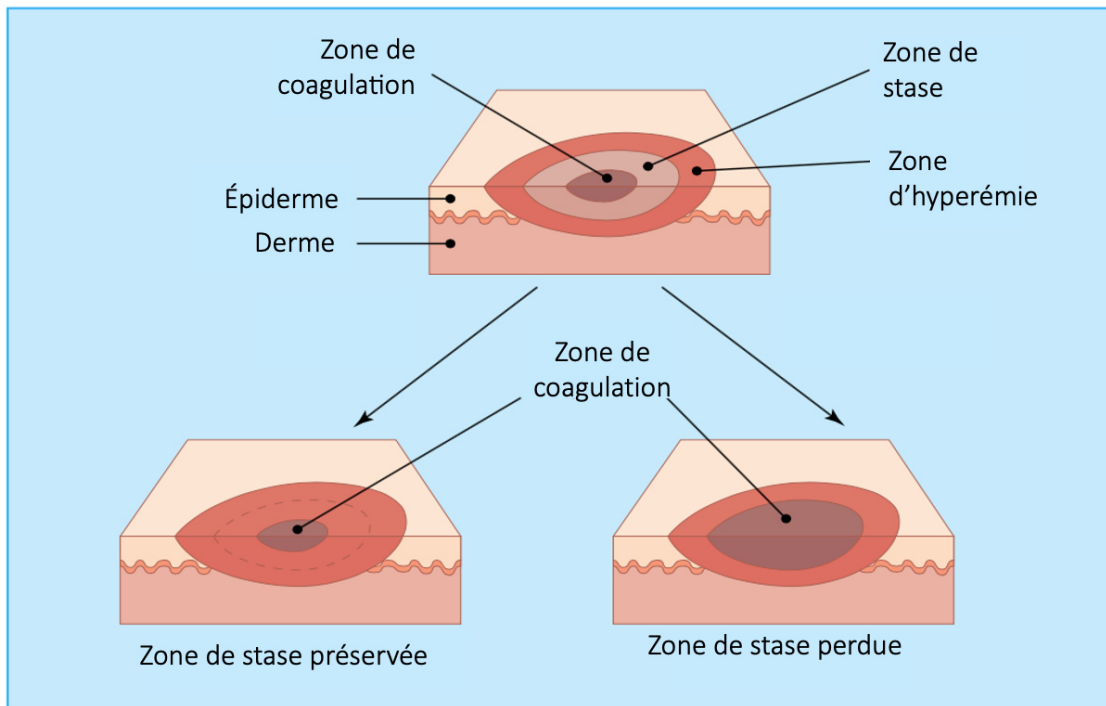


Figure 24. Les trois zones de la brûlures : zone de stase, zone de coagulation et zone d'hyperémie. Selon les cas (terrain génétique de l'individu, délai et qualité de la prise en charge thérapeutique) la zone de coagulation diminue préservant les zones alentours ou au contraire, la zone de coagulation s'étend. Traduit de (Hettiaratchy and Dziewulski, 2004).

- **Zone de coagulation** : il s'agit de la zone centrale, où le tissu est le plus endommagé. Dans cette zone, la perte tissulaire est irréversible du fait de la coagulation des protéines de la matrice extracellulaire (les protéines à une température supérieure à 41°C sont dénaturées, puis dégradées et coagulées), de la lyse cellulaire par nécrose et de l'absence d'apport sanguin lié à la destruction des vaisseaux.
- **Zone de stase** : il s'agit du tissu cutané localisé en bordure immédiate de la zone de coagulation. On y observe une diminution de la circulation et l'hypoxie prolongée qui en résulte, sans traitement approprié, peut entraîner une nécrose tissulaire. Les tissus de la zone de stase peuvent être l'objet d'un processus de régénération qui sera stimulé et accompagné par des soins adéquats.
- **Zone d'hyperémie** : il s'agit de la zone la plus externe où l'hyperémie résulte d'une vasodilatation intense. Une restitution ad integrum de cette zone est généralement observée (Walker and King, 2020).

1.2.2 Réponse systémique

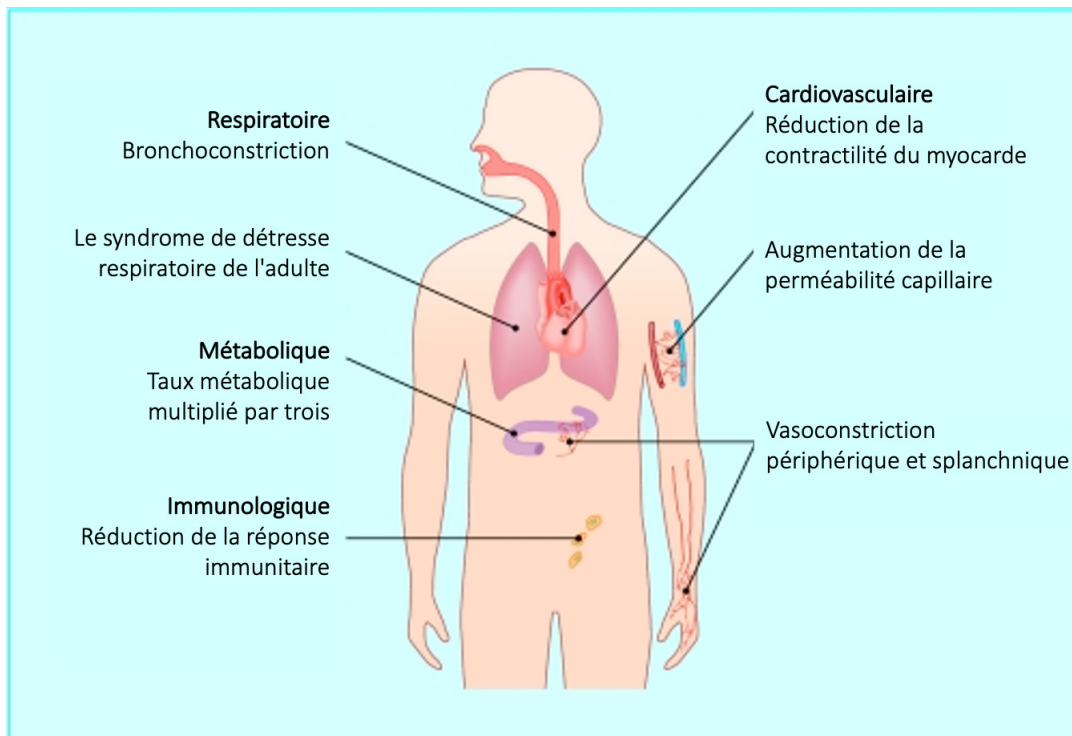


Figure 25. Schéma des altérations systémiques potentiellement induite par une brûlure grave et étendue. Traduit de (Hettiaratchy and Dziewulski, 2004).

Dans les cas de brûlures graves et étendues, couvrant plus de 30% de la surface totale du corps, la libération de cytokines et médiateurs inflammatoires induit des effets systémiques qui vont impacter à distance presque tous les organes (muscles, reins, poumons, foie, systèmes cardiovasculaire, appareil gastro-intestinal, système nerveux périphérique) (**Figure 25**) (Nielson et al., 2017; Walker and King, 2020). Chez ces patients, on peut par exemple observer des troubles respiratoires liés à un excès de bronchoconstriction et pouvant conduire à un syndrome de détresse respiratoire. Il est très fréquent que la libération de médiateurs inflammatoires entraîne une augmentation générale de la perméabilité capillaire conduisant à une perte de protéines et de fluides intravasculaires dans le compartiment interstitiel (=extravasation).

Une telle extravasation massive, associée à la perte de liquide au niveau des lésions cutanées peuvent être responsables d'une hypotension systémique, d'un œdème pulmonaire, et d'un défaut de vascularisation terminale des organes (Hettiaratchy and Dziewulski, 2004; Walker

and King, 2020). De fait, toute lésion étendue de la peau, entraîne une perte des fonctions essentiels de cet organe, notamment la fonction barrière, la thermorégulation et la régulation des fluides (Walker and King, 2020).

Paradoxalement, le relargage de cytokines lors de la phase aigüe des brûlures graves et étendues s'accompagne d'un phénomène de sidération des fonctions immunes qui peut être observé au plan cellulaire et humoral (Hettiaratchy and Dziewulski, 2004). Cette immunosuppression réactionnelle pourrait être dû aux niveaux extrêmement élevés de ROS et RNS générés sur le site de la brûlure (Parihar et al., 2008; Roshangar et al., 2019; Sahib et al., 2009, 2010). Il a été proposé que les ROS et RNS pouvaient être impliqués dans un processus de dérégulation du système immunitaire se traduisant par une immunosuppression du système immunitaire adaptatif (lymphocytes T et B) et une activation du système immunitaire inné. Par ailleurs, les ROS et les RNS pourraient favoriser l'infection et la nécrose tissulaire au niveau de la brûlure. Les antioxydants ont à ce titre été proposées pour le traitement des brûlures (Sahib et al., 2010).

1.3 Étapes de la réparation post-brûlure

La cicatrisation d'une brûlure comme pour les autres types de plaies comporte 4 phases : l'hémostase, la phase inflammatoire, la phase proliférative et la phase de maturation ou remodelage. Ces étapes font intervenir de nombreux types cellulaires et sont finement régulées (Figures 26 et 27). La différence de la cicatrisation d'une brûlure par rapport à d'autres processus cicatriciels cutanés va être notamment la durée des phases (Hall et al., 2017; Rowan et al., 2015).

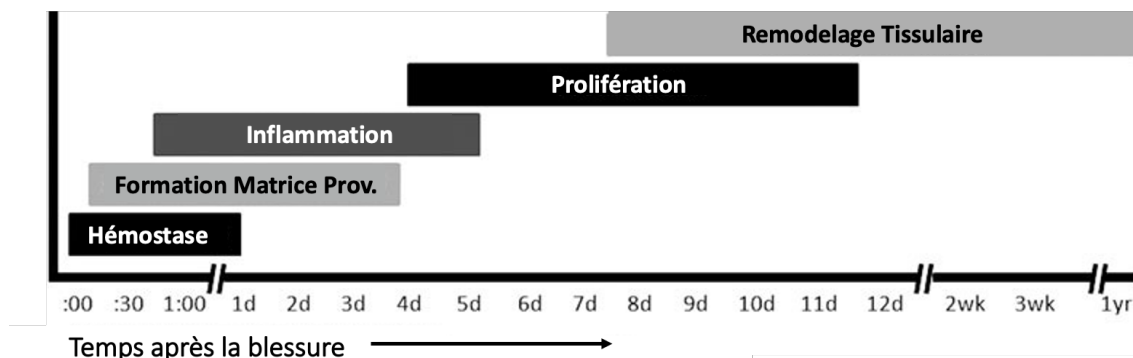


Figure 26. Chronologie des phases de la cicatrisation. (d : jour ; wk : semaine ; yr, an). Adaptée de (Pence and Woods, 2014)

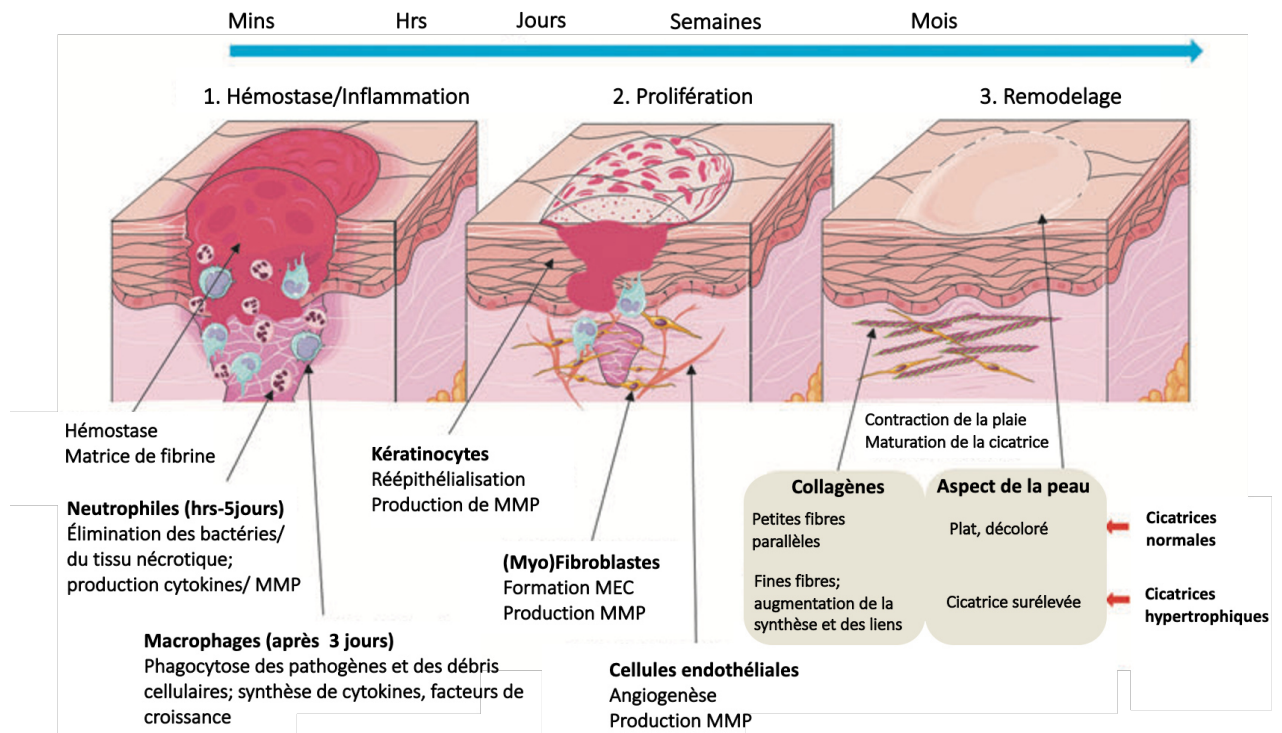


Figure 27. Schéma des différentes phases de la cicatrisation cutanée. Traduit de (Xue and Jackson, 2015)

1.3.1 Hémostase

La phase d'hémostase est la première réponse de l'organisme après la blessure. Cette phase permet l'arrêt de l'hémorragie et la formation d'un tissu intravasculaire provisoire, le clou plaquettaire, qui favorisera le recrutement de cellules immunes vers le tissu lésé (Eming et al., 2014). Cette phase est constituée de 3 étapes principales : la vasoconstriction, la formation d'un clou plaquettaire et la génération d'un caillot sanguin. La vasoconstriction est le résultat de réflexes neurovégétatifs locaux déclenchés entre autres par les récepteurs à la perception de la douleur et par les lésions directes occasionnées à la musculature lisse vasculaire. Le collagène exposé lors de cette première étape va favoriser le recrutement de plaquettes qui vont s'agréger et former ainsi un bouchon (clou) plaquettaire. L'activation de la cascade de coagulation va ensuite conduire à la formation d'un caillot sanguin qui maintient le clou plaquettaire sur le site de la plaie (Hall et al., 2017; Serra et al., 2017). Cet ensemble va également servir de matrice

extracellulaire provisoire au sein de laquelle les cellules immunes sanguines vont pouvoir migrer vers le site de la plaie.

1.3.2 Phase inflammatoire

L'inflammation est une étape essentielle de la cicatrisation. Les différents médiateurs inflammatoires libérés au niveau de la zone tissulaire lésée endommagée sont indispensables au processus de réparation (Roshangar et al., 2019). Les plaquettes formées pendant la phase d'hémostase libèrent des cytokines et des chémokines (**IL-1**, IL-6, TNF- α , INF γ , ect), qui vont déclencher et guider le recrutement et la migration de cellules immunitaires depuis le sang vers le tissu cutané lésé (Hall et al., 2017; Tonnesen et al., 2000). De façon intéressante, cette libération locale de cytokines pro-inflammatoires et de chémokines induit initialement une activation des kératinocytes de la zone périlésionnelle (Tsepikolenko et al., 2019). Ce n'est que dans un deuxième temps qu'on peut observer un recrutement de neutrophiles puis de monocytes/macrophages qui vont permettre d'initier la phase proliférative. Par ailleurs, la migration des kératinocytes et des fibroblastes vers la zone de tissu lésé est également stimulée par les cytokines synthétisées pendant la phase inflammatoire (Rowan et al., 2015).

Les lésions cutanées par brûlure entraînent également la libération de molécules intracellulaires aux puissants effets de stimulation du système immunitaire inné : les molécules de la famille des « damage-associated molecular patterns » (DAMPs), provenant notamment des cellules endommagées, tels que HMGB-1, l'ADN (Rani et al., 2017). En particulier les DAMPs activent l'inflammasome et donc la caspase-1 qui en retour va transformer **proIL-1 β** et **proIL-18** en leur forme mature **IL-1 β** et **IL-18** respectivement. De façon intéressante, les kératinocytes lésés libèrent également des cytokines pouvant potentiellement réguler négativement la réponse inflammatoire, notamment IL-33 et la molécule chromatinienne HMGB1 (Kasuya and Tokura, 2014).

Les neutrophiles sont les premières cellules immunes à être recrutées sur le site lésé grâce aux gradients de chémokines induits par les cytokines **IL-1**, TNF- α et TGF- β , via également la synthèse accrue de la molécule d'adhérence fibronectine ainsi que le relargage d'HMGB1 (Kasuya and Tokura, 2014). Les neutrophiles sont recrutés dès la 1^{ère} heure post-brûlure puis ils persistent pendant 2 à 5 jours durant lesquels ils vont opérer une phagocytose des zones de

tissu nécrosé et une élimination des toxines libérées par le tissu brûlé (Tiwari, 2012). Ces cellules phagocytaires vont nettoyer le lit de la plaie des débris mais également des microbes qui auraient envahi le tissu. Ils vont également libérer des cytokines pro-inflammatoires (**TNF- α** , **IL-1 β** , IL-6) et orchestrer une deuxième vague de recrutement cellulaire et de réponse inflammatoire (Sorg et al., 2017). Les monocytes migrent ainsi au sein du tissu lésé dans les 3 premiers jours post-brûlure et s'y différencient en macrophages. Les macrophages via leur intense activité de phagocytose coopèrent avec les neutrophiles dans la détersion biologique des tissus endommagés. Ils vont également phagocyter les neutrophiles en fin de vie et restent présents jusqu'à qu'à la fin du processus de cicatrisation. Outre leur activité de phagocytose, les macrophages synthétisent un ensemble de molécules qui stimulent l'angiogenèse, notamment le TGF- β , le PDGF, le FGF et le **VEGF**. Ces facteurs favorisent la formation d'un tissu dit « de granulation » et le processus de néovascularisation qui va se poursuivre durant la phase proliférative (Hall et al., 2017).

Il est important de noter que les kératinocytes ont également un rôle important pendant la phase inflammatoire de la brûlure. D'une façon générale, les kératinocytes peuvent recruter, stimuler et activer de multiples types de cellules durant le processus de cicatrisation et comme vu auparavant, ce sont les premières cellules activées sur le site de la lésion. Lors d'une lésion épidermique quelle qu'elle soit, les kératinocytes libèrent de l'IL-1, qui agit en cascades autocrines et paracrines pour activer et faciliter la migration et la prolifération des kératinocytes afin d'améliorer la cicatrisation (Dahl, 2012). Les kératinocytes sécrètent également du VEGF et du PDGF (« platelet-derived growth factor ») qui sont essentiels à la migration des cellules endothéliales et à l'angiogenèse dans le lit de la plaie (Ansel et al., 1993; Johnson and Wilgus, 2014). Des études ont également montré que le PDGF sécrété par les kératinocytes favorise la prolifération des fibroblastes et leur production de matrice extracellulaire. On peut imaginer que l'activité synchrone des fibroblastes et des kératinocytes est importante pour obtenir un retour à l'homéostasie cutanée. C'est potentiellement ce dialogue qui autorise une cicatrisation harmonieuse des lésions cutanées (Dahl, 2012).

Au total, la phase inflammatoire peut-être subdivisée en 2 temps : i) un pic précoce d'inflammation caractérisé par une sécrétion importante de cytokines pro-inflammatoires, puis ii) une phase d'inflammation secondaire durant laquelle des molécules anti-inflammatoires stoppent l'inflammation aiguë et entretiennent un milieu cytokinique de type M2 (par référence

aux macrophages M2 dont le profil moléculaire est favorable à la réparation tissulaire). Cette phase d'inflammation secondaire est indispensable au déclenchement et au bon déroulement de la phase de prolifération (Koh and DiPietro, 2011). Une réponse inflammatoire correctement régulée au plan qualitatif, quantitatif et de la cinétique temporelle est indispensable au processus de cicatrisation cutanée, indépendamment de l'origine des lésions. Une dérégulation du pic pro-inflammatoire précoce semblent impliqué à un retard de cicatrisation et au développement de cicatrices hypertrophiques, en particulier dans le cas de brûlures. A contrario, les traitements anti-inflammatoires pourraient aggraver les symptômes et retarder la cicatrisation (Rowan et al., 2015).

Particularités liées à la brûlure :

Comme nous l'avons évoqué, la durée des phases peut varier dans le cas de la brûlure. Dans le cas des brûlures étendues, la période d'inflammation prolongée associée à une perte de masse maigre (= os, muscles, organes, peau, liquide du corps humain) peut causer des défauts de cicatrisation. Par ailleurs l'hypermétabolisme induit par l'augmentation de la chaleur locale dans les zones péri-lésionnelles est un facteur aggravant qui accentue la synthèse de cytokines anti-inflammatoires, et comme énoncé plus haut, de ROS et RNS. La brûlure est donc particulièrement associée au **stress oxydant** et à la sécrétion de radicaux libres (Roshangar et al., 2019). Comme vu plus haut, une balance régulée des ROS est importante. En effet, les radicaux libres peuvent protéger les plaies contre les infections mais une augmentation des ROS est également associée à une aggravation des lésions tissulaire et à une réponse inflammatoire systémique.

1.3.3 Phase proliférative

La phase de prolifération se superpose et fait suite à la phase inflammatoire tardive et aboutit à la formation du tissu de granulation. Le tissu de granulation est une matrice temporaire, remplaçant le tissu nécrosé jusqu'à la formation du tissu cicatriciel (Alhajj et al., 2020; Gonzalez et al., 2016). Il va servir de support aux cellules, notamment aux kératinocytes lors de la réépithélialisation. Celui-ci est formé de fibroblastes, de cellules endothéliales, de cellules inflammatoires (essentiellement des macrophages), de vaisseaux sanguins et de matrice extracellulaire nouvellement formée. Les fibroblastes sont recrutés et activés dans les premiers jours post-lésion, sous l'effet notamment du TGF- β . Ce sont les fibroblastes recrutés qui produisent les composants de la MEC néoformée : collagène, fibronectine,

glycosaminoglycanes et protéoglycanes. En particulier, une grande quantité de collagène de type III va être synthétisé durant cette phase (Alhajj et al., 2020). En parallèle, le VEGF, sécrété durant cette phase par de nombreuses cellules impliquées dans la cicatrisation (fibroblastes, macrophages, kératinocytes), recrute les cellules endothéliales et stimule la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (processus de néo-angiogenèse). La phase proliférative est également caractérisée par la synthèse endothéliale de collagénases et protéases qui vont dégrader le caillot et la MEC précédemment déposée pour permettre la migration cellulaire (Hall et al., 2017).

Par ailleurs, dès la fin de la formation du tissu de granulation, différents signaux moléculaires, notamment le TGF- β , vont stimuler la différenciation des fibroblastes en **myofibroblastes** ; cellules dont l'activité contractile permet l'évacuation de liquide interstitiel en excès (Serra et al., 2017; Tiwari, 2012). Les myofibroblastes sont des cellules spécialisées ayant des propriétés mixtes de fibroblastes et de cellules musculaires lisses. Les myofibroblastes expriment une isoforme musculaire de l'actine, l' **α -SMA** (alpha smooth muscle actin) leur conférant des propriétés contractiles impliquées dans la contraction de la lésion. Cette contraction permet de diminuer la surface de la plaie à réépithélialiser. Par ailleurs, les myofibroblastes tout comme les fibroblastes exercent des fonctions de remodelage matriciel se traduisant pas la synthèse de nouvelles fibres de collagène.

La réépithélialisation se produit lorsque les cellules épithéliales migrent à travers le tissu de granulation pour fermer l'espace lésionnel. Si la couche basale est détruite - ce qui se produit lors de brûlures du 2^{ème} degré profond- les kératinocytes doivent migrer à partir des bords de la lésion ou des structures cutanées contenant des CS kératinocytaires comme les follicules pileux ou les glandes sébacées (Cf supra) (Woodley et al., 1993). La migration des kératinocytes va former une langue épidermique formée par la première rangée de kératinocytes et va être alimentée par la prolifération des kératinocytes (Rousselle et al., 2019). Les kératinocytes, en perdant le contact cellules-cellules, changent de forme et avancent vers le centre de la lésion en formant un front de migration cellulaire Une fois le recouvrement fini, l'inhibition de contact stoppe le processus de migration. Les cellules souches kératinocytaires retrouvent leur forme cuboïde et leur état de quiescence (Sorg et al., 2017).

Les CS épidermiques jouent un rôle primordial durant plusieurs phases de la réparation tissulaire. Elles sont non seulement indispensables à la régénération de l'épiderme mais contribuent à la résolution de l'inflammation. Durant la phase de prolifération la production rapide de cellules kératinocytaires différenciées n'est rendue possible que par la prolifération des cellules souches épidermiques via un processus de divisions symétriques. Les deux cellules filles sont des cellules souches (division symétrique permettant d'accroître le pool de cellules souches). La division symétrique des cellules d'amplification transitoire (division symétrique et différenciative) compète le mécanisme de remplacement rapide des cellules lésées (**Figure 18**). (Dahl, 2012).

Fait important, la gravité de la cicatrice est inversement proportionnelle à la vitesse à laquelle les kératinocytes sont capables de se rapprocher des bords opposés de la plaie (Sorg et al., 2017). Ainsi un traitement stimulant également la réépithélialisation permettrait d'améliorer notamment l'aspect de la cicatrice, paramètre esthétique aux incidences directes sur la qualité de vie des brûlés.

1.3.4 Phase de maturation

La phase de maturation, aussi appelée phase de remodelage, correspond un remodelage du tissu lésé depuis l'état de tissu de granulation vers l'état de tissu cicatriciel. La durée de cette phase dépend de la profondeur de la plaie, du temps nécessaire à la réépithélialisation et de la durée de la phase inflammatoire.

La MEC du derme est fortement modifiée tout au long de la cicatrisation ; son évolution est schématisée **Figure 28**. Au fur et à mesure du remodelage, le **collagène de type III**, précédemment sécrété pendant la phase proliférative, est dégradé et remplacé par du **collagène de type I** (O'Toole, 2001; Xue and Jackson, 2015). Cette dégradation est opérée par des enzymes de dégradation, les MMPs, exprimés notamment par les fibroblastes et kératinocytes en migration et en prolifération (Xue and Jackson, 2015). Après la fermeture de la lésion, la population de myofibroblastes régresse en parallèle de la diminution de signaux apoptotiques (Hall et al., 2017; Zhao et al., 2016). Au niveau de l'organisation du collagène en zone lésée, les fibres sont empaquetées et denses en regard de la lésion et participent à la formation de la cicatrice définitive. De plus, les cicatrices n'ont pas d'annexes cutanées (follicules pileux, glandes sébacées) (Sorg et al., 2017; Xue and Jackson, 2015).

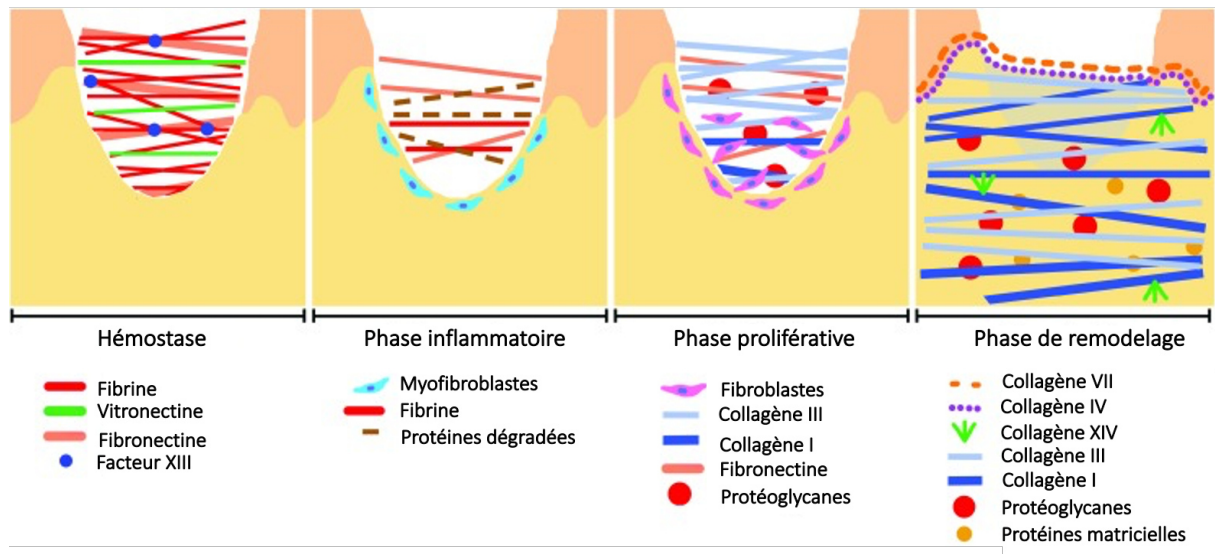


Figure 28. Modifications de la MEC du derme au cours des phases de la cicatrisation cutanée. Un tissu provisoire se met en place dans un premier temps. Ce tissu est par la suite dégradé et remplacé notamment par du collagène III pendant la phase de prolifération. Le collagène III est ensuite en partie dégradé et remplacé par du collagène I. Traduit de (Tracy et al., 2016).

1.4 Complications post-brûlure : le cas de la cicatrice hypertrophique

Les complications courantes des lésions thermiques et résultant d'une cicatrisation anormale comprennent les cicatrices hypertrophiques, les contractures post-brûlures, et les plaies non résolues qui finissent par provoquer un ulcère. La cicatrice hypertrophique, complication la plus courante chez les patients brûlés (**Figure 29**), fait partie de la famille des troubles fibro-prolifératifs, comme les chéloïdes. Le processus des cicatrices hypertrophiques est encore mal compris et il n'existe pas de traitement unique contre la formation des cicatrices hypertrophiques (Hall et al., 2017).

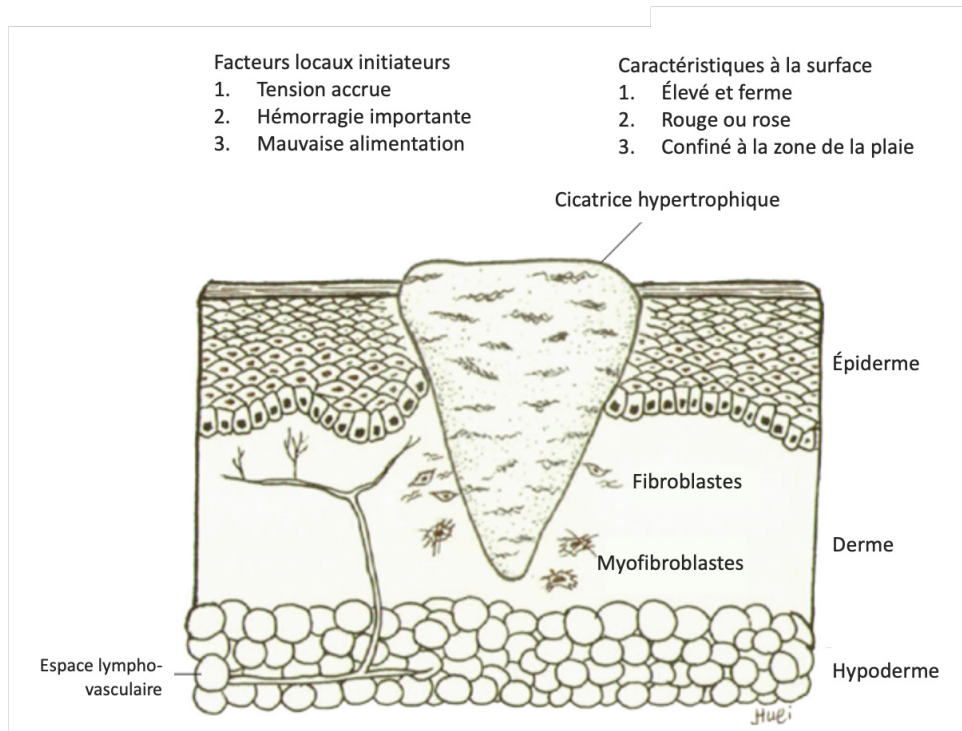


Figure 29. Représentation d'une cicatrice hypertrophique. Traduit de (Su et al., 2010)

L'incidence des cicatrices hypertrophiques varie chez les brûlés de 30 à 94% selon la profondeur de la brûlure. Le risque de développer une cicatrice hypertrophique est particulièrement élevé chez grands brûlés comparé aux autres situations de lésion cutanée. Les cicatrices hypertrophiques présentent comme les chéloïdes une surabondance de collagène. Toutefois leur distribution est différente. Les cicatrices hypertrophiques contiennent des faisceaux organisés de collagène de type III orientés parallèlement à l'épiderme, avec des myofibroblastes persistants. En revanche, pour les chéloïdes, on observe des filaments acellulaires, et des réseaux de collagène de type I et de type III. La formation excessive de cicatrice diminue considérablement la qualité de vie d'un patient, tant sur le plan fonctionnel qu'esthétique (Hall et al., 2017). Dans une cicatrisation normale, des voies de régulation limitent la réponse des myofibroblastes. Ces régulations sont diminuées, ou absentes dans les plaies chroniques. Les myofibroblastes ne subissent pas d'apoptose et persistent au niveau de la plaie où ils interviennent dans la formation pathologique des cicatrices hypertrophiques (Hall et al., 2017). Une des hypothèses de cette résistance à l'apoptose pourrait être due notamment à l'IL-1 β . L'IL-1 β conduisant à une stimulation de l'apoptose des myofibroblastes. Une absence d'IL-1 β pourrait être alors responsable de cette résistance (Chiang et al., 2016).

2. Modèles d'étude de la brûlure

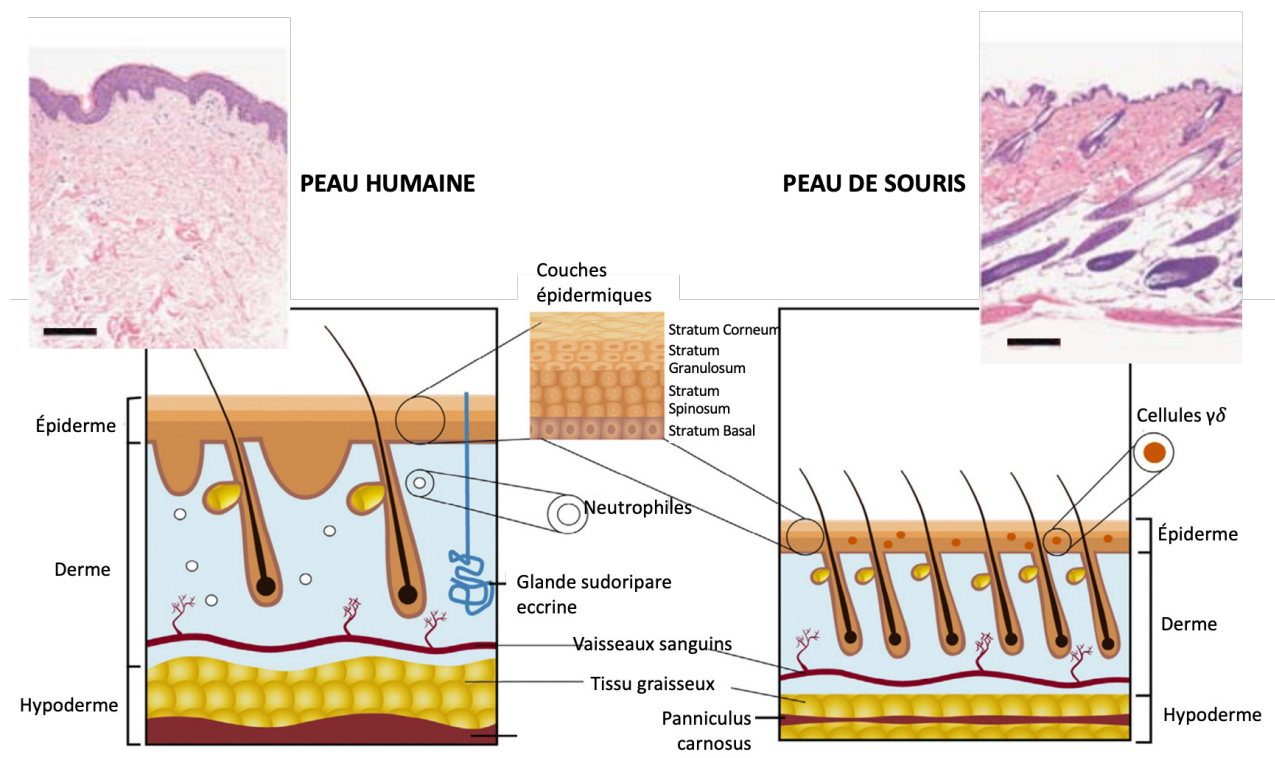
Comme nous avons pu le voir, les brûlures sévères entraînent une série de processus complexes impliquant les cellules cutanées mais également les cellules immunes circulantes et parfois des organes distants tels que le poumon ou le système vasculaire dans son ensemble. Il est donc particulièrement difficile d'élaborer un modèle qui reproduise dans leur totalité tous les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu lors d'une brûlure cutanée sévère. Un modèle approchant est pourtant nécessaire afin d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologique de la brûlure et pour améliorer la prise en charge des patients durant la phase aigüe aussi bien que durant les phases tardives post-brûlure également. Nous passerons ici en revue les principaux modèles de brûlure qui ont jusqu'alors été publiés et procéderons à une analyse comparative des inconvénients et avantages caractérisant ses différents modèles. Nous commencerons par les modèles animaux *in vivo*, seule approche permettant d'observer le processus physiopathologique à l'échelle de l'organisme complet. Nous passerons ensuite aux différents modèles *in vitro* sur cellules cutanées cultivées et les études *ex vivo* sur explants de peau.

2.1 Modèles *in vivo*

Les modèles animaux de brûlure cutanée sont considérés comme des modèles de référence (Qu and Nourbakhsh, 2017). Ces modèles reproduisent au moins partiellement la complexité des processus biologiques déclenchés *in vivo* par une brûlure cutanée. Toutefois cette complexité peut également être considérée comme un désavantage car elle rend plus difficile l'analyse spécifique d'un paramètre donné. Les animaux utilisés pour étudier la cicatrisation et étudier la brûlure sont généralement les rongeurs (rats et souris), le lapin et le porc (Qu and Nourbakhsh, 2017; Xu et al., 2012). Cependant ces modèles animaux présentent des différences avec l'humain notamment en ce qui concerne la réponse à la brûlure.

Le modèle rongeur est couramment utilisé en laboratoire ; il a comme avantage d'être facilement manipulable et moins coûteux que les modèles réalisés sur les animaux de plus grande taille. De plus il existe des nombreuses lignées de rongeurs mutantes ou génétiquement modifiées ce qui permet de cibler spécifiquement certaines voies de signalisation (Coolen et al., 2008). Cependant, comparée à la peau humaine, la peau des rongeurs présente d'importantes différences structurelles et fonctionnelles (**Figure 30**). La peau des rongeurs est notamment

plus fine que la peau humaine, et dépourvue de papilles dermiques. La peau des rongeurs est également très élastique du fait d'une adhérence plus faible aux structures sous-jacentes (Qu and Nourbakhsh, 2017). La pilosité est plus dense chez les rongeurs et on observe un muscle sous-cutané, le Panniculus Carnosus, absent de la peau humaine. Ce muscle permet notamment une fermeture des plaies qui se fait principalement par contraction chez les rongeurs contrairement à la peau humaine où la fermeture de la plaie se fait principalement par formation d'un tissu de granulation puis réépithélialisation (Coolen et al., 2008; Qu and Nourbakhsh, 2017; Zomer and Trentin, 2018). Des différences notables entre rongeur et humain peuvent être relevées en ce qui concerne l'expression cutanée de cytokines après brûlure. Par exemple, l'IL-8, le CXCL-7 et le CXCL-11 ne sont pas induits chez la souris dans les modèles de brûlures. En réponse à l'IL-1, il a été montré que les kératinocytes et fibroblastes humaines expriment notamment de l'IL-8 ainsi que d'autres médiateurs inflammatoires alors que les cellules de souris produisent de la Keratinocyte-derived chemokine (Zomer and Trentin, 2018). Les modèles rongeurs ne permettent donc qu'une approximation des mécanismes développés chez l'homme durant la brûlure et la phase de cicatrisation.



Un modèle *in vivo* couramment utilisé dans l'étude de la brûlure est effet un modèle porcin. La peau de porc possède de grandes similitudes avec la peau humaine à la fois dans la structure (**Figure 31**) et dans les processus de cicatrisation. L'épaisseur de l'épiderme de cochon (30-140 μm) est semblable à l'épaisseur de l'épiderme humain (50-120 μm) (Sullivan et al., 2001). La pilosité moins dense chez le porc par rapport aux autres animaux est plus proche de celle de la peau humaine. La peau du porc est également fermement attachée aux structures sous-jacentes ; ainsi la cicatrisation passe comme chez l'humain par la formation d'un tissu de granulation. Une légère différence est une plus faible densité vasculaire dans le derme de la peau de porc. On retrouve néanmoins les mêmes phases du processus de cicatrisation que chez l'homme: inflammation, prolifération, remodelage (Qu and Nourbakhsh, 2017). Néanmoins la manipulation fastidieuse et le coût d'entretien élevé des gros animaux limitent leur utilisation.

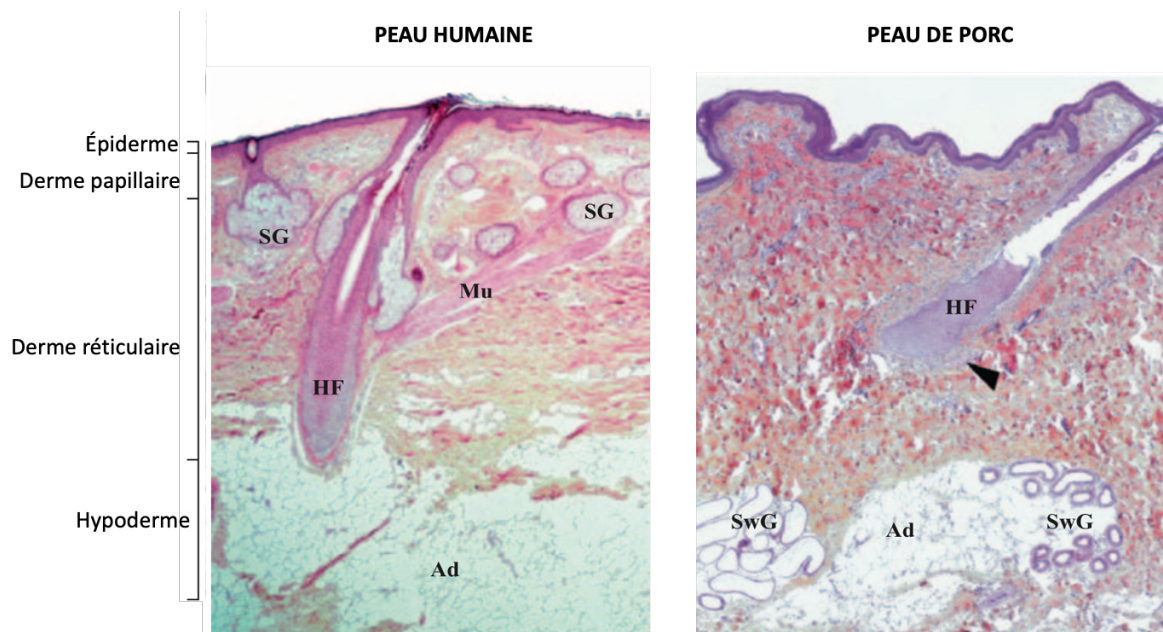


Figure 31. Peau humaine versus peau de porc. HF : Follicule pileux ; SG : glande sébacée ; SwG : glande sudoripare; Ad : adipocytes ; Traduit de (Debeer et al., 2013)

Comme nous avons pu le voir, le modèle animal présente encore beaucoup de limites et ne peut reproduire qu'en partie la séquence d'évènement qu'on retrouve chez l'humain dans le contexte de la brûlure cutanée. Même si le porc semble le modèle se rapprochant le plus du modèle humain, le coût élevé de l'entretien et évidemment pour les questions d'éthique soulevées par l'expérimentation animale d'une façon générale ont conduit les chercheurs à élaborer et tester différents modèles alternatifs de brûlure. Il est également compliqué de recréer une situation de grand brûlé qui nécessiterait de brûler les animaux sur une très grande surface ($>20^\circ\text{C}$), ce qui

soulève une nouvelle fois des questions éthiques. Le modèle animal ne représente donc pas la solution optimale pour l'étude des brûlures. De plus, la diversité des modèles animaux entraîne une hétérogénéité, des résultats qui sont accentués par le manque de protocole standardisé de brûlures. Si l'on prend l'exemple du modèle porc on note ainsi une grande diversité des méthodes de brûlure (barre d'aluminium, de cuivre, bouteille d'eau), de la durée d'exposition et de la température de la brûlure – entraînant des brûlures partielles profondes ou totales - taille de la brûlure, variétés de porcs utilisés (Wardhana et al., 2018). Ces différences participent à la difficulté de comparer les résultats provenant de différentes études.

2.2 Modèles *in vitro*

En préambule, on peut rappeler les avantages et faiblesses des études *in vitro* sur cellules cutanées. Les cultures pures de cellules cutanées (le plus souvent fibroblastes ou kératinocytes) permettent d'analyser l'impact d'un actif sur un type cellulaire donné dans un modèle simple. Par exemple, c'est grâce à des cultures pures de cellules de leucocytes qu'ont pu être mis en évidence des effets chimiotactiques des chémokines (ou chémokine) (Boyden, 1962). Ces études sur cellules sont obtenues rapidement, sont moins coûteuses que les études *in vivo* et sont également facilement normalisables (Coolen et al., 2008). Par ailleurs, elles peuvent être réalisées sous forme de co-cultures prenant en compte les interactions entre 2 types cellulaires.

2.2.1 Méthode « sans plaie » de brûlure *in vitro*

Fernandes et al. ont mis au point un modèle de brûlure *in vitro* en appliquant une plaque de verre chauffée au micro-onde sous la boîte de culture de cellules 30s. La chaleur est diffusée de la plaque de verre à travers la boîte de culture jusqu'aux cellules (**Figure 32**). Pour stopper la brûlure, du milieu de culture à 4°C est ajouté. Ils ont pu observer une diminution drastique de la viabilité associée à une baisse du nombre de cellules en mitose et à une augmentation de cellules présentant un noyau pycnotique (Fernandes et al., 2014). Ces altérations cellulaires étaient accompagnées de modifications dans la structure de la membrane plasmique et du cytosquelette (Fernandes et al., 2014). Cette technique permet d'observer les premiers changements qui s'opèrent au niveau des cellules cutanées suite au contact avec une forte chaleur. Cependant cette technique ne permet pas d'observer les étapes de cicatrisation post-brûlure. De plus, il n'y a pas création d'une lésion de type plaie avec perte de substance localisée.

Par ailleurs, cette étude a été réalisée sur une lignée de fibroblastes murins (NIH-3T3). Il serait plus pertinent de l'étendre à des cultures primaires de cellules humaines et de comparer les effets obtenus dans différents types cellulaires (fibroblastes, kératinocytes, cellules immunitaires, cellules endothéliales, mélanocytes).



Figure 32. Brûlure *in vitro* par transfert de chaleur de la plaque en verre du four à micro-ondes à la plaque de culture en verre (Fernandes et al., 2014).

2.2.2 Méthode de plaie sans chaleur – scratch test

La méthode de scratch test est la plus utilisée pour l'étude *in vitro* de la cicatrisation. C'est une technique peu coûteuse, facilement réalisable (**Figure 33**). C'est une méthode simple qui consiste à créer une « blessure » dans la monocouche de cellules afin de créer un vide imitant une plaie.

Le « scratch » ou la plaie est généralement réalisé à l'aide d'un cône stérile. Les cellules vont proliférer et migrer jusqu'à rétablissement de contacts intercellulaire et comblement de l'espace créé. Il est ensuite possible d'observer l'évolution de la fermeture de la plaie par imagerie. On observe alors deux paramètres : la migration et la prolifération des cellules (Liang et al., 2007; Steinstraesser et al., 2009). On peut observer rapidement (environ 24h) la fermeture de la plaie et l'impact d'un agent sur la fermeture de la plaie. Il est également possible de cibler uniquement la migration en inhibant la prolifération de cellules avec l'ajout d'un agent antiméiotique, comme par exemple la mitomycine c (Nasca et al., 1999; Wu et al., 2016).

Différentes études ont utilisé cette méthode sur les kératinocytes pour étudier la cicatrisation (Cao et al., 2006; Haase et al., 2003; Hettler et al., 2013; Nasca et al., 1999; Wu et al., 2016). Des expériences de transfection sont également possibles sur ce type de modèle. Par exemple, Wu et al, ont utilisé des vecteurs afin de surexprimer le gène Src et des siRNA afin d'éteindre l'expression de du gène Src ; ils ont pu mettre ainsi en évidence que Src stimule la migration des kératinocytes en régulant MMP-2 (Wu et al., 2016).

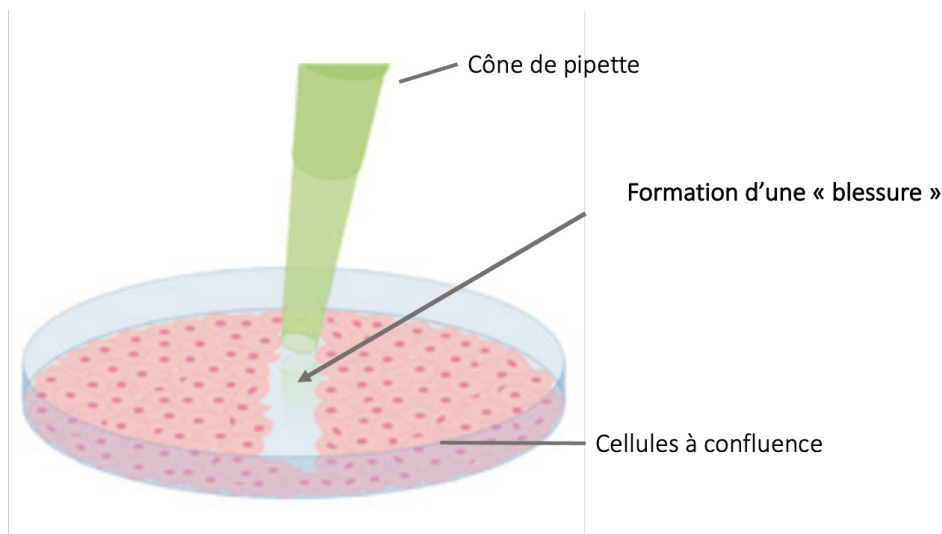


Figure 33. Schéma de la méthode du scratch test. Modifiée de (Stamm et al., 2016)

Cette technique permet de créer une plaie artificielle mais ne recrée pas un dommage par la chaleur comme c'est le cas avec une brûlure.

2.2.3 Méthode de plaie par chaleur

Bien que réalisée sur des cellules endothéliales, une étude publiée en 2013 (Hettler et al., 2013) utilise un procédé de lésion thermomécanique qui pourrait être applicable aux cellules cutanées. Dans cette étude, des cellules endothéliales humaines de veine ombilicale ont été lésées par un dispositif chauffant en aluminium. Ce dispositif est un instrument relativement complexe (avec un système de résistance et un contrôleur de température fixés par une colle en polyamide permettant de servir de barrière thermique) (**Figure 34**). Des brûlures circulaires d'1s à 100°C ont été pratiquées, induisant, en bordure de plaie, une zone de cellules mortes à proximité immédiate de la plaie puis une zone mixte composée à environ 50% de cellules mortes et enfin, une zone de cellules vivantes restées intactes. Contrairement au scratch test, où

les cellules en bordure de plaie sont intactes, ici, la chaleur s'étant diffusée, les cellules en bordure de plaie sont également modifiées, avec notamment une perte du contact cellules-cellules. Les auteurs.trices ont pu observer une nécrose des cellules adjacentes à la brûlure jusqu'à 6h après la brûlure. En revanche, une mort par apoptose signée par l'expression de caspase 3 est retrouvée dans les cellules en bordure de plaie, dans les 1-3 heures après la brûlure ce qui n'est pas observé dans un modèle contrôle de plaie sans brûlure. De façon intéressante, une augmentation de la synthèse de ROS a également été observée après induction de la brûlure, signature classique de cellules soumises à un stress thermique (Hettler et al., 2013).

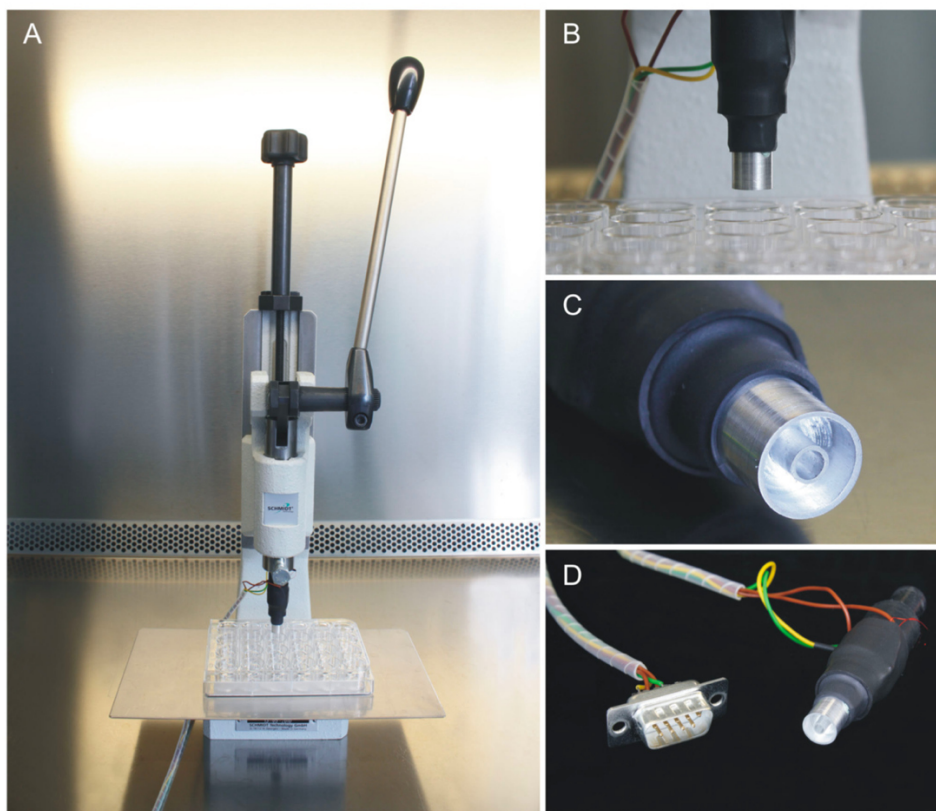


Figure 34. Méthode de brûlure thermique par application d'un dispositif chauffé à 100°C pendant 1s sur cellules *in vitro* (Hettler et al., 2013). (A) Le dispositif de brûlure par un système de presse manuelle. (B ; C) Embout permettant la brûlure : 2 cercles de brûlures. (D) Détails de l'embout et des branchements

L'objectif de cette étude était de mettre en place un système mimant une électrochirurgie de coagulation des tissus, plus spécifiquement le scellement des vaisseaux sanguins. C'est le modèle *in vitro* se rapprochant au mieux d'une brûlure entraînant à la fois une plaie et des dommages aux cellules environnantes. Il semble possible d'appliquer ce modèle à des cultures

de kératinocytes et à d'autres cellules cutanées afin d'observer les effets cellulaires et moléculaires infligés par la brûlure au niveau des zones lésionnelles et péri lésionnelles.

Ces modèles *in vitro* sont intéressants pour analyser des voies de signalisation et l'impact d'agents actifs sur des processus biologiques induits par la brûlure à la phase aiguë ou subaiguë (migration, prolifération, synthèse de ROS, modifications protéomiques et génomiques ect...). Cependant ils ne permettent pas d'investiguer les processus de la cicatrisation. L'absence d'environnement tissulaire est un frein aux possibilités de translation des résultats vers l'*in vivo*. Mais ces approches cellulaires "simples" peuvent apporter des informations essentielles à la conception et l'interprétation de modèles *in vivo*. Ils permettent également de respecter la règle éthique des 3R ("refinement, reduction, replacement"), destinée à limiter l'usage des expériences *in vivo*.

Il existe également des modèles plus complexes, tridimensionnels, d'équivalents de peau. Ces équivalents de peau sont produits généralement à partir d'un équivalent derme obtenu par l'ensemencement de fibroblastes dans une matrice (souvent de collagène I ou de fibrine). Une monocouche de kératinocytes déposée sur cet équivalent derme va ensuite proliférer puis se différencier pour former un équivalent épiderme. Bien que ce modèle soit plus complet que le modèle 2D de culture pure de cellule, la matrice extracellulaire qui sert de charpente ("scaffold") au derme reconstruit est composée d'une seule protéine ce qui peut altérer le comportement physiologique des fibroblastes. Généralement, seuls les fibroblastes et kératinocytes sont inclus dans ce modèle bien que de nouveaux procédés visent à inclure également des cellules immunitaires, des mélanocytes afin de complexifier le modèle et le rapprocher de la physiologie. De plus les équivalents de peaux matures ne sont générés qu'après de longues semaines de culture et nécessitent une expertise et un équipement spécifique (Steinstraesser et al., 2009; Ud-Din and Bayat, 2017).

2.3 Modèle *ex vivo*

Les modèles *ex vivo* de lésion sur peau humaine sont réalisés sur des cultures explants de peau généralement obtenus à partir de résidus de chirurgie plastique ou dans de plus rares cas chez des volontaires sains des patients souffrant de pathologies cutanées spécifiques ou malades. Dans le contexte des recherches sur les mécanismes et le traitement des brûlures de peau, ces modèles permettent d'étudier à l'échelle tissulaire l'impact initial de la brûlure et le

processus de cicatrisation qui en découle. Ces modèles sont plus satisfaisant que les études sur cultures cellulaires 2D ou sur équivalent peau car le tissu étudié est natif et qu'on y retrouve toutes les structures présentes dans la peau *in vivo* : matrice extracellulaire complète comprenant une grande variété de protéines (collagène I et III, fibres élastiques ect...), présence de nombreux types cellulaires (kératinocytes et fibroblastes mais également cellules immunitaires, cellules endothéliales, mélanocytes,) ainsi que des annexes cutanées (follicules pileux, glandes sébacées) et des terminaisons nerveuses. Les interactions cellulaires complexes vont y être également maintenu. Nous aborderons successivement la problématique des modèles de brûlures puis des modèles de plaies cutanées par incision.

2.3.1 Modèles de brûlure *ex vivo*

Malgré les avantages décrits ci-dessus, relativement peu de travaux se sont appuyés sur le modèle d'explant de peau pour étudier les mécanismes physiopathologiques de la brûlure. On peut répertorier seulement cinq articles publiés décrivant et/ou utilisant des modèles de brûlure *ex vivo* sur explant de peau (Coolen et al., 2008; Emanuelsson and Kratz, 1997; Kratz, 1998; Qu et al., 2016; Sivamani et al., 2009) (**voir Tableau 3**). Au total, 4 modèles de brûlure sur explant ont été décrits. Nous verrons que les différences relatives au milieu de culture, au temps d'exposition et à la méthode de brûlure sont responsables de différences notables en termes de profondeur des lésions et de cinétique de cicatrisation.

a. Modèle d'Emanuelsson et Kratz

Emanuelsson et Kratz sont les premiers à avoir mis au point un modèle *ex vivo* de brûlure. Décrit dans un premier article (Emanuelsson and Kratz, 1997) ils ont ensuite comparé ce modèle à un modèle de lésion cutanée par incision (biopsie punch) dans un second article (Kratz, 1998).

Principales caractéristiques du modèle :

- **Dimension de l'explant de peau** : 10x3mm
- **Agent de la brûlure** : tige en laiton de 0.5mm
- **Température** : 150°C
- **Durée d'exposition** : 1s
- **Milieu de culture** : DMEM – 10% de Sérum de veau foetal (SVII) – antibiotiques

- **Support de culture** : immersion en plaque 12 puits

Les auteurs.trices ont observé une réépithélialisation de la plaie brûlée et ont pu vérifier la viabilité des kératinocytes et des fibroblastes après 14 jours de culture des explants en condition contrôle ou de brûlure.

Par comparaison au modèle de plaie par incision, Kratz *et al.* ont observé un retard de réépithélialisation du modèle brûlure corrélée à l'existence d'un processus de nécrose touchant l'épiderme et le derme observable durant les 2 premiers jours post-brulure. Le début de réépithélialisation dans le cas de la brûlure est visible à partir du 4^{ème} jour contre 2 jours pour la plaie par incision. De plus, dans le cas de la brûlure, la zone de tissu non viable couvre une surface péri-lésionnelle importante (2 fois plus étendue que la surface de lésion initiale) alors que les berges de la plaie par incision sont viables (et a fortiori les zones distantes de la plaie).

b. Modèle de Sivamani et al.

Sivamani *et al.* ont utilisé le modèle d'Emanuelsson et Kratz en apportant une modification sur la température de chauffage de la tige (200°C au lieu de 150°C) (Sivamani et al., 2009).

Le but de ce travail était de tester l'impact d'un actif (épinéphrine et timolol) sur la cicatrisation de la brûlure. L'actif a été directement ajouté au milieu de culture. On peut noter que dans cette étude, les effets thérapeutiques de l'actif ont également été testés dans un scratch test et dans un modèle murin *in vivo*.

c. Modèle de Coolen et al.

Coolen et son équipe ont mis en place un nouveau modèle de brûlure *ex vivo* (Coolen et al., 2008).

Principales caractéristiques du modèle :

- **Dimension de l'explant de peau** : 1 cm² – 0,5 mm d'épaisseur
- **Agent de la brûlure** : Dispositif chauffé au fer à souder
- **Température** : 95°C
- **Durée d'exposition** : 10s

- **Milieu de culture** : DMEM/Ham F12 (3 :1), 2% SVII, 1µM hydrocortisone, 1µM isoproterenol, 0,1 µM insulín 1,0x10⁻⁵ M L-carnitine, 1,0x10⁻² M L-serine, 1 mM DL- α -tocopherol, 130 mg/ mL ascorbic acid, a lipid supplement (containing 25 mM palmitic acid, 15 mM linoleic acid, 7 mM arachidonic acid, and 24 mM bovine serum albumin) et antibiotiques
- **Support de culture** : sur grille métallique à l'interface air/liquide

Les auteurs.trices ont pu observer que la réépithélialisation de la plaie dans ce modèle était plus lente que celle observée *in vivo* (avancée de kératinocytes : environ 50 µm/j au lieu de 150-300 µm/jour *in vivo*). Ils ont observé une restauration de la lame basale (Collagène IV et laminine) et dans le derme, **une absence de myofibroblastes** (identifiés par l'expression de l' α -SMA). Cette absence de myofibroblastes pourrait être due à une absence de facteurs de croissance dérivés des plaquettes et/ou à une absence de tension mécanique.

d. Modèle de Qu et al.

Qu et son équipe ont mis en place un modèle de brûlure incluant également une épaisseur de tissu adipeux (Qu et al., 2016).

Principales caractéristiques du modèle :

- **Dimension de l'explant de peau** : 2 cm²
- **Agent de la brûlure** : Système « McKenna burner » - brûlure par flamme de 1 cm
- **Température** : 300-400°C
- **Durée d'exposition** : 10-70s
- **Milieu de culture** : DMEM – 10% SVII – antibiotiques
- **Support de culture** : tissu incorporé dans un polymère polysaccharidique (agarose)

De façon intéressante, les auteurs.trices ont pu mettre en évidence une migration de macrophages depuis le tissu adipeux de l'hypoderme vers le derme au niveau de la brûlure. Ce modèle permet donc d'étudier l'importance du tissu adipeux dans la cicatrisation de la brûlure.

Tableau 3. Modèles d'étude sur la brûlure *ex vivo* de peau humaine

| Références | Milieu de culture | Support | Tension mécanique | Culture à l'interface A/L | Réalisation de la blessure | Résultats – commentaires |
|--------------------------------|---|---|-------------------|---------------------------|---|---|
| (Kratz, 1998) | DMEM supplémenté de 10% Sérum de Veau Foetal et d'antibiotiques | Biopsie de 3mm de largeur | NON | NON | Brûlure 1s avec une corde en laiton chauffé à 150°C | Comparaison modèle <i>ex vivo</i> d'incision et de brûlure |
| (Coolen et al., 2008) | DMEM/Ham F12 (3 :1), 2% SVII, 1µM hydrocortisone, 1µM isoproterenol, 0,1 µM insulín 1,0x10 ⁻⁵ M L-carnitine, 1,0x10 ⁻² M L-serine, 1 mM DL-α-tocopherol, 130 mg/ mL ascorbic acid, a lipid supplement (containing 25 mM palmitic acid, 15 mM linoleic acid, 7 mM arachidonic acid, and 24 mM bovine serum albumin) et penicillin/streptomycin | Peau 1cm ² posée sur une grille métallique | NON | OUI | Brûlure 10s à 95°C (métal chauffé au fer à souder) | Observation d'une prolifération et migration des kératinocytes. Réépithélialisation plus lente qu' <i>in vivo</i> . Modèle utilisé pour étudier l'impact d'agent pharmacologiques, cosmétiques sur la cicatrisation. |
| (Sivamani et al., 2009) | DMEM supplémenté de 10% Sérum de Veau Foetal et d'antibiotiques | Biopsies 2x10 mm | NON | NON | Brûlure 1s avec tige en laiton chauffée à 200°C | Étude de la réépithélialisation après brûlure |
| (Qu et al., 2016) | Incorporation dans un polymère d'agarose - DMEM/F-12 supplémenté de 10% de SVII et d'antibiotiques | Biopsie 2x2 cm avec 1cm de tissu adipeux | NON | Pas spécifié | Brûlure par flamme – 10 à 70s (300-400°C) | 1 ^{er} modèle <i>ex vivo</i> de brûlure humaine avec une partie du tissu adipeux |

2.3.2 Modèles de cicatrisation – plaie par incision

Le peu d'études sur le modèle de brûlure *ex vivo* nous pousse à compléter notre synthèse bibliographique en nous intéressant aux des modèles *ex vivo* de plaie par incision sur explant de peau humaine (voir **Tableau 4**, non exhaustif). Dans tous ces travaux, la culture de peau s'effectue à l'**interface air/liquide** et l'objectif principal de ces études est d'analyser les processus de cicatrisation et de tester de potentiels actifs. La majorité des études (5 sur 7) utilisent du DMEM supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVII) et d'antibiotiques comme milieu de culture. Il est intéressant de voir également que dans certaines de ces études a été appliqué **une tension mécanique** (Steinstraesser et al., 2009; Xu et al., 2012). Comme l'avait souligné Coolen *et al*, l'absence de stress mécanique peut empêcher la différenciation de fibroblastes en myofibroblastes. Il a été également montré que les tensions mécaniques sont importantes dans la cicatrisation. En effet, la tension stimule la prolifération des kératinocytes (Yano et al., 2006) et leur sécrétion de MMP9, nécessaire à leur migration (Renò et al., 2009). Dans l'étude de Xu *et al*, la peau est suturée à un tamis cellulaire à 8 extrémités (Xu et al., 2012). Afin d'appliquer une tension mécanique, Steinstraesser *et al* utilisent en revanche un système plus complexe avec une chambre en acier inoxydable (**Figure 35**) (Steinstraesser et al., 2009).

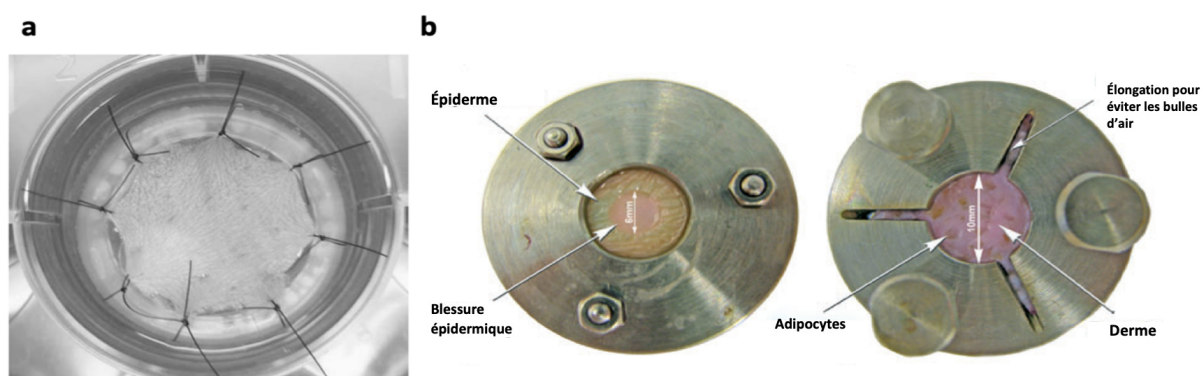


Figure 35. Système de tension mécanique dans modèle de cicatrisation de peau humaine *ex vivo*. (a) Issue de (Xu et al., 2012). (b) Traduit de (Steinstraesser et al., 2009).

2.3.3 Avantages et limites des modèles *ex vivo* sur explant de peau

L'analyse comparative du peu de modèles *ex vivo* dont on dispose pour étudier les brûlures suggère que le modèle de Coolen *et al.*, est le plus proche des conditions *in vivo*. En effet, la culture d'explant y est réalisée à l'interface air/liquide, l'apport en nutriments des kératinocytes se fait donc uniquement par le derme de la même façon qu'en *in vivo* et le contact avec l'air permet de maintenir l'état de différenciation des couches les plus superficielles de l'épiderme. De plus, une culture à l'interface air-liquide permet de **tester des agents pharmacologiques** ou cosmétiques **en topiques** en reproduisant les conditions d'une application *in vivo*.

Cependant, il y a des problèmes de standardisation des techniques, que ce soit pour les modèles *ex vivo* de brûlures, ou les modèles *ex vivo* de plaie par incision (voir Tableaux 1 et 2). La normalisation de la méthode de brûlure est une limite importante au sein même d'une étude. Il est en particulier important dans le cas d'une brûlure de contact de ne pas appliquer de pression en dehors du poids de la tige. Des variations de pression d'une expérience à l'autre peuvent entraîner des différences quant à la profondeur de brûlure et aux processus de cicatrisation. Certaines études utilisent aussi bien de la peau d'abdomen que de la peau de sein dans le modèle de lésion par incision (Andrade *et al.*, 2015; Steinstraesser *et al.*, 2009). Or, l'épaisseur de la peau change en fonction de sa localisation et il est donc préférable d'effectuer ses expériences sur de la peau provenant d'une même zone.

Une des limites des modèles sur explant de peau est la relativement courte durée de survie cellulaire au sein du tissu en culture. En général, les protocoles utilisés permettent de maintenir -jusqu'à **14 jours de cultures** les explants, parfois jusqu'à 21 jours. Seule l'équipe d'Andrade *et al.*, a développé un modèle permettant une culture prolongée d'explant de peau saine jusqu'à 75 jours (Andrade *et al.*, 2015). Il est donc possible d'étudier les premières étapes post-brûlures et le début de la cicatrisation ainsi que les effets à court terme de la réponse à un traitement (Andrade *et al.*, 2015; Qu and Nourbakhsh, 2017) avec une application topique directement sur la plaie ou dans le milieu de culture.

L'absence de l'environnement complet, notamment l'absence de système vasculaire et de système immunitaire, dans les modèles explants et la nécessité d'analyser des mécanismes se développant à long terme (par exemple la formation complète d'une cicatrice) rendent les modèles *in vivo* indispensables pour compléter et renforcer les résultats obtenus sur des modèles

ex vivo. Comme mentionné plus haut, celui-ci permet néanmoins de limiter le nombre d'études *in vivo* et en particulier de screener des agents actifs afin de ne sélectionner que quelques candidats qui seront par la suite évalués *in vivo*.

Tableau 4. Modèles d'étude de la cicatrisation *ex vivo* de peau humaine (liste non exhaustive)

| Références | Milieu de culture | Support | Tension mécanique | Culture à l'interface A/L | Réalisation de la blessure | Résultats – commentaires |
|--------------------------------------|--|---|--------------------------|----------------------------------|--|---|
| (Xu et al., 2012) | DMEM supplémenté de 10% Sérum de Veau Fœtal et d'antibiotiques | Culture sur tamis cellulaire en nylon plaque 6 puits | OUI | OUI | Incision au scalpel | Vérifier la robustesse de leur modèle et la viabilité de la peau en culture – morphologie ok jusqu'à 12 jours, membrane basale intacte jusqu'à 21 jours, prolifération des Kc jusqu'à 12 jours Réépithélialisation et production de collagène après blessure |
| (Steinstraesser et al., 2009) | DMEM supplémenté de 10% Sérum de Veau Fœtal et d'antibiotiques | Chambre en acier inoxydable en plaque 6 puits – peau en triangle de 2,5cm de côté | OUI | OUI | Incision au scalpel ou punch | Après 14 jours de culture : diminution du nombre de cellules, changement structurelle de l'épiderme Après 21 jours : changements structuraux du collagène dans le derme |
| (Mendoza-Garcia et al., 2015) | Différents milieux de culture testés | Biopsie de 8mm de diamètre dans insert | NON | OUI | Incision avec un biopsy punch (1-3 mm) | Comparaison de différents milieux de culture, de largeur/profondeur de la plaie Test traitement photodynamique |
| (Yoon et al., 2019) | DMEM supplémenté de 10% Sérum de Veau Fœtal | Biopsie de 8mm de diamètre | NON | OUI | Incision avec un biopsy punch de 3 mm | Étude de l'infection de la plaie sur la cicatrisation |
| (Rakita et al., 2020) | DMEM supplémenté de 10% Sérum de Veau Fœtal et d'antibiotiques | Biopsies de 6 mm | NON | OUI | Blessure par pression de 200-250 mm de mercure (suction) | Modèle <i>ex vivo</i> de cloque puis de plaie |
| (Tomic-Canic et al., 2007) | Milieu de culture GIBCO-BRL | Biopsie de 1cm ² | NON | OUI | Incision avec un biopsy punch de 4 mm | Test de différents traitements |

Chapitre 3 : Le sulfure d'hydrogène (H₂S) : un gazotransmetteur aux multiples effets biologiques

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux effets biologiques dus à l'impact de l'H₂S, gaz faisant partie de la famille des gazotransmetteurs. Nous aborderons dans un premier temps la notion de gazotransmetteur et des notions générales sur les sources d'H₂S, les mécanismes moléculaires induits par l'H₂S ainsi que les difficultés liées à sa manipulation en laboratoire. Nous traiterons ensuite des effets cliniques et biologiques de l'H₂S en nous attardant plus spécifiquement sur les données de la littérature concernant les effets de l'H₂S sur les kératinocytes humains et dans les processus de cicatrisation cutanée.

1. Généralités sur H₂S

1.1 L'H₂S est le 3^{ème} gazotransmetteur

Qu'est-ce qu'un gazotransmetteur ?

Les gazotransmetteurs sont une famille des molécules de signalisation présentant les caractéristiques suivantes (Akter, 2016; Wang, 2014) :

- (1) Petite molécule gazeuse
- (2) Perméable à la membrane plasmique – indépendamment de récepteurs/transporteurs spécifiques
- (3) Générée de manière endogène
- (4) Exerçant des fonctions spécifiques à des concentrations physiologiques
- (5) Induisant la transduction d'un signal pouvant être mimée par l'application exogène du gazotransmetteur et ciblant un ensemble de molécules spécifiques

On retrouve dans cette famille : i) le monoxyde d'azote, NO, le premier gazotransmetteur identifié, ii) le monoxyde de carbone, CO et iii) l'H₂S, dernier gazotransmetteur identifié à ce jour. Les gazotransmetteurs ont été conservés au cours de l'évolution chez les bactéries, les plantes et les cellules de mammifères. Ils semblent donc essentiels et irremplaçables dans leurs fonctions biologiques (Wang, 2014). La simplicité de la structure des gazotransmetteurs permet des trajets intra et intercellulaires rapides. De plus, les gazotransmetteurs sont présents dans tous les organes, toutes les cellules, ce qui leur confère une activité potentiellement ubiquitaire. Ils forment ainsi un réseau à travers tout le corps. La volatilité des gazotransmetteurs permet

une diminution rapide de leur quantité au niveau du site de production et permet ainsi d'éteindre rapidement la voie de signalisation qu'ils induisent sans l'intervention d'autres molécules en rétrocontrôle. En comparaison, de nombreuses molécules non-gazeuses nécessitent une action enzymatique afin d'être éliminées, ce qui représente une consommation d'énergie et de temps supplémentaires pour la cellule. Bien que les gazotransmetteurs soient présents à de très faibles concentrations dans les tissus, les liquides biologiques et la matrice extracellulaire, leur diffusion rapide à travers la membrane plasmique ainsi que leurs propriétés physico-chimiques leur confèrent de multiples activités biologiques. Le sulfure d'hydrogène présente l'ensemble des caractéristiques décrites ci-dessus. Lorsqu'il est libéré dans l'atmosphère, il s'agit d'un gaz incolore, inflammable et présentant une forte odeur soufrée. Il est facilement soluble dans l'eau mais également dans les lipides ce qui lui permet de traverser les membranes plasmiques et pénétrer librement dans les cellules (Chen et al., 2007; Mathai et al., 2009; Wang, 2002).

1.2 Sources d'H₂S

1.2.1 Sources exogènes

L'H₂S est apparu sur Terre bien avant l'oxygène et a été lié à l'émergence de formes primitives de vie. On considère en effet que les premières formes de vie sur Terre, remontent à environ 3,8 milliards d'années et se sont développées dans un environnement anoxique et qui peut être considéré comme réducteur au regard de la génération de carbone organique et d'acides aminés primitifs à partir de CO₂ (Olson et al., 2018; Wächtershäuser, 1992). En particulier, la cystéine et la méthionine sont 2 acides aminés contenant du soufre et qui auraient pu être formés à partir de l'H₂S (Filipovic et al., 2018). L'H₂S était déjà présent dans l'atmosphère, libéré notamment par les émissions volcaniques (Filipovic et al., 2018) et jouait probablement le rôle d'agent réducteur vis-à-vis du CO₂.

Ces conditions environnementales ont persisté jusqu'à l'apparition de la photosynthèse oxydative chez les cyanobactéries, phénomène qui a induit il y a environ 2,3 milliards d'années le « grand événement d'oxydation » (GOE pour « great oxidation event »), caractérisé par une augmentation de l'oxygène atmosphérique jusqu'aux taux de 0,5 - 1% (Olson et al., 2018). C'est grâce au développement de processus de défense contre le stress oxydant que de multiples formes de vie ont pu émerger dans ce milieu devenu fortement oxydant. Certains auteurs proposent toutefois que les gènes de protection vis-à-vis du stress oxydant préexistaient au GOE

et servait primitivement à protéger la cellule d'effets délétères exercés par les espèces réactives du soufre (RSS pour « Reactive Sulfure Species ») et non pas d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour « Reactive Oxygen Species »). Selon cette théorie, les principales enzymes antioxydantes dont la catalase, la SOD (superoxyde dismutase), la thiorédoxine et la peroxiredoxine) auraient eu comme substrat initial et exclusif les RSS. Dans un deuxième temps, postérieur au GOE, ces enzymes auraient exercé leur activité sur les ROS principalement, et sur les RSS accessoirement (Olson et al., 2018; Wächtershäuser, 1992)

Actuellement, H₂S est produit naturellement dans l'environnement via la dégradation anaérobie du sulfate par les bactéries ou par le biais de la dégradation des protéines contenant du soufre chez les mammifères. L'H₂S est également généré ou utilisé dans plus de 70 de procédés industriels (synthèse de fibres artificielles, production alimentaire, traitement des eaux usées...) (Dorman et al., 2002; Malone Rubright et al., 2017).

La concentration atmosphérique d'H₂S considérée comme normale et comprise entre 0,11ppb et 0,33 ppb (ppb = partie par milliard). Elle peut atteindre une concentration de 1 ppb dans les zones urbaines et avoisiner les 100 ppb dans les zones proches de sources d'émission par milliard) (Malone Rubright et al., 2017).

1.2.2 Sources endogènes chez les mammifères

L'H₂S est également une molécule gazeuse physiologique synthétisée de manière endogène. Dans les cellules de mammifères, l'H₂S peut être synthétisé via l'action de 3 enzymes : la cystathionine β synthetase (CBS), la cystathionine γ lyase (CSE) et la 3-mercaptopyruvate sulfurtransférase (MST). La synthèse d'H₂S est réalisée à partir de la L-cystéine et de l'homocystéine de manière directe par les enzymes CBS et CSE ou de manière indirecte par l'action de la MST sur le 3-mercaptopyruvate lui-même dérivé de la L-cystéine sous l'effet de la cystéine aminotransférase (CAT) (**Figure 36**) (Jin et al., 2015; Li et al., 2006; Olas, 2015; Szabo, 2017; Vandiver and Snyder, 2012).

La L-cystéine peut provenir d'une source alimentaire, libérée par des protéines ou synthétisée de manière endogène à partir de L-méthionine (Szabo, 2017).

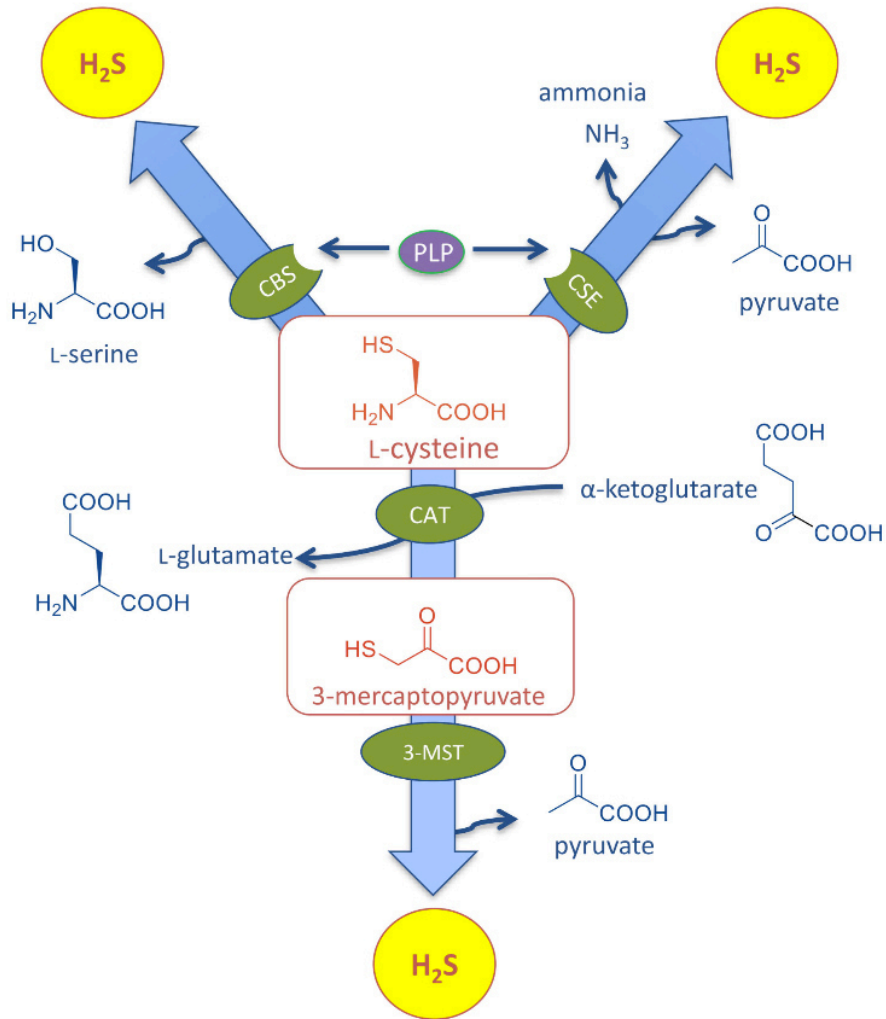


Figure 36. Schéma de la synthèse d'H₂S dans des cellules de mammifères à partir de la L-cystéine par les enzymes CBS, CSE ou 3-MST (Powell et al., 2018).

Le pattern d'expression des enzymes de synthèse de l'H₂S est complexe et indique des disparités entre organes, tissus et types cellulaires quant à la capacité de générer de l'H₂S endogène. Ainsi, l'enzyme CBS est exprimée de manière prédominante dans le système nerveux central, mais on la détecte également dans le foie et le rein. L'enzyme CSE est principalement exprimée dans le foie mais aussi dans les reins, les vaisseaux et les muscles (Olas, 2015; Szabó, 2007). La MST est présente dans le système nerveux central ainsi que dans les cellules musculaires lisses de la paroi des vaisseaux, au niveau de cardiomyocytes, des cellules rénales, et des hépatocytes. (Wallace and Wang, 2015). Par ailleurs, au plan fonctionnel, il est intéressant de noter que l'activité de CBS peut être directement inhibée par le NO et le CO (Olas, 2015; Szabó, 2007).

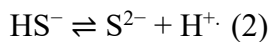
2. Métabolisme de l'H₂S

2.1 La S-sulfuration

La sulfuration est le processus dans lequel l'H₂S induit une s-sulfuration (ajout d'un ion sulfure) du ou des résidu(s) cystéine d'une protéine cible.

Pour comprendre ce processus de sulfuration, il est important de s'intéresser dans un premier temps aux propriétés physicochimiques de l'H₂S et aux équilibres qui s'établissent dans l'organisme entre les composants chimiques H₂S, HS⁻ et S²⁻.

H₂S est un acide faible diprotique, c'est-à-dire qu'il peut donner deux protons (=deux atomes d'hydrogène, H⁺) au cours de 2 réactions successives (Benchoam et al., 2019; Filipovic et al., 2018; Jin et al., 2015; Kimura, 2015) :



Pour rappel, le pKa est obtenu à partir du Ka, la constante d'acidité ou constante d'équilibre d'un couple acido-basique. Les pKa permettent alors de déterminer, en fonction du pH, quelle espèce sera prédominante.

En ce qui concerne l'H₂S, les pKa de ces 2 réactions sont respectivement : pKa1 de 6,76 à 37°C et pKa2 de 17 à 24°C (Filipovic et al., 2018; Yuan et al., 2017). A l'état physiologique (pH 7,4 et 37 °C), H₂S arrive rapidement à l'équilibre avec HS⁻. La concentration de S²⁻ est négligeable dans les tissus biologiques (Filipovic et al., 2018; KIMURA, 2015). Dans les cellules, la quantité d'H₂S et HS⁻ est presque égale, comme on peut le voir dans le diagramme de prédominance du couple H₂S/HS⁻ (**Figure 37**). Dans le plasma et le liquide extracellulaire, la proportion d'H₂S et HS⁻ est de 20 et 80% respectivement à 37°C et pH 7,4 (**Figure 37**) (Jin et al., 2015; Olson, 2009).

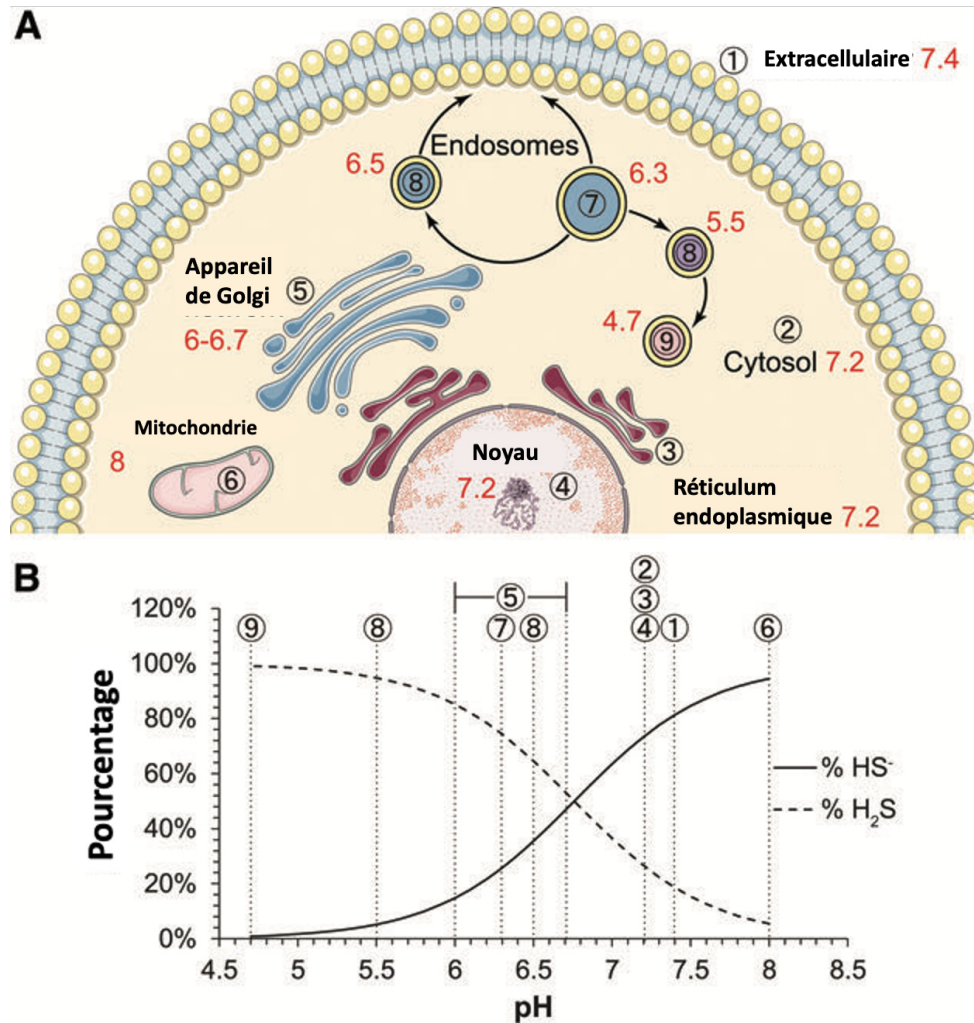


Figure 37. Ratio de H_2S et HS^- en fonction des compartiments cellulaires. (A) Numérotation des différents compartiments cellulaires (1 : extracellulaire - 2 : cytosol - 3 : réticulum endoplasmique - 4 : noyau - 5 : appareil de Golgi - 6 : mitochondrie - 7/8/9 : endosomes) et indication du pH en rouge. (B) Diagramme de prédominance du couple H_2S/HS^- en fonction du pH, les numéros des compartiments cellulaires représentés sur le diagramme en fonction de leur pH. traduit de (Yuan et al., 2017)

Les mécanismes de régulation des concentrations intra vs extracellulaires d' H_2S et de HS^- ne sont pas clairement établis. On sait toutefois que l' H_2S peut traverser librement la membrane plasmique alors que le passage d' HS^- nécessite l'activité d'un canal spécifique permettant un échange entre HS^- et l'ion chlore (Cl^-) (Jin et al., 2015; Kimura, 2015). Il est actuellement difficile d'attribuer un rôle spécifique à chacune de ces molécules sulfurées (H_2S vs HS^-).

Par ailleurs, il est important de noter que pour beaucoup d'auteurs.trices le terme « H_2S » englobe les 3 formes d'ion sulfure sans distinction (H_2S , HS^- et S^{2-}). Il est difficile de savoir quelle est la forme active (Kimura, 2015) et il paraît plus approprié de désigner ces espèces

collectivement par les termes « sulfure » ou « sulfure libre total » (Olson, 2009). Par commodité, le terme H₂S sera de la même manière utilisé tout au long de la thèse pour englober les différentes formes libres du sulfure.

Nous pouvons maintenant nous intéresser à la s-sulfuration, également appelée sulfuration, s-persulfidation ou encore la sulfhydratation (Powell et al., 2018). Durant le processus de s-sulfuration, un groupe sulfhydryle (= groupement -SH) va être transféré sur un soufre de la cible créant ainsi une liaison « sulfane-sulfure » (-SSH) (Viegas et al., 2019; Wallace and Wang, 2015). La modification consiste alors à modifier le groupe -SH d'un résidu cystéine en groupe -SSH (Powell et al., 2018; Zhang et al., 2017) (**Figure 38**). Cependant le mécanisme de s-sulfuration induit par H₂S est encore discuté.

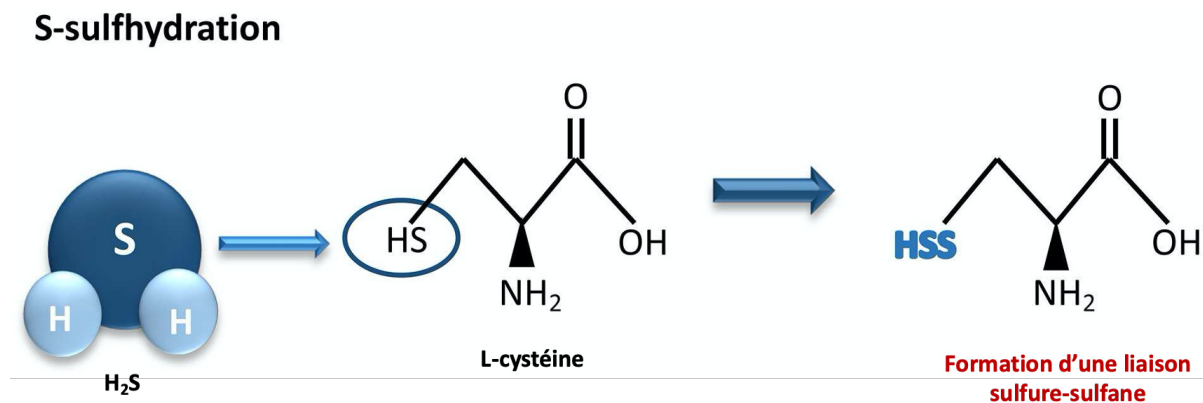


Figure 38. Réaction théorique de la s-sulfuration médiée par H₂S. H₂S ajoute un groupe sulfhydryle au soufre d'un résidu cystéine résultant à la sulfuration des cibles biologiques par la formation de ce lien « sulfure-sulfane » (-SSH) –modifié de (Viegas et al., 2019)

La s-sulfuration est une modification biochimique s'accompagnant d'une modulation fonctionnelle de l'activité des protéines ainsi sulfurées. Elle peut notamment stimuler la réactivité de la protéine et augmenter son activité biologique (Kimura, 2015; Viegas et al., 2019). Deux exemples illustrent les modifications fonctionnelles induites par la sulfuration de protéines cibles : i) la sulfuration des canaux K_{ATP} induit par l'H₂S entraîne une vasodilatation (Powell et al., 2018) ii) la s-sulfhydratation de facteurs de transcription peut induire une augmentation ou une diminution de leur activité transcriptionnelle. Nous reviendrons notamment sur l'impact de la sulfuration de Keap1 qui a été beaucoup étudié (Viegas et al., 2019).

Bien que ce mécanisme soit établi comme principale voie d'action de l'H₂S, les premières études s'intéressant à l'H₂S n'ont pas évoqué le paradoxe qu'implique cette réaction. En effet la s-sulfuration est une réaction d'oxydation et l'H₂S n'est capable d'induire cette réaction. Nous allons voir qu'il est nécessaire que l'H₂S subisse des modifications pour ensuite pouvoir agir sur les protéines par le processus de s-sulfuration.

2.2 Oxydation du H₂S

Comme mentionné plus haut, la réaction de s-sulfuration est une réaction d'oxydation.

RAPPEL : RÉACTION D'OXYDORÉDUCTION

- ❖ Une réaction d'oxydoréduction se caractérise par un transfert d'électrons
- ❖ Un oxydant va être susceptible de gagner un ou plusieurs électrons
- ❖ Un réducteur va être susceptible de perdre un ou plusieurs électrons
- ❖ La demi-équation d'un couple redox est : réducteur ↔ oxydant + n.e-



Une réaction d'oxydoréduction va être un transfert d'électrons d'un réducteur d'un couple redox vers un oxydant d'un autre couple

En fonction de la réaction une espèce peut être oxydant ou réducteur. En revanche, ce n'est pas le cas d'H₂S, dont le soufre est dans son état d'oxydation le plus bas (-2) (Kimura, 2015; Wallace and Wang, 2015). Il ne peut pas agir en tant qu'oxydant. Dans son état, il ne peut donc pas entraîner la s-sulfuration, c'est-à-dire l'oxydation, des protéines (Greiner et al., 2013; Benchoam et al., 2019). En effet pour que la réaction d'oxydoréduction se fasse le niveau d'oxydation de l'H₂S doit être à un niveau d'oxydation plus élevé que l'autre couple redox, dans notre cas à une protéine contenant un résidu cystéine (R-SH) (**Figure 39**). Or, son niveau d'oxydation est de -2 également (**Figure 40**). Les couples redox peuvent être représentés sur une échelle de potentielle redox :

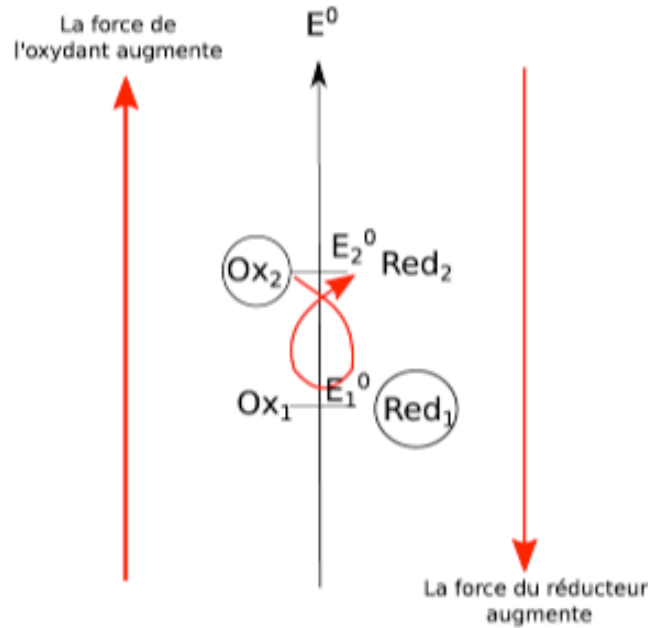


Figure 39. Représentation du principe d'oxydoréduction entre les couples redox Ox2/Red2 et Ox1/Red1 sur l'échelle de potentielle rédox. L'oxydation peut faire de l'oxydant du couple 2 (Ox2) vers le réducteur du couple 1 (Red1) car le couple redox 1 a une force oxydante plus faible.

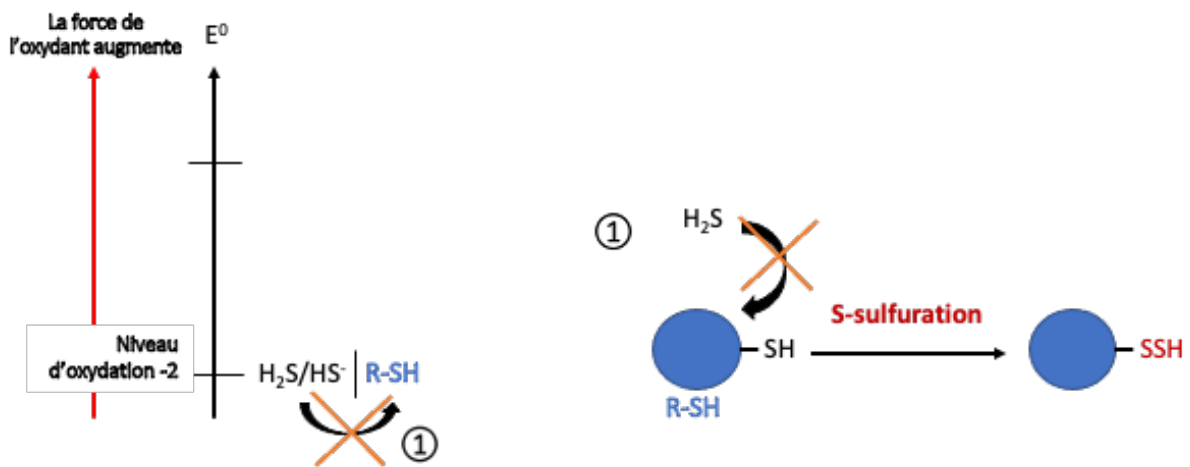


Figure 40. H₂S n'induit pas la S-sulfuration des protéines. L'H₂S est au même niveau d'oxydation que le sulfure de la cystéine de la protéine cible (R-SH).

C'est une modification de l'H₂S qui va lui permettre d'entraîner la s-sulfuration des protéines. Pour pouvoir oxyder les protéines, H₂S doit lui-même être oxydé. Il est intéressant de noter que l'atome de soufre est très polyvalent dans sa capacité à accepter ou donner des électrons, il peut alterner entre -2 et +6 états d'oxydation (Yuan et al., 2017). L'oxydation d'H₂S conduit à la formation de polysulfures. Les polysulfures sont des chaînes moléculaires d'un nombre variables d'atomes de soufres (S_n²⁻, n=2-8). L'augmentation du nombre de soufres augmente

les capacités oxydantes du polysulfure. Les polysulfures possèdent donc un plus fort pouvoir oxydant comparé à l'H₂S (Greiner et al., 2013). Ils vont être ainsi plus haut dans l'échelle et capables d'entraîner la réaction de s-sulfuration du résidu cystéine d'une protéine cible (Powell et al., 2018) (Figure 41).

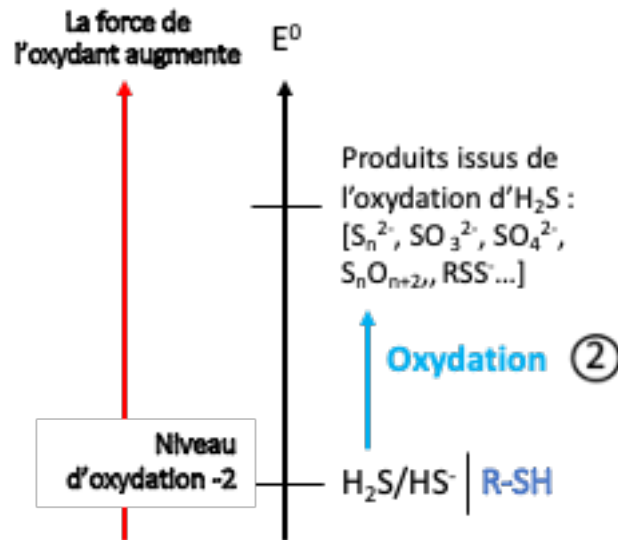


Figure 41. L'oxydation d'H₂S conduit à a formation de produits sulfurées au niveau d'oxydation plus élevé.

L'oxydation d'H₂S va être la réaction la plus courante et la plus rapide (Corsello et al., 2018). Trois enzymes mitochondriales sont principalement responsables du catabolisme de l'H₂S en catalysant son oxydation : la rhodanèse, la sulfure quinone réductase (SQR) et la sulfure dioxygénase (Figure 42).

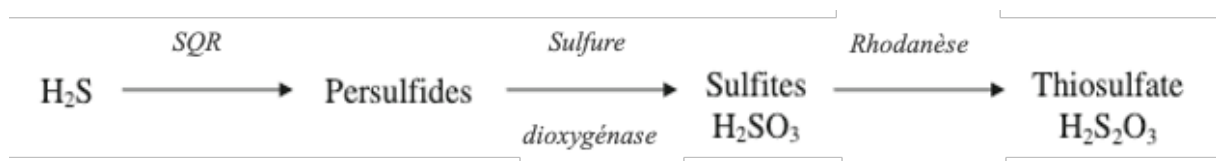


Figure 42. Schéma du système enzymatique mitochondrial du catabolisme de l'oxydation de l'H₂S (Blachier et al., 2010).

L'oxydation d'H₂S peut conduire à la formation d'une variété de produits : des polysulfures (S_n²⁻) mais également des espèces sulfurées oxydées telles que le sulfite (SO₃²⁻), le sulfate (SO₄²⁻), le thiosulfate (S₂O₃²⁻), les polythionates (S_nO_{n+2}) ainsi que d'autres espèces telles que les polysulfures oxydées, des polysulfures organiques (RSS_nSR), des persulfures (RSS⁻) (Benchoam et al., 2019; Powell et al., 2018; Yuan et al., 2017).

Il a déjà été montré qu'HS⁻ peut être oxydé en solution en présence d'oxygène et de traces de métal (Chen and Morris, 1972) sans besoin d'une action enzymatique. Greiner et son équipe ont pu déterminer que la formation des polysulfures peut notamment se faire en solution lors de la dissolution du NaHS. L'apparition d'une colorée jaune à forte concentrations de NaHS est provoquée par les polysulfures (Greiner et al., 2013).

De plus, Greiner et son équipe ont pu prouver que la s-sulfuration (l'oxydation) de la protéine PTEN (« phosphatase and TENSin homolog »), se faisait par la formation de polysulfures après ajout de NaHS ou d'H₂S gazeux. L'entrée des polysulfures dans la cellule se fait rapidement (Greiner et al., 2013).

Pour conclure, l'oxydation d'H₂S est maintenant considérée comme une étape indissociable de la sulfuration concomitante de protéines cibles. L'oxydation d'H₂S entraîne la formation de polysulfures. Il est plus probable que les résultats associés à l'H₂S soient induits par ces polysulfures, issus de l'oxydation de l'H₂S (Greiner et al., 2013; KIMURA, 2015) (**Figure 43**).

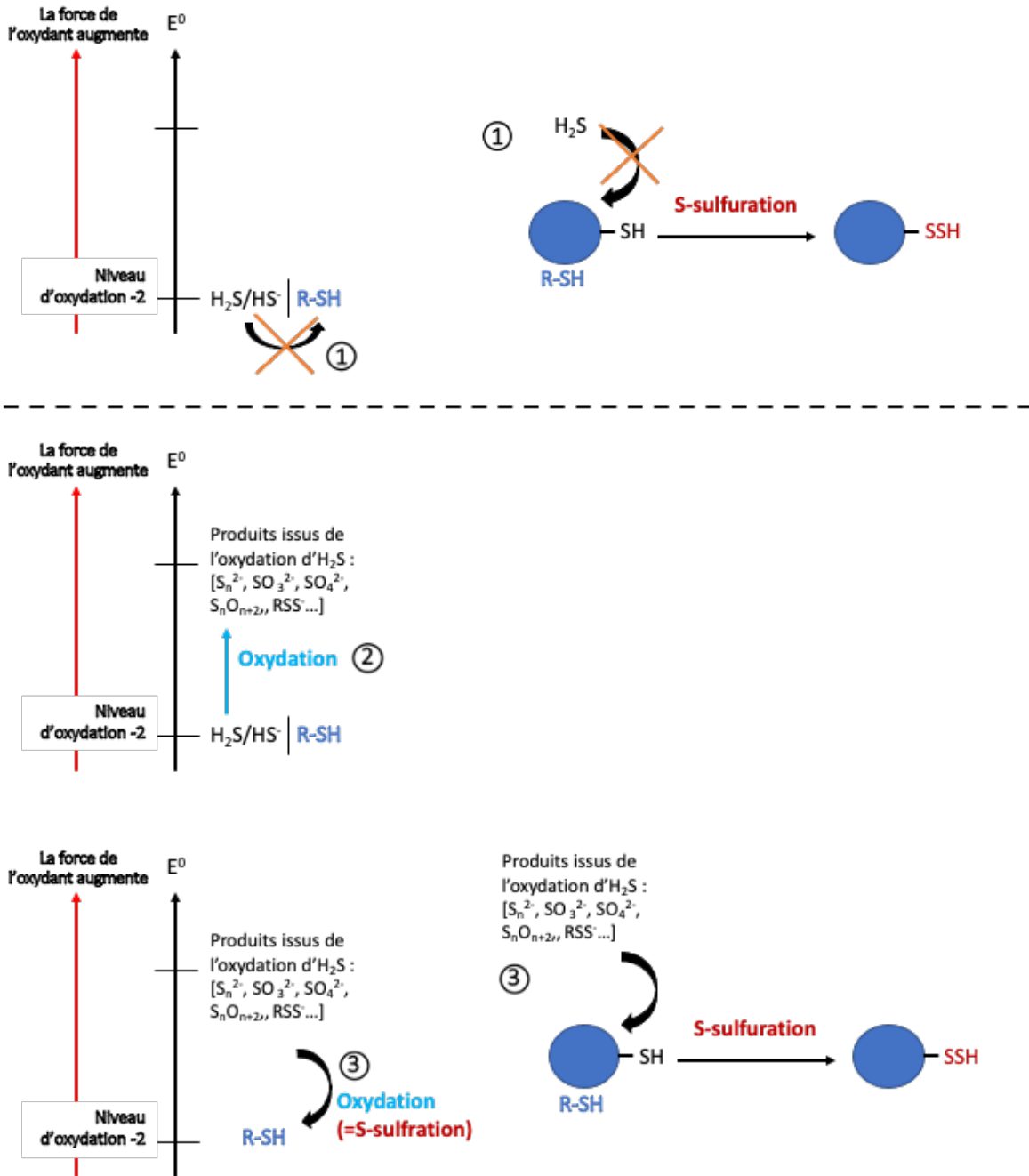


Figure 43. La S-sulfuration des protéines induite par des produits issus de l'oxydation de l'H₂S. La réaction 1, la s-sulfuration des protéines par l'H₂S n'est pas possible, l'H₂S et la protéine cible étant au même niveau d'oxydation. En solution H₂S (HS⁻ également) peut être subit une oxydation (réaction 2) conduisant à la formation de produits sulfurés avec un niveau d'oxydation plus élevé. La réaction 3 est la s-sulfuration des protéines par les produits sulfurés issus de l'oxydation de l'H₂S.

De façon plus générale, il est de plus en plus évident qu'une partie des effets attribués au H₂S résultent en fait de la production de persulfures, polysulfures et autres molécules libres contenant du soufre et qui ont été collectivement appelées « Reactive Sulfur Species » RSS

(Corsello et al., 2018). Par exemple, il a été montré que H₂S₄ est capable de la sulfuration du facteur de transcription Keap1, et non la forme H₂S (Kimura, 2015).

2.3 Régulation métabolique

Tous les mécanismes de sulfuration de protéines sont réversibles jusqu'à un certain stade. Alors que la s-sulfuration entraîne le transfert d'un groupement -SH, la réaction inverse va permettre la libération d'H₂S. C'est d'ailleurs cette réaction fondamentale qui permet la synthèse d'H₂S endogène par les enzymes CBS, CSE et MST (Powell et al., 2018).

La sulfuration peut ainsi être considérée comme une forme de stockage de l'H₂S. C'est essentiellement l'état d'oxydo-réduction de la cellule ou du compartiment cellulaire (par exemple la mitochondrie) qui va déterminer la sulfuration de protéines ou au contraire la désulfuration conduisant à la libération d'H₂S. L'état d'oxydoréduction de la cellule va également déterminer le niveau d'oxydation d'H₂S et la formation de RSS. De la même façon que la sulfuration de protéines, l'oxydation d'H₂S peut être une voie critique de stockage et possiblement de recyclage d'H₂S (Kabil and Banerjee, 2014; Yuan et al., 2017). En particulier, on considère que les persulfures (protéines avec un lien « sulfane-sulfure », -SSH) sont probablement responsables d'une grande part de ce que l'on appelle la signalisation H₂S (Corsello et al., 2018; Greiner et al., 2013; Kimura, 2015).

Ces processus de sulfuration des protéines et d'oxydation d'H₂S permettent donc de stocker mais également de transporter le sulfure dans un état non gazeux moins labile (Olson, 2009). Il est ainsi suggéré que moins de 1% du H₂S existerait sous sa forme libre au sein des tissus (Olson, 2009).

H₂S peut être relargué directement après production ou stocké et relargué en réponse à un signal physiologique. La libération d'H₂S peut se faire dans différentes conditions selon le stockage. Lorsque H₂S est stocké sous la forme d'un lien « sulfane-sulfure » (-SSH). Il va pouvoir sous cette forme être libéré en conditions réductrices. Un stockage d'H₂S sous la forme de soufre acide-labile est possible, H₂S est libéré à un pH 5,4 (Kimura, 2011). Il a été observé qu'une application d'H₂S exogène entraîne une abortion immédiate et un stockage d'H₂S en tant que lien « sulfane-sulfure » (Ishigami et al., 2009). La s-sulfuration de protéines semble être une forme privilégiée et principale de stockage de l'H₂S.

Une autre régulation de la quantité de l'H₂S se fait par une régulation par des signaux dérivant du milieu extracellulaire des enzymes permettant sa synthèse décrites plus haut : CSE, CBS, CAT et MST. CSE semble être l'enzyme dont l'activité est la plus amplement régulée par des signaux extracellulaires. Son expression peut notamment être modulée par différents médiateurs de l'inflammation comme le TNF- α (Paul and Snyder, 2015) qui promeut la transcription du gène CSE et induit ainsi la synthèse intracellulaire d'H₂S. L'H₂S néoformé, entraîne la sulfuration la sous-unité p65 de NF- κ B, stimulant sa liaison avec le coactivateur ribosomal S3, ce qui entraîne une augmentation de la sécrétion de cytokine anti-inflammatoire TGF- β (Viegas et al., 2019). CBS ne semble pas être induite par des médiateurs de l'inflammation mais par sa liaison avec certains métabolites. Par ailleurs, le NO et le CO semblent également capable de moduler l'activité de CBS (Paul and Snyder, 2015).

Donc pour résumer les étapes conduisant à la s-sulfuration de protéines (voir schéma récapitulatif **Figure 44**) :

- ❖ H₂S est incorporé via la membrane plasmique ou synthétisé dans la cellule par des enzymes spécifiques (CSE, CBS, 3-MST) à partir de la L-cystéine ;
- ❖ L'oxydation (l'auto-oxydation ou celle médiée par les enzymes mitochondriales du système SQR : rhodanèse, SQR et la sulfure dioxygénase) conduit à la formation de produits oxydés issus de l'H₂S ;
- ❖ S-sulfuration de protéines cibles au niveau de leur résidu cystéine, formant un lien « sulfure-sulfane » (-SSH) par les produits issus de l'oxydation d'H₂S
- ❖ Stockage : H₂S peut être ainsi stocker sous la forme de liaison -SSH et peut être ainsi libéré (ex : agent réducteur).

La s-sulfuration sert à la fois de stockage d'H₂S mais va également moduler l'activité de certaines protéines entraînant une stimulation ou inhibition de leur activité.

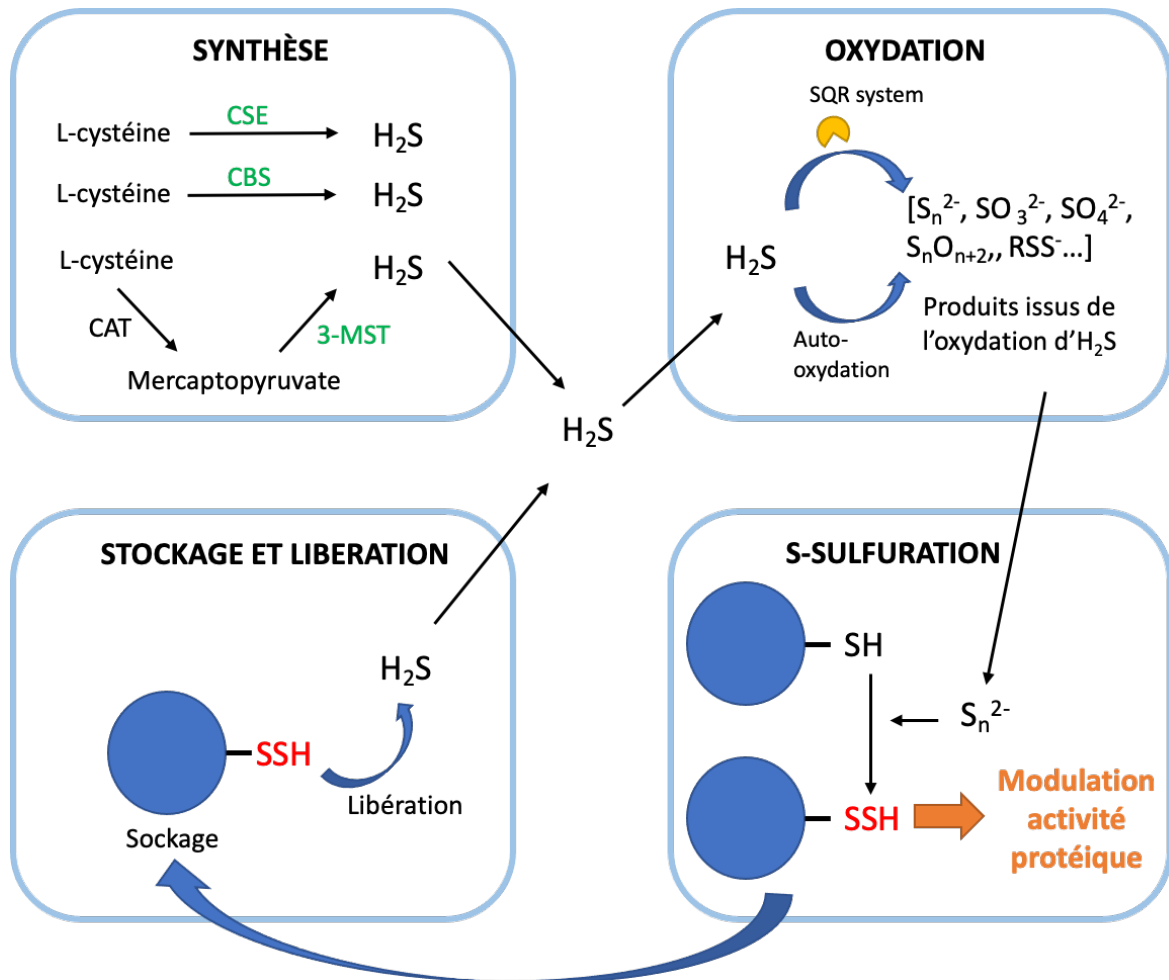


Figure 44. Métabolisme de l'H₂S dans la cellule.

3. Manipulation et détection de l'H₂S

Les caractéristiques de l'H₂S, notamment son caractère gazeux et sa susceptibilité aux processus d'oxydation amène une première question essentielle lorsque l'on veut l'étudier expérimentalement : comment le manipuler ? L'utilisation direct du gaz est possible mais difficilement applicable lors d'une étude *in vitro* en laboratoire (Rivers et al., 2012). L'H₂S est en effet un gaz toxique et inflammable, auquel on préfère d'autres formes physiques d'ions sulfure (Powell et al., 2018). De plus, il est difficile d'assurer une constance dans la concentration/quantité de gaz en contact avec les cellules. La solution la plus souvent choisie pour répondre à cette problématique est l'utilisation de « donneurs d'H₂S » (Filipovic et al., 2018).

3.1 Donneurs d'H₂S

Il existe différentes catégories de donneurs d'H₂S. Les plus couramment utilisés dans les études biologiques sont les sels de sulfures : l'**hydrosulfure de sodium (NaHS)** et le sulfure de sodium (Na₂S) (Powell et al., 2018). Bien que communément appelés donneurs, les sels de sulfure sont simplement des analogues solides du gaz, offrant un accès direct et instantané aux formes de sulfure biologiquement actives (H₂S et HS⁻). Ces sels de sulfures sont des donneurs rapides d'H₂S. Ils s'hydrolysent en effet immédiatement après leur dissolution dans l'eau. Par exemple, le NaHS, donneur le plus utilisé, va rapidement se dissocier en solution pour donner les ions Na⁺ et HS⁻. Cette réaction est immédiatement suivie par l'obtention d'un état d'équilibre entre les espèces H₂S, HS⁻ et S²⁻, libérant ainsi de l'H₂S (Carubbi et al., 2013). Cette hydrolyse immédiate des sels de sulfure entraîne une libération rapide et forte d'H₂S à des concentrations tissulaires supra physiologiques. Ces fortes concentrations chutent rapidement avec la volatilisation de l'H₂S (Powell et al., 2018). C'est pourquoi il est préférable de conserver le NaHS sous sa forme solide, d'éviter de le stocker en solution mère et de préparer la solution extemporanément à chaque utilisation (Filipovic et al., 2018). La cinétique de volatilisation rapide de l'H₂S indique que certains effets biologiques retard observés après application de NaHS (comme par exemple les effets observés sur la prolifération et la migration cellulaires) ne sont pas liés à la persistance d'H₂S libre (Yuan et al., 2017) mais aux polysulfures et/ou aux protéines sulfurées (= ayant subi une s-sulfuration) générées par le pic d'H₂S induit par l'ajout de NaHS .

Pour l'étude de l'H₂S endogène et de ses rôles, l'utilisation de donneurs « lents » d'H₂S est privilégiée. Il existe en effet des donneurs lents, principalement le composé GYY4137 qui libère l'H₂S par hydrolyse, suivant une cinétique beaucoup plus lente et à des concentrations beaucoup plus faibles qu'observé après traitement par le NaHS (Zhao et al., 2014). GYY4137 induit ainsi un pic d'H₂S au bout de 10min contre 10s pour le NaHS à pH 7,4 (Powell et al., 2018).

Ces 2 types de donneurs (lents vs rapides) sont privilégiés, dont les principaux représentants sont respectivement le NaHS ou le GYY4137, bien qu'il existe de nombreux autres catégories de donneurs d'H₂S (Powell et al., 2018; Rivers et al., 2012).

Il est donc important de prendre en considération le donneur d'H₂S utilisé dans chaque étude pour pouvoir comparer les résultats obtenus. Les différences dans la méthode d'application et le choix du donneur peuvent en effet expliquer les différences de résultats.

3.2 Détection d'H₂S

Comme nous venons de la voir, le choix du donneur d'H₂S est important pour comparer les effets observés entre études. Mais il est également important de pouvoir détecter l'H₂S afin de connaître l'évolution de sa concentration à l'échelle cellulaire et/ou tissulaire.

Différentes techniques ont été mises au point pour mesurer la quantité d'H₂S dans un liquide. La méthode classiquement utilisée est la **technique du bleu de méthylène**. Cette technique repose sur la « capture » de l'H₂S par un métal (généralement l'acétate de zinc – H₂S est piégé par Zn²⁺ sous la forme ZnS) ; le soufre réagit ensuite avec la N,N-diméthyl-p-phenylenediamine en présence de FeCl₃ en condition acide (Peng et al., 2012). Cette réaction produite par la présence d'H₂S et catalysée par le FeCl₃ est une substitution aromatique électrophile de la N,N-diméthyl-p-phenylenediamine (Hartle and Pluth, 2016). Le résultat de cette réaction est la formation de bleu de méthylène qui peut alors être mesuré avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 670 nm (Figure 45) (Kolluru et al., 2013).

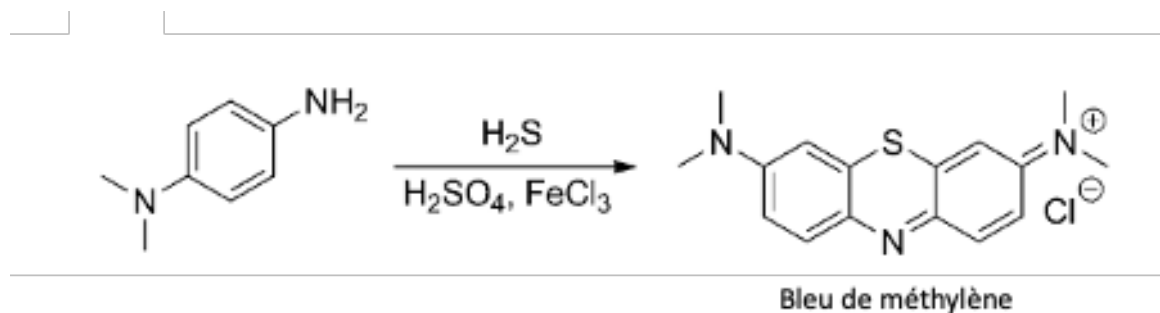


Figure 45. Réaction impliquée dans la détection d'H₂S par la méthode du bleu de méthylène (Peng et al., 2012).

La mesure de l'anion sulfure S²⁻ par une électrode sélective d'ions est également utilisée pour mesurer l'H₂S (Olson, 2009).

Ces 2 méthodes ont permis notamment d'évaluer la concentration d'H₂S dans le plasma ou le sang. Néanmoins elles nécessitent un délai entre le prélèvement et la mesure de sulfure alors

que la méthode par capteur polarographique de l'H₂S permet une mesure directe de l'H₂S gazeux en solution sans modification de l'échantillon (Olson, 2009).

Il existe également des méthodes de **détection par sonde** permettant de suivre le devenir l'H₂S au sein des cellules. Jusqu'à présent, cette approche a été appliquée principalement sur des cellules provenant de lignées tumorales (HeLA ou MCF-7) (**Figure 46**) (Qiao et al., 2019; Singha et al., 2015; Xiong et al., 2018; Zhang et al., 2016). Cette technique utilise du NaHS ou du Na₂S, en co-incubation, avant ou après l'ajout de la sonde d'H₂S. Toutefois, il faut noter que les rares études ayant utilisé cette technique se sont surtout attachées à évaluer la sensibilité et la spécificité des sondes d'H₂S dans des conditions de concentrations croissantes d'H₂S. Cette méthode permet essentiellement de vérifier l'évolution de la présence intracellulaire d'H₂S après ajout d'H₂S gazeux ou de donneur d'H₂S.

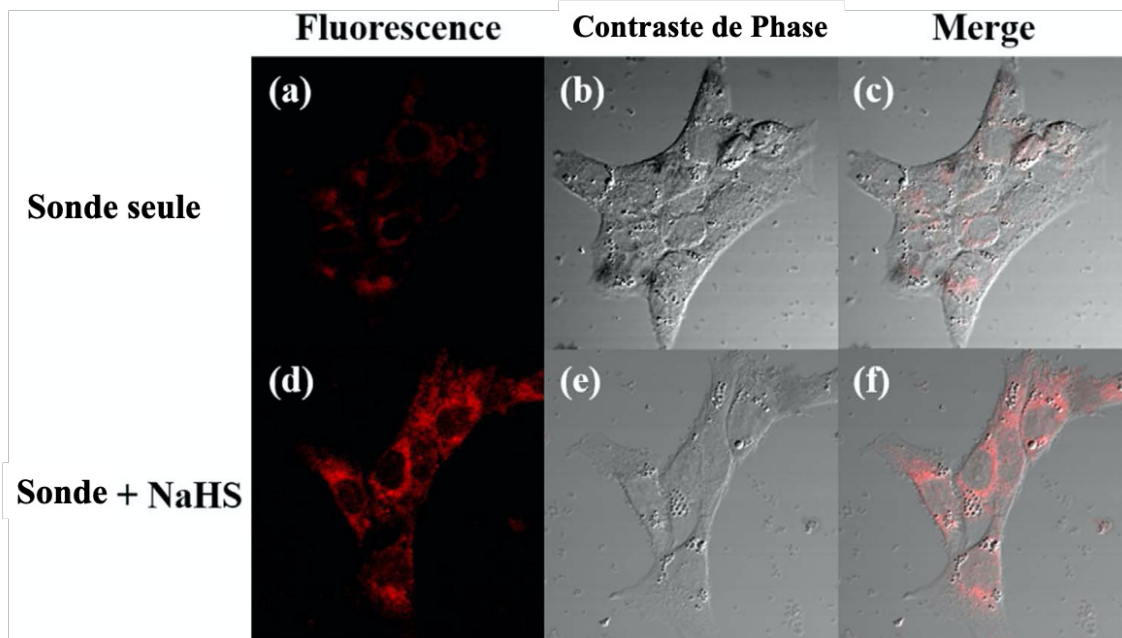


Figure 46. Marquage d'H₂S par une sonde fluorescente après ajout de NaHS (150 µM) dans des cellules MCF-7 (Xiong et al., 2018).

4. Localisation et concentration cellulaire et extracellulaire dans le corps humain

Comme mentionnée auparavant, l'H₂S en tant que gazotransmetteur peut se diffuser librement dans le cytoplasme des cellules à travers la membrane plasmique. Il est supposé que c'est principalement sous cette forme gazeuse qu'il va pouvoir entrer dans la cellule (Carbajo and Maraver, 2017; Yuan et al., 2017). Cette caractéristique essentielle rend particulièrement difficile son dosage dans les cellules, tissus et organes.

4.1 Dans le corps humain

Afin d'identifier les sites de synthèse endogène d'H₂S et d'en déduire ses potentielles fonctions, il est intéressant d'analyser le pattern d'expression des enzymes permettant cette synthèse. L'expression de CSE a été démontrée dans un grand nombre de localisations notamment le système cardiovasculaire, le foie, les reins, l'utérus, le placenta, les îlots pancréatiques, les poumons, l'appareil gastro-intestinal ainsi que le cerveau. CBS est principalement exprimée dans le cerveau mais également dans le foie, les reins, le pancréas, les poumons et l'appareil gastro-intestinal. MST est quant à elle est retrouvée dans le cerveau, mais aussi dans les cellules muscles lisses vasculaires, les cardiomyocytes, le rein et le foie (Wallace and Wang, 2015). On peut donc anticiper que les effets de l'H₂S endogène s'exercent sur un grand nombre de types cellulaires chez l'homme.

La concentration d'H₂S a été mesurée dans le plasma, le sang et également le cerveau. En fonction des études, différentes concentrations sont rapportées. Akter et al, ont mesuré des concentrations allant de 1 à 160 mM, les plus fortes valeurs étant retrouvées dans le cerveau et le sang (Akter, 2016). Olson et al, ont montré un taux beaucoup plus faible d'H₂S compris entre 30-300 µM dans le plasma et le sang (Olson, 2009). Jin et al, ont détecté une concentration dans le sang comprise entre 1 et 300 µM alors que dans le cerveau ces concentrations variaient de 50 à 160 µM (Jin et al., 2015).

Les différences de méthodes de détections peuvent expliquer la disparité de ces résultats (Jin et al., 2015). La sensibilité des techniques s'est d'ailleurs considérablement améliorée au fil du temps. Ainsi, de 1980 à 2000 parmi 11 études, seuls 2 ont pu détecter une concentration mesurable d'H₂S dans le sang (2 à 6 µM). De 2000 à 2008, 30 études sur un total 39, ont rapporté des valeurs mesurables dans le sang, entre 30 et 300 µM, en utilisant la technique de mesure au bleu de méthylène ou avec une électrode sélective de S²⁻ (Olson, 2009). En revanche, l'utilisation du capteur polarographie pour mesurer l'H₂S en temps réel n'a jusqu'à présent pas permis de détecter l'H₂S circulant dans le plasma ou le sang. D'où une remise en question par certains auteurs.trices de la présence d'H₂S dans le sang humain et, globalement, chez les vertébrés (Whitfield et al., 2008). De la même façon que pour le sang, des difficultés techniques ont été rencontrées pour déterminer la concentration réelle d'H₂S présent dans les tissus solides, les estimations pouvant varier du µM au nM. D'une façon générale, les mesures d'H₂S sont

rendues particulièrement complexes du fait des multiples formes de stockage qu'il peut adopter, notamment sous la forme de liaison « sulfane-sulfure » (-SSH) (Vandiver and Snyder, 2012). En effet, comme nous l'avons évoqué plus haut, peu d'H₂S libre va circuler, il va être immédiatement pris en charge : oxydé puis stocké sous la forme d'une liaison « sulfane-sulfure » (-SSH), sur une protéine après s-sulfuration (R-SSH). Il est ainsi difficile d'évaluer la réelle quantité d'H₂S (Filipovic et al., 2018). La présence de protéines spécialisées et les impacts observés de l'H₂S sont nombreux, il est évident que l'absence d'une mesure fiable de l'H₂S dans le sang ne permet pas de remettre en cause son absence chez les vertébrés. Pour contourner ce problème, il serait intéressant de mesurer les protéines contenant cette liaison « sulfane-sulfure » (-SSH) ainsi que la quantité de RSS qui vont être produits du fait de la présence d'H₂S. Ces méthodes indirectes permettant d'évaluer la présence d'H₂S seraient possiblement plus sensibles. Cependant, en ce qui concerne la mesure de RSS, se poserait un problème potentiel de spécificité des techniques de mesure. Il a en été montré récemment que les méthodes de mesure des ROS ne permettent pas de discriminer les ROS des RSS et seraient même plus sensibles à la présence de RSS (Yuan et al., 2017). Il n'existe donc pas encore de méthodes fiables pour doser spécifiquement les RSS, il est alors encore difficile d'évaluer l'importance physiologique d'H₂S et son champ d'action. Seules des améliorations substantielles des méthodes de mesures d'H₂S sous forme libre et/ou stockée permettront d'approfondir nos connaissances sur l'H₂S endogène.

4.2 Dans la peau

Il n'y a pas d'étude ayant investigué spécifiquement l'expression des enzymes de synthèse d'H₂S dans la peau humaine. Toutefois, une exploration de la banque de données 'Human Protein Atlas' (<https://www.proteinatlas.org/>) montre que CSE et MST sont détectés à l'échelle protéique et génomique dans la peau humaine, avec pour ce qui est de MST (codé par le gène *MSPT*) une expression protéique est détectée au niveau des fibroblastes et des kératinocytes. On peut donc supposer qu'H₂S est produit in situ par les cellules cutanées humaines.

Une caractéristique spécifique à la peau, et plus particulière à l'épiderme, est que certaines zones tissulaires cutanées présentent un pH physiologiquement acide. Quand nous avons décrit la proportion des différentes formes d'H₂S en situation physiologique, on se plaçait à pH 7,4 et à une température de 37°C. Dans ces conditions, l'équilibre entre H₂S et HS⁻ + H⁺ (Jin et al.,

2015; Olson, 2009) est en défaveur d' H_2S à hauteur d'un ratio $\frac{1}{4}$. Cependant, dans l'épiderme, l'environnement extracellulaire étant plus acide (pH 4,5-6,5) et la température est légèrement plus basse ($35^\circ C$), c'est l' H_2S se retrouve alors majoritaire, et virtuellement, ce serait même la seule forme existante, si l'on se base sur des analyses antérieures portant sur l' H_2S exogène appliqué à la peau (**Figure 47**) (Carbajo and Maraver, 2017; Szabo, 2017).

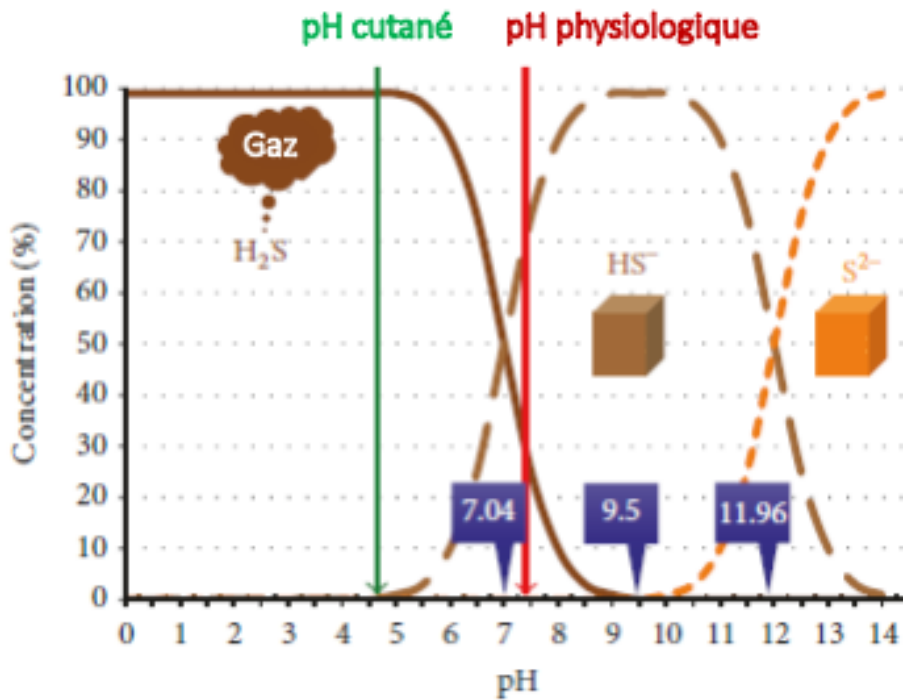


Figure 47. Concentrations du sulfure d'hydrogène en fonction du pH dans la peau (Carbajo and Maraver, 2017).

5. Effets biologiques de H_2S

Maintenant que les bases biochimiques concernant l' H_2S sont posées, on peut s'intéresser aux effets biologiques, de l' H_2S en gardant toutefois à l'esprit les limitations décrites plus haut : i) différences entre H_2S endogène et H_2S exogène, ii) difficulté à discerner les effets exercés par H_2S de ceux exercés par les molécules avec lesquelles H_2S est en échange constant. Les premiers effets connus ont été identifiés depuis des centaines d'années. Et comme nous allons le voir tout au long de ce chapitre, pour tout effet observé, nous pouvons observer également l'effet inverse.

5.1 Effets cliniques connus

5.1.1 Toxicité

Avant d'être rattaché à la famille des gazotransmetteurs et avant d'être étudié en tant que molécule signal, l'H₂S était surtout connu comme étant un gaz odorant et toxique. Ses effets toxiques majeurs s'exercent essentiellement sur le système nerveux central et le système respiratoire (Chen et al., 2007). La détection par le système olfactif humain de l'odeur caractéristique de l'H₂S (odeur « d'œuf pourri ») se fait à partir de 0,02-0,03 ppm. Des maux de têtes sont possibles dès 4 ppm (Gadalla and Snyder, 2010). À partir de 100 ppm, il y a une perte olfactive dû à une toxicité directe sur les nerfs olfactifs. À 300-500 ppm, le danger est alors mortel, avec une possibilité d'œdème pulmonaire. Au-delà de 500 ppm, la perte de conscience est rapide, suivie d'un arrêt cardio-respiratoire et de la mort (Filipovic et al., 2018). Les victimes d'une intoxication à l'H₂S sont généralement des travailleurs.euses de l'industrie ou des égouts (Daldal et al., 2010).

Au plan moléculaire, des travaux sur la toxicité de l'H₂S ont montré qu'à une forte dose, l'H₂S est un inhibiteur de la cytochrome c oxydase, une enzyme critique pour la respiration mitochondriale permettant la synthèse d'ATP à partir d'oxygène (Chen et al., 2007; Gadalla and Snyder, 2010; Nicholls and Kim, 1982). Un tel effet inhibiteur semble se produire initialement de façon limitée au niveau des cellules de l'appareil respiratoire en contact direct avec l'H₂S, y compris à des doses d'exposition relativement faible (30 ppm) comme démontré chez le rat (Dorman et al., 2002). La synthèse d'ATP, énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule, s'effectue principalement au niveau de la chaîne respiratoire. Les électrons rentrant dans la chaîne sont nécessaires tout au long de la chaîne participant ainsi à la synthèse finale d'ATP à partir d'oxygène (**Figure 48**). H₂S, en inhibant la cytochrome c oxydase, entraîne une diminution du flux d'électrons et par conséquent une diminution de la synthèse d'ATP (Vicente et al., 2016). Cette diminution d'énergie peut alors conduire à des lésions et/ou dysfonctionnements cellulaires (Alonso et al., 2003).

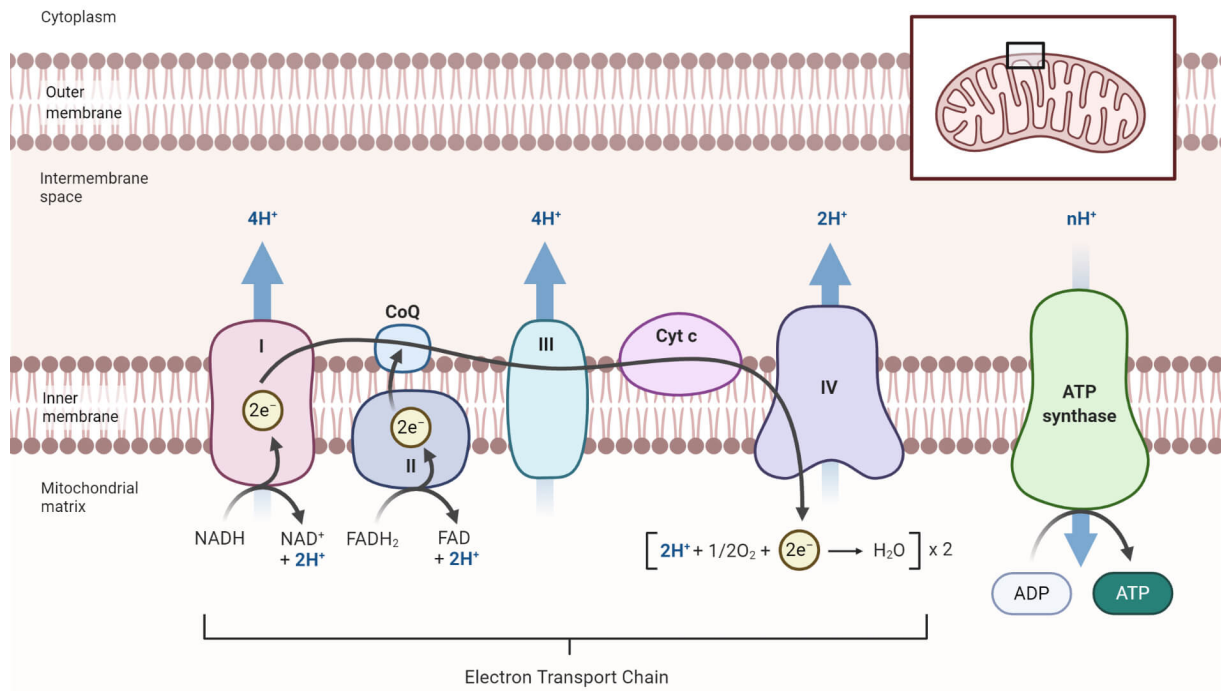


Figure 48. Chaîne respiratoire mitochondriale. La chaîne respiratoire est composée de différents complexes. Un flux d'électrons va permettre d'arriver à l'ATP synthase conduisant à la formation d'ATP. Le cytochrome c oxydase est situé entre le complexe III et IV, et son inhibition bloque le passage des électrons au complexe IV (Sapkota *et al*, 2020).

5.1.2 Bienfaits – eaux thermales

En parallèle à l'effet toxique connu de l'H₂S, ses bienfaits sont également reconnus depuis des siècles à travers le monde, via le biais des eaux thermales riches en sulfure. Nos connaissances sur l'utilisation des eaux thermales dans un but thérapeutique remontent aux Grecs anciens, aux Babyloniens, aux Mésopotamiens et aux Romains (Riyaz and Arakkal, 2011), l'origine précise est cependant difficile à déterminer. Les eaux thermales étaient alors déjà utilisées comme traitement pour certaines pathologies comme dans le cas de rhumatismes, des maladies respiratoires, des maladies de peau (Gianfaldoni *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2018). Au fil du temps, il a pu être associé à des compositions particulières des eaux thermales des bienfaits pour des types de pathologies. Les eaux utilisées dans le traitement des pathologies dermatologiques peuvent varier dans leurs propriétés physico-chimiques mais sont généralement riches en sulfure, H₂S et sulfates (Matz *et al.*, 2003), particulièrement dans les pathologies inflammatoires telles que le psoriasis, la dermatite atopique, des ulcères, mais également l'acné, l'eczéma, le prurit (Matz *et al.*, 2003). Les eaux thermales riches en sulfure sont également utilisées pour traiter des maladies respiratoires et les troubles musculaires

(Carbajo and Maraver, 2017; Carubbi et al., 2013). La concentration de HS⁻ et S²⁻ dans les eaux thermales : 0.5 à 20mg/l (d'équivalent H₂S) (Carubbi et al., 2013)

Les eaux thermales sont à nouveau utilisées comme traitement depuis au moins 2 siècles, les effets cliniques avec l'amélioration des pathologies suite aux bains dans les eaux thermales sont reconnus, pourtant peu de preuves scientifiques ont été identifiées (Carubbi et al., 2013).

Néanmoins des études rapportent des propriétés de l'H₂S pouvant expliquer les effets cliniques observés : des propriétés bactéricides et antifongiques qui permettraient de soigner les ulcères (Carbajo and Maraver, 2017) (Davinelli et al., 2019) mais également des propriétés analgésiques, antioxydantes et anti-inflammatoires (Viegas et al., 2019).

5.2 Effets moléculaires

Nous allons nous intéresser alors aux effets moléculaires identifiés pouvant expliquer les effets bénéfiques des eaux thermales, en nous concentrant alors sur les processus en lien avec la cicatrisation cutanée et en essayant de se focaliser sur le cas de brûlure : les effets inflammatoires, les effets sur l'angiogenèse, sur la viabilité et la prolifération et les effets sur le stress oxydant.

Nous allons le voir rapidement mais pour tous les processus étudiés, le rôle de l'H₂S est controversé car on retrouve des effets soit stimulant soit inhibant (Carubbi et al., 2013). Pour éviter des biais dans les résultats pouvant être dû à une différence de donneurs de H₂S, nous nous concentrons sur les études utilisant du NaHS, le donneur le plus couramment utilisé.

5.2.1 Inflammation

Les effets bénéfiques des eaux thermales sur des pathologies inflammatoires ont supposé dans un premier temps un effet anti-inflammatoire de l'H₂S, l'utilisation des eaux thermales entraînant une amélioration de la maladie avec une diminution de l'inflammation. Pourtant l'utilisation d'eau thermale sulfurée sur la peau peut provoquer des affections cutanées allant de la dermatite irritative aux brûlures chimiques (Carbajo and Maraver, 2017).

Anti-inflammatoire

Un rôle anti-inflammatoire de H₂S a été de la même façon identifiée dans plusieurs études. H₂S entrainerait une diminution de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et IL-8, IL-1 β (Burguera et al., 2014; Chen and Liu, 2016; Guan et al., 2020; Luo et al., 2017; Perry et al., 2011; Wang et al., 2020). Dans toutes ces études, l'inflammation a été induite par l'ajout d'un stimulus (IL-1 β , fumée de cigarette, acide palmitique...). L'effet anti-inflammatoire de l'H₂S a pu être observé uniquement en condition inflammatoire. En effet, les études ayant testé l'impact du NaHS seul n'ont pas observé d'effet sur l'inflammation (Guan et al., 2020; Luo et al., 2017; Perry et al., 2011).

Pro-inflammatoire

Dans la majeure partie de ces études, il a été observé une augmentation de molécules pro-inflammatoires suite à l'ajout de NaHS (un donneur en H₂S) entraîne une augmentation de molécule pro-inflammatoires, tels que TNF- α , IL-1 β , IL-6 (Li et al., 2005, 2006; Whiteman et al., 2010; Zhang et al., 2010; Zhi et al., 2007). Zhi et al, ont pu observer qu'une stimulation de monocytes humains (cellules U937) de 0,1 mM à 1 mM de NaHS entraînait au bout de 4h une augmentation de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-1 (Zhi et al., 2007). Dans le cas de l'étude de Li *et al*, ils se sont placés dans un contexte inflammatoire dû au LPS dans un modèle chez la souris, ils ont alors pu observer que l'ajout de NaHS entraîne une augmentation de TNF- α . De nombreuses études sur l'impact du NaHS sont répertoriées dans la revue de Whiteman et Winyard : 11 études montrent un rôle pro-inflammatoires du NaHS avec notamment la stimulation de l'expression de cytokines pro inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α , CXCL2, IL-8, MCP1, MIP1) dans un contexte inflammatoire et 2 études indiquent un rôle anti-inflammatoire (Whiteman and Winyard, 2011). Il faut néanmoins souligner que parmi ces 11 études, 9 utilisent un modèle animal (rongeur).

Dans la peau

Trois études ont observé un effet anti-inflammatoire du NaHS dans des kératinocytes provenant de lignées (NCTC 244 et HaCaT) avec une diminution de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β et IL-8) (**voir Tableau 5**) (Merighi et al., 2012; Mirandola et al., 2011; Yang et al., 2011). Dans le cas de la brûlure, le NaHS pourrait alors avoir un effet d'amplification de l'inflammation. Les études de Zhang *et al* et Bhatia *et al* ont en effet pu mettre en évidence cette action du NaHS. Dans ces 2 études, une brûlure a été appliquée sur un modèle chez la souris. Ils ont pu constater qu'une aggravation de l'inflammation systémique (Bhatia,

2012) avec notamment une augmentation de l'infiltration des leucocytes ainsi qu'une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-6, le TNF- α et l'IL-1 β (Zhang et al., 2010). Zhang *et al* ont pu observer cette stimulation de l'inflammation dès 0,1 mM de NaHS.

Une hypothèse souvent proposée pour expliquer cette différence de rôle sur l'inflammation serait dû au choix du donneur. Les donneurs rapides comme le NaHS entraînerait un pic élevé d'H₂S et aurait alors un rôle pro-inflammatoire tandis que des donneurs lents entraîneraient une faible augmentation d'H₂S, plus semblable aux concentrations d'H₂S endogène et aurait alors un effet anti-inflammatoire (Whiteman et al., 2010). Pourtant comme nous avons pu le voir en ne se concentrant qu'aux études utilisant du NaHS, on retrouve à la fois des résultats montrant un rôle pro-inflammatoires et d'autres montrant un effet anti-inflammatoire.

L'autre hypothèse est liée en partie à l'hypothèse qu'on vient d'évoquer sur le choix du donneur. Ce double rôle dans l'inflammation pourrait être dû à un effet dose dépendant. Le NO et CO ont des rôles complexes dépendant de leur concentration. C'est pourquoi plusieurs articles proposent que H₂S, de la même manière a un rôle dose dépendant. L'idée principalement abordée serait qu'une faible concentration d'H₂S entraînerait un effet anti-inflammatoire, ce qui comprend le rôle du H₂S endogène alors que l'effet pro-inflammatoire serait dû à des fortes concentrations de H₂S (Guo et al., 2016; Hellmich and Szabo, 2015). De nouveau, cette hypothèse n'explique pas tous les résultats, des résultats montrant que des tests à de faibles concentrations de NaHS, dès 0,1 mM, peuvent entraîner une stimulation de l'inflammation et de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Zhang et al., 2010; Zhi et al., 2007) et inversement. De plus dans le modèle souris de Zhang *et al*, l'ajout de PAG sur la brûlure sur le modèle souris a entraîné une diminution de la production d'H₂S endogène. Cette diminution d'H₂S endogène est accompagnée d'une diminution de l'inflammation. Dans ce contexte de brûlure H₂S aurait un rôle pro-inflammatoire qu'il soit endogène ou exogène. Leur hypothèse est que l'H₂S aurait un rôle pro-inflammatoire dans un premier temps post-brûlure puis aurait ensuite un rôle anti-inflammatoire (Zhang et al., 2010).

5.2.2 Sur vaisseaux sanguins – angiogénèse

L'H₂S dans les eaux thermales a été reconnu comme étant un vasodilatateur favorisant également la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (Carbajo and Maraver, 2017; Rivers

et al., 2012). Wang et son équipe ont étudié l'impact du NaHS sur l'angiogenèse. En stimulant les HUVEC par dans un premier temps une faible concentration de NaHS (10-20µM), celle-ci entraîne une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales. Des concentrations plus fortes de NaHS (500-1000µM) ont réduit la viabilité des cellules endothéliales. Ils ont également pu observer un effet dose dépendant dans la migration des cellules endothéliales, à faible concentration la migration est stimulée. Ils ont pu noter une amélioration de l'adhérence après ajout de NaHS (1-200µM). Ils ont montré de manière globale qu'à faible concentration de NaHS, l'angiogenèse est stimulé. Au-delà de 200µM au contraire, on observe une inhibition de l'angiogenèse (Cai et al., 2007; Wu et al., 2015). L'effet vasodilatateur de l'H₂S serait dû à son action sur les canaux potassiques K⁺ (canaux ATP dépendant possédant 9 cystéines). La sulfuration des canaux K⁺ par H₂S entraîne leur modification conduisant à un effet vasorelaxant (Gadalla and Snyder, 2010).

5.2.3 Viabilité et prolifération

Plusieurs études se sont intéressées à l'impact de l'H₂S sur la viabilité et la prolifération des cellules. La majorité de ces études s'y sont intéressés dans un contexte cancéreux, l'H₂S étant retrouvé surexprimé dans certains cancers. On retrouve également d'autres études utilisant des cellules normales non cancéreuses. Cependant on retrouve encore des résultats contradictoires pour des études similaires. Il a été observé par exemple que le NaHS entraîne une augmentation de la prolifération et de la viabilité cellulaire en stimulant la voie Akt dans ces cellules ce myélome (Zheng et al., 2016), également sur des cellules cancéreuses de colons (Cai et al, 2010). Il a été observé également dans une étude sur une lignée de kératinocytes (HaCaT), une stimulation de la prolifération par le NaHS (Xie et al., 2016a). En parallèle on trouve des études montrant une diminution de la prolifération après ajout de NaHS, dans des cellules normales et cancéreuses : cellules épithéliales de colons normales et cancéreuses (Wu et al 2012), cellules de carcinomes thyroïdiens, cellules musculaires lisses de voies aériennes (Perry et al., 2011), hépatocytes (Fan et al., 2013). cellules de lignées kératinocytaires NCTC 2544 (Gobbi et al., 2009; Merighi et al., 2012).

Certaines études ont également observé un effet stimulant la prolifération à des concentrations faibles de NaHS puis un effet inhibant la prolifération à des concentrations plus élevées (Wu et al, 2017) (Wu et al 2019). Ces études ont évoqué alors un rôle dose dépendant de l'H₂S sur la prolifération comme il a été évoqué par exemple pour l'inflammation. Pourtant on retrouve

dans les autres études des résultats contradictoires n'observant pas cette effet dose. De plus, l'étude de Perry et al, 2011, a observé des effets similaires sur la prolifération en utilisant un donneur rapide NaHS et un donneur lent GYY4137.

5.2.4 Oxydoréduction

H₂S est le thiol le plus simple (composé organique de formule générique R-SH, où R est un résidu organique (alkyle ou aryle, par exemple) et -SH le, analogue au groupe hydroxyle -OH des alcools en remplaçant l'atome d'oxygène par un atome de soufre), et par conséquent un agent réducteur. HS⁻ est une molécule nucléophile (nucléophilie élevée, capacité à donner une paire d'électrons et à former une liaison covalente). Cela peut s'explique par sa charge négative et par l'électronégativité relativement faible du soufre (Filipovic et al., 2018). HS⁻ est facilement oxydée en radical hydrosulfure (HS[•]) qui est une espèce oxydante (Bełtowski, 2015). L'H₂S a un rôle important dans des processus physiologiques et pathologiques impliquant des processus d'oxydoréduction et modifiant alors la balance redox (Yuan et al., 2017).

Pro-oxydant

Dans des solutions aqueuses, comme nous l'avons évoqué plus haut, l'auto-oxydation d'H₂S est inévitable avec la présence d'oxygène. Les traces de métal tel que le fer, qui existent dans le milieu de culture et le plasma sanguin servent de catalyseur pour l'oxydation. Pour rappel, l'oxydation d'H₂S donne naissance à des radicaux thiyle, hautement réactifs qui peuvent se combiner avec eux-mêmes pour produire du disulfure d'hydrogène, du trisulfure d'hydrogène et d'autres composés polysulfurés. Ces composés sulfurés, qui comprennent polysulfures et persulfures, sont appelés les reactive sulfur species (RSS). Cependant ces RSS, comme les ROS, sont des espèces hautement réactives pouvant causer un stress oxydant.

Antioxydant

H₂S est considéré comme un agent réducteur comme il correspond à l'état d'oxydation -2 du soufre. Mais le potentiel de réduction de H₂S est faible (-0.23V), plus faible que la cystéine. Dans des conditions physiologiques, l'H₂S est moins susceptible d'être un réducteur efficace (Yuan et al., 2017). L'action antioxydante de l'H₂S a pu être observé dans diverses études. Il a été observé que suite à l'induction d'un stress oxydant, par exemple une exposition à de la fumée de cigarette (Zhao et al., 2018) ou bien un contact avec du gaz moutarde (Meng et al.,

2017), l'ajout de NaHS a permis d'atténuer l'effet du stress oxydant avec une diminution notamment des ROS.

L'action antioxydante de l'H₂S a été montrée comme agissant à différents niveaux dans la balance redox (Corsello et al., 2018; Jin et al., 2015; Xie et al., 2016a):

- Direct quenching des ROS
- Modulation des antioxydants cellulaires (GSH)
- Activation de l'expression d'antioxydant

H₂S a été montré comme capable de piéger les ROS et RNS (reactive nitrogen species). En effet, les molécules contenant un groupe SH, comme H₂S, HS⁻, HS-SH, HSS⁻ peuvent inverser les dommages dus aux ROS/RNS en donnant un atome d'hydrogène aux radicaux (sur le carbone) (Corsello et al., 2018).

Le rôle de H₂S sur l'activation de l'expression de gènes antioxydants a particulièrement été développé. En condition de stress oxydant, l'ajout de H₂S entraîne une augmentation de l'expression et de l'activité de Nrf2 (Corsello et al., 2018; Zhao et al., 2018). Il se trouve que Nrf2 a un rôle majeur dans la réponse antioxydante. Nrf2, appartenant à la famille des Cap'n'Collar des facteurs de transcription, il médie l'expression de gènes cytoprotecteurs qui défendent les cellules du stress oxydatif et des dommages cellulaires. En situation normale, Nrf2 est lié à un complexe Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) /Cul-Rbx1 dans le cytosol des cellules. Ce complexe va dégrader constamment Nrf2. C'est le complexe Cul3 et Rbx1 qui sont responsables de la dégradation par l'ubiquitination de Nrf2. Lors d'une augmentation de radicaux libres et de pro-oxydants (tels que les ROS), des stimuli vont changer la conformation de Keap1 ce qui va libérer Nrf2 qui pourra alors être transféré dans le noyau et agir comme facteur de transcription et induire l'expression de gènes antioxydants tels que les gènes **SOD**, **NQO1**. Nrf2 régule également l'expression des gènes Cul3 et Rbx1 ce qui permet une autorégulation de cette voie (Glory and Averill-Bates, 2016; Kaspar and Jaiswal, 2010; Li et al., 2019).

Il a été montré que H₂S entraîne une S-sulfuration de Keap1 entraînant la dissociation de Nrf2 augmentant ainsi sa translocation nucléaire. Nrf2 se fixe alors au promoteur et induit la transcription de gènes anti-oxydants comme CAT, SOD1, GST (Corsello et al., 2018). Meng et

son équipe ont pu mettre en évidence qu'après induction du stress oxydant au gaz de moutarde, le NaHS entraîne bien un transfert du Nrf2 dans le noyau (Meng et al., 2017).

Nous l'avons évoqué plus haut mais il est intéressant de préciser à nouveau qu'H₂S ne serait pas capable d'agir sur Keap1, mais qu'une forme oxydée d'H₂S, H₂S₄ qui peut entraîner la sulfuration de Keap1 et dissocier ainsi Nrf2 (Kimura, 2015).

Nous avons pu observer différents effets du H₂S sur des processus liés à la cicatrisation. Cependant nous allons maintenant nous focaliser sur les études ayant été réalisées sur des cellules humaines de peau, car comme nous l'avons souligné auparavant, des différences majeures s'observent entre le modèle rongeur et le modèle humain.

6. Études *in vitro* sur les kératinocytes

Nous avons évoqué des études travaillant sur l'impact du NaHS sur les kératinocytes. Elles sont répertoriées dans le **Tableau 5**. On retrouve uniquement 5 études : 3 études utilisant les cellules NCTC 2544 (Gobbi et al., 2009; Merighi et al., 2012; Mirandola et al., 2011) et 2 utilisant les cellules HaCaT (Xie et al., 2016a; Yang et al., 2011). Sur ces 4 études, les effets du NaHS ont été observés 24h après l'application du NaHS dans le milieu de culture (sauf étude de Yang et al, 2011 qui se place dans une situation d'hypoxie et qui regarde les effets au bout de 30 min). Une partie des études a étudié l'effet dose dépendant du NaHS en testant des concentrations croissantes du NaHS. Ces études ont ressorti principalement un rôle anti-inflammatoire, et un rôle contradictoire sur la prolifération des kératinocytes.

On se rend surtout compte que peu d'études se sont intéressées aux effets moléculaires/biologiques du NaHS chez la peau humaine. De plus, ces travaux utilisent des cellules provenant de lignées cellulaires dont la fiabilité peut être questionnée. De nombreuses lignées ont notamment été contaminées par des cellules HeLa et des cellules d'adénocarcinome cervical (Capes-Davis et al., 2010; Gartler, 1968; Lavappa, 1978; Nelson-Rees and Flandermeyer, 1976).

Comme nous l'avons montré, l'effet bénéfique de l'H₂S pour traiter des pathologies dermatologiques est observé par les eaux thermales sulfurées et également sur des modèles de

plaies chez les rongeurs. Pourtant, on note un manque d'études sur les voies de signalisation de l'H₂S dans un modèle de culture primaire de kératinocytes humains.

Tableau 5. Études *in vitro* sur l'impact du NaHS sur des kératinocytes

| Cellules | Donneur d'H₂S | Traitement | Résultats | Références |
|-----------------|---------------------------------|---|--|--------------------------|
| NCTC 2544 | NaHS | 2mM / 24h | ↘ IL-8 | (Mirandola et al., 2011) |
| NCTC 2544 | NaHS | 0,05 – 0,5 – 1 – 2 – 4mM / 24h | ↘ VEGF ↘ prolifération 20% (à partir de 0,5mM) ↗ NO | (Merighi et al., 2012) |
| NCTC 2544 | NaHS | 0,12 – 0,25 – 0,5 – 1 – 2mM / 24h | ↘ prolifération (CFU/ BrdU) ↘ adhérence | (Gobbi et al., 2009) |
| HaCaT | NaHS | 0,05 – 0,25 – 0,5 – 1mM / 24h | ↗ prolifération ↗ différenciation | (Xie et al., 2016a) |
| HaCaT | NaHS | Condition hypoxie -> ajout NaHS (400µM) 30 min puis CoCl ₂ | En condition hypoxie : ↘ IL-1β ↘ IL-6 ↘ IL-8 ↘ ROS | (Yang et al., 2011) |

OBJECTIFS

Les objectifs de mon travail de thèse se sont focalisés sur l'investigation des effets exercés par l'H₂S sur les kératinocytes humains, notamment sur les fonctions immunitaires des kératinocytes. Les données de la littérature sur ce sujet étaient en effet difficiles d'interprétation car basées sur l'étude de lignées kératinocytaires (HaCaT ou NCTC 2544). De plus, les données sur ces lignées montraient des résultats contradictoires (Gobbi et al., 2009; Merighi et al., 2012; Mirandola et al., 2011; Xie et al., 2016a; Yang et al., 2011). L'analyse de l'impact de l'H₂S sur les cellules cutanées a été réalisée par deux approches complémentaires : i) une analyse moléculaire globale, protéomique et génomique, sur cultures primaires de kératinocytes, approche suivie d'une exploration spécifique du sécrétome cytokinique et de différentes voies de signalisation identifiées par l'approche globale, ii) l'étude d'un modèle de brûlure du 2^{ème} degré sur explant de peau que nous avons mis au point durant ce travail de thèse. Les résultats seront présentés dans 3 parties :

La **première partie** concerne l'analyse *in vitro* de l'impact de l'H₂S sur les kératinocytes en culture. L'objectif était dans un premier temps de réaliser une cartographie moléculaire des kératinocytes stimulés à l'H₂S, par une analyse génomique et protéomique. Cette cartographie a permis de cibler certaines voies d'action de l'H₂S, en lien notamment avec l'inflammation. L'analyse ciblée a permis de préciser les effets moléculaires identifiés par l'approche globale. En parallèle, l'impact de l'H₂S sur la prolifération des cellules souches et progéniteurs kératinocytaires a été analysé.

Ce travail a été valorisé par la publication d'un article dans le journal « International Journal of Molecular Sciences » en Juin 2020 :

« **Molecular Mapping of Hydrogen Sulfide Targets in Normal Human Keratinocytes** ».

Olivia Gross-Amat, Marine Guillen, Jean-Pascal Gimeno, Michel Salzet, Nicolas Lebonvallet, Laurent Misery, Céline Auxenfans and Serge Nataf.

L'observation antérieurement rapportée d'effets thérapeutiques exercés par les eaux thermales sulfurées dans le cadre de pathologies inflammatoires cutanées, comme en particulier les ulcères chroniques, nous on conduit à étudier les effets de l'H₂S dans le contexte de la brûlure. Les propriétés antioxydantes que nous avons identifiées pouvait en effet suggérer que l'H₂S pouvait améliorer la cicatrisation d'une brûlure en limitant l'augmentation importante de ROS qu'engendrent des dommages cellulaires durant la brûlure. Pour ce faire, nous avons mis en place un modèle *ex vivo* de brûlure du 2^{ème} degré sur explants de peau humaine. Nous avons

dans le même temps évalué l'application d'un hydrogel de poloxamères pouvant servir de vecteur pour l'H₂S. La **seconde partie** présente la caractérisation de notre modèle ainsi que les résultats de l'application de l'hydrogel de poloxamères. Ces résultats ont été publiés dans le journal « International Journal of Molecular Sciences » en Septembre 2020 :

« **Characterization of a Topically Testable Model of Burn Injury on Human Skin Explants** ». Olivia Gross-Amat, Marine Guillen, Damien Salmon, Serge Nataf and Céline Auxenfans.

La **troisième partie** présente les résultats obtenus lors d'expériences d'application topique d'H₂S dans notre modèle de brûlure *ex vivo*. L'objectif était notamment d'évaluer son impact sur deux paramètres essentiels de la cicatrisation : i) la réépithélialisation via la prolifération et la migration des cellules souches et progéniteurs kératinocytaires et ii) le remodelage tissulaire au niveau du derme. Le modèle de brûlure *ex vivo* a permis également de tester l'impact de l'injection dermique des ASCs (Adipose-derived Stem Cells) encapsulés sur la cicatrisation. Cette partie du travail expérimental a été réalisé par Lucille Capin dans le cadre de sa thèse de Sciences au sein du laboratoire. Nous avons rassemblé nos résultats dans un article commun actuellement en cours de finalisation et qui sera bientôt soumis à publication.

RÉSULTATS

1. Impact du sulfure d'hydrogène sur les kératinocytes humains

Bien que l'effet bénéfique des eaux thermales sulfurées soit reconnu, le rôle de l'H₂S et ses voies de signalisation ne sont pas encore déterminées. En observant les études analysant le rôle de l'H₂S, des rôles controversés lui sont attribués et seulement 5 études ont observé spécifiquement l'impact de l'H₂S sur des kératinocytes, provenant néanmoins de lignées immortalisées. L'objectif de ce travail est de combler une partie du manque d'informations concernant les effets de l'H₂S sur les kératinocytes primaires humains.

Nous avons choisi deux approches : i) analyse globale pangénomique et panprotéomique des feuilletts épidermiques stimulés par l'H₂S, ii) analyse ciblée visant à évaluer des processus spécifiques, notamment la prolifération cellulaire des cellules souches et progéniteurs kératinocytaires (méthodes des "CFU") et la synthèse et sécrétion de cytokines inflammatoires (ELISA, Western Blot). Pour étudier l'impact de l'H₂S sur les kératinocytes, les cellules ont été stimulées pendant 24h par le NaHS, un donneur rapide d'H₂S.

Nous avons d'abord vérifié que l'H₂S s'accumulait dans le cytoplasme des kératinocytes dans nos conditions expérimentales. Puis nous avons testé l'effet d'une concentration de 0,25 mM, de NaHS induisant la formation de concentration d'H₂S similaires à ce qui est observé dans les eaux thermales. Nous avons constaté que les cibles identifiées par nos approches de biologie systémique (génomique, protéomique, bioinformatique) se répartissaient en deux catégories principales : i) les molécules de réponse au stress oxydatif, en particulier la superoxyde dismutase 2 (SOD2), la NAD (P) H quinone déshydrogénase 1 (NQO1) et la culine 3 (CUL3) et ii) les chémokines et cytokines interleukine-8 (IL-8) et CXCL2. Un effet dose sur la stimulation de cytokines/chémokines, en particulier l'IL-8, a pu être observé. Nous avons également montré que le NaHS stimulait la voie de l'inflammasome caspase-1, conduisant à une sécrétion accrue de la molécule pro-inflammatoire interleukine-18 (IL-18). Néanmoins, la sécrétion d'interleukine-1 bêta (IL-1 β) n'a été que modérément affectée par l'exposition au NaHS malgré une accumulation significative de pro-IL-1 β . Enfin, nous avons observé une forte diminution de la prolifération des cellules souches et progéniteurs kératinocytaires après stimulation par le NaHS.



Article

Molecular Mapping of Hydrogen Sulfide Targets in Normal Human Keratinocytes

Olivia Gross-Amat ^{1,2,3,*} , Marine Guillen ¹, Jean-Pascal Gimeno ⁴ , Michel Salzet ⁴ ,
Nicolas Lebonvallet ⁵, Laurent Misery ^{5,6} , Céline Auxenfans ^{2,7,†} and Serge Nataf ^{1,2,3,†}

¹ Lyon-Est School of Medicine, University Claude Bernard Lyon-1, 69100 Villeurbanne, France; marine.guillen@univ-lyon1.fr (M.G.); serge.nataf@inserm.fr (S.N.)

² Bank of Tissues and Cells, Lyon University Hospital (Hospices Civils de Lyon), 69003 Lyon, France; celine.auxenfans@chu-lyon.fr

³ CarMeN Laboratory, INSERM U1060, INRA U1397, INSA de Lyon, 69600 Oullins, France

⁴ Inserm, CHRU Lille, U-1192-Laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse-PRISM, University of Lille, F-59000 Lille, France; jean-pascal.gimeno@univ-lille.fr (J.-P.G.); michel.salzet@univ-lille.fr (M.S.)

⁵ Laboratory of Epithelial-Neural Interactions, University of Brest, LIEN, 29200 Brest, France; nicolas.lebonvallet@univ-brest.fr (N.L.); laurent.misery@chu-brest.fr (L.M.)

⁶ Department of dermatology, Brest University Hospital (CHU de Brest), 29200 Brest, France

⁷ Tissue Biology and Therapeutic Engineering Laboratory, UMR 5305, 69007 Lyon, France

* Correspondence: olivia.gross.amat@free.fr

† These authors contributed equally to this work.

Received: 1 May 2020; Accepted: 26 June 2020; Published: 30 June 2020



Abstract: Although sulfur-rich thermal waters have ancestrally been used in the context of dermatological conditions, a global mapping of the molecular effects exerted by H₂S on human keratinocytes is still lacking. To fill this knowledge gap, we subjected cultured human keratinocytes to distinct amounts of the non-gaseous hydrogen sulfur donor NaHS. We first checked that H₂S accumulated in the cytoplasm of keratinocytes under our experimental conditions and used a combination of proteomics, genomics and biochemical approaches to unravel functionally relevant H₂S targets in human keratinocytes. We found that the identified targets fall into two main categories: (i) the oxidative stress response molecules superoxide dismutase 2 (SOD2), NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1) and culin 3 (CUL3) and (ii) the chemokines interleukin-8 (IL-8) and CXCL2. Interestingly, NaHS also stimulated the caspase-1 inflammasome pathway, leading to increased secretion of the pro-inflammatory molecule interleukin-18 (IL-18). Interestingly, the secretion of interleukin-1 beta (IL-1β) was only modestly impacted by NaHS exposure despite a significant accumulation of IL-1β pro-form. Finally, we observed that NaHS significantly hampered the growth of human keratinocyte progenitors and stem cells cultured under clonogenic conditions or as epidermal cell sheets. We conclude that H₂S exerts specific molecular effects on normal human keratinocytes.

Keywords: human keratinocyte; H₂S; RNAseq; proteomics

1. Introduction

Sulfur-rich thermal waters are an ancestral dermatological therapy which nowadays is used as an adjunct treatment for psoriasis and atopic dermatitis [1–4] but also chronic skin wounds [4,5]. Hydrogen sulfide (H₂S), the main bioactive component specific to sulfur-rich thermal waters, belongs to the small family of physiological gaseous transmitters, which also comprises nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO). Similarly to NO and CO, H₂S is endogenously produced and exerts potent signaling effects, but exhibits a short half-life and a rapid decrease in its concentration at the site of production

or application. Such a volatility renders the use of H₂S difficult under *in vitro* or *in vivo* experimental conditions. As a consequence, the non-gaseous hydrogen sulfur donor NaHS is frequently preferred for research purposes. In order to mimic the impact of sulfur-rich spa waters on skin cells, previous works thus assessed the effects of NaHS on the proliferation, differentiation, adhesion properties and cytokine profile of cultured human keratinocytes [6–10]. Under these experimental conditions, NaHS was notably reported to inhibit the synthesis of anti-inflammatory molecules such as IL-8 and IL-1 β , which provided support for the use of sulfur-rich thermal waters for the treatment of psoriasis [7,9]. However, as such findings were obtained from transformed keratinocyte cell lines, their physiological relevance remains to be confirmed in primary cultures of keratinocytes. Moreover, none of the above-mentioned works used systems biology approaches to assess, other than a priori, the global impact of NaHS on human keratinocytes. Hence, a systematic molecular mapping of the effects exerted by NaHS on human primary cultures of keratinocytes is still missing. To fill this knowledge gap, we performed here a pan-genomics and pan-proteomics analysis of cultured human keratinocytes exposed to NaHS. Our results show that NaHS inhibits the proliferation of human keratinocyte progenitors and stem cells, stimulates their secretion of specific pro-inflammatory cytokines and promotes the synthesis of molecules involved in antioxidative response. These findings provide insights into the molecular effects exerted by sulfur-rich spa waters on skin cells and point to the potential role of H₂S as a gaseous regulator of epidermal cell homeostasis.

2. Results

2.1. NaHS Induces a Rapid and Transient Increase in H₂S in Human Keratinocyte Cultures

To assess the actual impact of NaHS on the generation of H₂S in our experimental conditions, we first measured H₂S amounts in the supernatant of control vs. NaHS-treated cultures of human keratinocytes. We found that NaHS added to the culture media at a concentration of 0.25 mM induced a quick rise in H₂S, irrespective of the presence or absence of cultured keratinocytes (Figure 1a). As a return to baseline levels was observed 1 h after NaHS exposure (Figure 1a), these results demonstrate that NaHS exerts rapid and transient effects on H₂S amounts measured in the culture media. In parallel experiments, we also sought to determine whether, as a consequence of an H₂S rise in the culture medium, an intracellular increase in H₂S could be observed in the cytoplasm of cultured human keratinocytes. The use of a fluorescent H₂S probe allowed us to demonstrate that NaHS-treated keratinocytes exhibited an intracytoplasmic accumulation of H₂S, which could be observed 1h following NaHS exposure (Figure 1b and Data Supplement Figure S1). Interestingly, such an effect appeared to be more pronounced when higher concentrations of NaHS were applied (Figure 1b).

2.2. NaHS Impairs the Growth of Human Keratinocyte Progenitors and Stem Cells

To assess the impact of NaHS on the growth of keratinocyte progenitors and stem cells, we performed a keratinocyte clonogenic assay (CFU) and measured the effects of NaHS (0.02 mM or 0.25 mM) on both the number and size of colonies. While the number of clones remained unchanged under NaHS treatment (Figure 2a,b), we observed that the clones exhibited smaller sizes (Figure 2a). Accordingly, the counts of harvested cells obtained 10–14 days post-treatment were nearly 80% lower in cultures treated with 0.25 mM NaHS as compared to controls (Figure 2c). Such an effect was not observed when 0.02 mM NaHS was applied. Similarly, in cultures of human epithelial cell sheets, which are composed of more than 90% CD49f-positive keratinocyte progenitors [11,12] (Data Supplement, Figure S2 and Table S1), total cell counts were significantly lower in NaHS-treated cultures as compared to controls (Figure 2d). However, such a growth-limiting effect was less pronounced under these experimental conditions and reached only 30% in NaHS-treated as compared to control cultures. Again, NaHS applied at concentrations below 0.25 mM had no impact on the growth of keratinocyte progenitors. Of note, irrespective of the tested NaHS concentrations (from 0.0025 to 4 mM), we did

not observe any impact on keratinocyte cell viability as assessed by trypan blue coloration or MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Data Supplement, Figure S3).

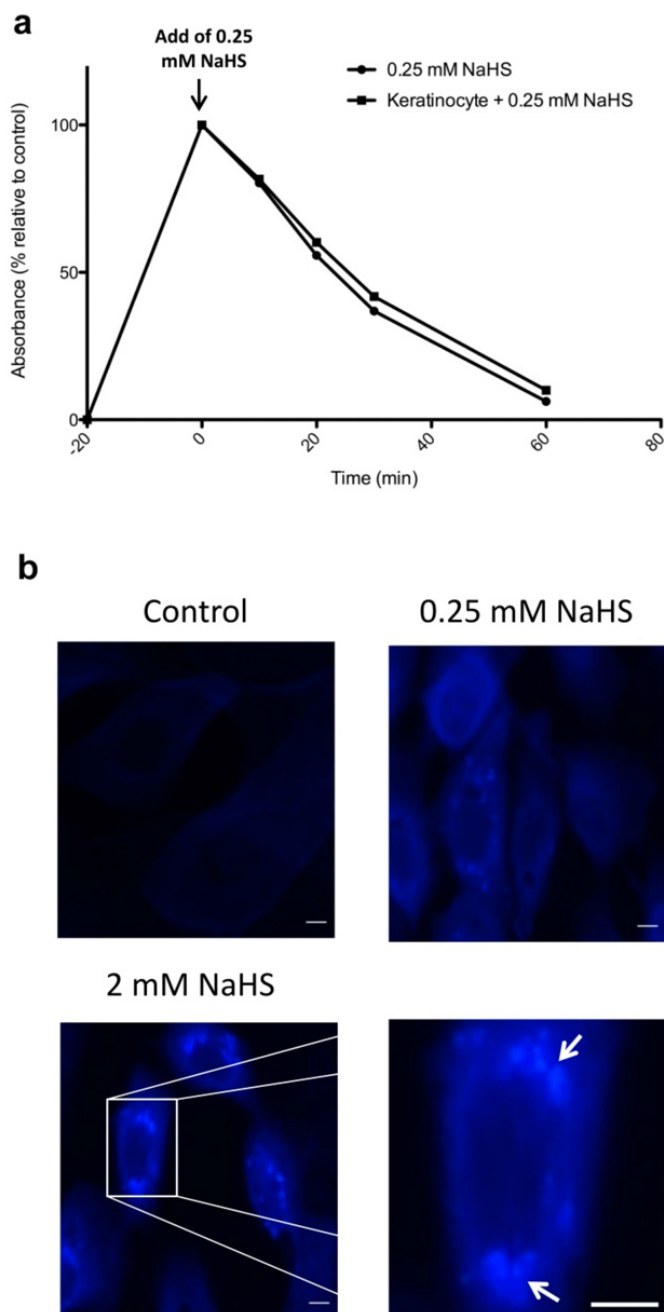


Figure 1. NaHS induces the extracellular and intracellular accumulation of H₂S in human keratinocyte cultures. **(a)** Kinetics of H₂S accumulation in keratinocyte culture medium following addition of 0.25 mM NaHS in the presence or absence of cultured keratinocytes. **(b)** The use of a fluorescent H₂S probe allowed detection of H₂S accumulation (arrows) in the cytoplasm of cultured keratinocytes stimulated with NaHS at a concentration of 0.25 or 2 mM. Results are representative of three to five experiments. Scale bar: 0.01 mm.

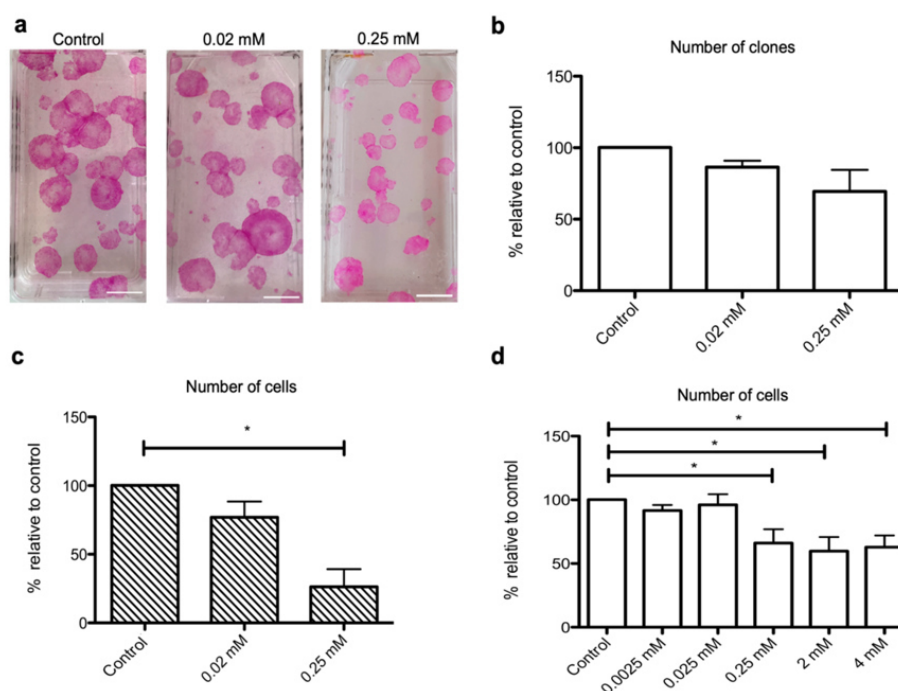


Figure 2. NaHS impairs the growth of human epidermal stem cells and epidermal cell sheets. (a–c) Human keratinocytes cultured under clonogenic conditions were stimulated every other day with NaHS at 0.02 or 0.25 mM concentrations during 12 days. Cells were then fixed and stained with hematein–eosin, allowing colonies of keratinocyte stem or progenitor cells to be manually counted. Keratinocyte cultures generated in parallel under strictly identical conditions were trypsinized, and living cells were numerated following trypan blue staining. Four keratinocyte cultures deriving from four distinct donors were used in these experiments. (a) Representative images of grown colonies obtained under control condition (upper panel) or under NaHS stimulation at 0.02 mM concentration (middle panel) or 0.25 mM concentration (lower panel). Images show that, as compared to control untreated cells or cells treated with 0.02 mM NaHS, colonies are of lower size in cells treated with 0.25 mM NaHS (b) Irrespective of NaHS concentration, the total number of colonies remains unchanged in NaHS-treated cells as compared to control cells. (c) However, the total number of harvested living cells is significantly lower in cultures treated with 0.25 mM NaHS as compared to control untreated cultures. (d) The effects of NaHS on the cellular density of epidermal cell sheets were assessed after 24h treatment with NaHS at concentrations ranging from 0.0025 mM to 4 mM. Experiments were performed on cells obtained from six distinct donors. Results are expressed as percentages relative to control conditions. Statistical significance of paired comparisons was assessed with the Wilcoxon test. *: $p < 0.05$. Scale bar: 1 cm.

2.3. NaHS Stimulates the Synthesis of Superoxide Dismutase 2 (SOD2) by Cultured Human Keratinocytes

We used liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) to perform a pan-proteomic analysis of the effects exerted by 0.25 mM NaHS on human epidermal cell sheets. It should be noticed that LC-MS is known to be a relatively poorly sensitive technique allowing the detection of only abundantly expressed proteins. Accordingly, only 337 proteins constantly reached the threshold of detection in the analyzed samples, and paired comparisons showed that 10 proteins exhibited differential expression with p -values < 0.05 (Data Supplement, Table S2). However, fold changes were relatively low (< 1.5), and statistical significance was not confirmed when p -values were adjusted with the Benjamini–Hochberg procedure. We nevertheless combined these results with a manual curation of the literature to identify candidate molecules which would be worth assessing with more sensitive techniques. Among the 10 identified candidate molecules, only superoxide dismutase 2 (SOD2) was

previously shown to be regulated by NaHS. SOD2 is an antioxidant enzyme which decreases the level of ROS (reactive oxygen species), thus participating in cellular defense against oxidative stress. On this basis, we thus performed an ELISA measurement of SOD2 on cell extracts derived from NaHS-treated or control epidermal cell sheets and observed that NaHS induced a nearly 100% increase in SOD2 amounts in NaHS-treated epidermal cell sheets ($p < 0.05$) (Data Supplement, Figure S4). To further assess the links between NaHS and oxidative stress, we then performed a complementary bioinformatics analysis based on a survey of the comparative Toxicogenomics database (CTD) [13]. This approach allowed us to retrieve a list of 504 genes (Data Supplement, Table S3), which, in human cells, were previously reported to be modulated by hydrogen-sulfide-containing compounds. Confirming our proteomics data on SOD2, the highest functional enrichment retrieved from this list was obtained with genes annotated with the GO term “response to reactive oxygen species” (Table 1).

Table 1. Enrichment analysis of genes targeted by hydrogen-sulfide-containing compounds. The whole list of genes targeted by hydrogen-sulfide-containing compounds according to the CTD database [13] was submitted to an enrichment analysis. Enrichment in genes annotated with GO (gene ontology) terms of the “biological process” category was assessed using the enrichment analysis platform Enrichr [14]. To filter out GO terms corresponding to poorly specific biological functions, only GO terms annotating less than 100 genes were taken into account. Adjusted p -values provided by the Enrichr webtool were calculated with a modified Fisher exact test [14].

| GO Term | Adjusted p -Value |
|--|------------------------|
| response to reactive oxygen species | 5.79×10^{-19} |
| extrinsic apoptotic signaling pathway | 9.14×10^{-18} |
| activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process | 3.08×10^{-17} |
| cellular response to reactive oxygen species | 6.10×10^{-17} |
| glutathione metabolic process | 7.22×10^{-16} |
| negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway | 2.05×10^{-15} |
| cellular response to mechanical stimulus | 1.00×10^{-14} |
| I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling | 2.73×10^{-13} |
| interleukin-1-mediated signaling pathway | 2.73×10^{-13} |
| toll-like receptor signaling pathway | 3.46×10^{-13} |

2.4. NaHS Exerts Specific Effects on the RNA Profile of Cultured Human Keratinocytes

We then performed an RNA-seq analysis to assess the genomic impact of 0.25 mM NaHS on human epidermal cell sheets. While 12,000 to 14,000 transcripts were detected in each sample, paired comparisons allowed identifying only 265 protein-coding differentially expressed genes with a fold change >1.5 and an adjusted p -value < 0.05 (Data Supplement, Table S4). Among these 265 genes, 122 were up-regulated and 143 were down-regulated by NaHS treatment. While such lists were not enriched in genes signing specific molecular pathways according to the enrichment analysis platform Enrichr, 11 of the identified genes (Table 2) belonged to the list of 504 hydrogen sulfide target genes we retrieved from the CTD database. These notably comprised the oxidative stress response genes NQO1 (NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1) [15] and CUL3 (Culin 3) [16], the chemokine CXCL2 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 2) [17–20] and the inflammasome component CASP1 (Caspase-1), which enables the maturation of IL-1 β (Interleukin-1 β) and IL-18 (Interleukin-18) [21,22].

Table 2. List of NaHS-modulated keratinocyte genes previously shown to be targeted by sulfide-containing compounds. The list of genes identified as being modulated by NaHS in cultured epidermal cell sheets was crossed with the list of genes previously shown to be targeted by hydrogen sulfide-containing compounds according to the CTD database [13].

| Gene Symbol | Gene Name |
|----------------------|--|
| Up-regulated genes | |
| CASP1 | Caspase-1 |
| CAST | Calpastatin |
| CUL3 | Cullin 3 |
| CXCL2 | C-X-C motif chemokine ligand 2 |
| GDF15 | Growth differentiation factor 15 |
| NQO1 | NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 |
| SLC3A2 | Solute carrier family 3 member 2 |
| UGT1A6 | UDP glucuronosyltransferase family 1 member A6 |
| Down-regulated genes | |
| CAMKK2 | Calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase 2 |
| HOMER3 | Homer scaffold protein 3 |
| PTK2 | Protein tyrosine kinase 2 |

2.5. NaHS Modifies the Secretary Profile of Cultured Human Keratinocytes

The results we obtained by RNA-seq analysis prompted us to investigate, at the protein level, the impact of NaHS on the secretion of specific components of the cytokine/chemokine inflammatory response. Besides CXCL2, IL-1 beta (IL-1 β) and IL-18, we focused our analysis on IL-8 (interleukin-8) and VEGF (vascular endothelial growth factor), two cytokines highly expressed by human keratinocytes under basal conditions [23–26]. We observed that NaHS, when applied at the concentration of 0.25 mM, induced a statistically significant increase in IL-1 β , IL-18, IL-8 and CXCL2 (Figure 3). However, a significant dose-dependent effect of NaHS was demonstrated only for the synthesis of IL-8 (Figure 3e) and CXCL2 (Figure 3a). Moreover, as compared to IL-18 (Figure 3c) and IL-1 β (Figure 3b), the stimulating impact of NaHS was far more pronounced on IL-8 (maximal increase: 160%) and CXCL2 (maximal increase: 90%). Indeed, NaHS at a concentration of 0.25 mM stimulated IL-8 secretion at similar levels to the prototypical pro-inflammatory cytokine TNF- α (tumor necrosis factor alpha) [27,28] (Figure 3f). In addition, NaHS and TNF- α exerted synergistic stimulating effects on the synthesis of IL-8 (Figure 3f). Such findings remained unchanged when taking into account the impact of NaHS on the growth of epidermal cell sheets (Data Supplement, Figure S5). In contrast with the impact of NaHS on IL-8 secretion, NaHS induced an only limited increase in IL-1 β synthesis. Of note, such an effect was not dose-dependent and was exclusively observed for a concentration of 0.25 mM NaHS. Moreover, maximum mean values measured for IL-1 β remained below 8 pg/mL, compared to more than 6000 pg/mL for IL-8, nearly 1000 pg/mL for IL-18 and more than 60 pg/mL for CXCL2 (Data Supplement, Figure S6). Finally, NaHS had no measurable effect on the synthesis of VEGF (Figure 3d), a molecule sharing functional properties with IL-8 with regard to its pro-angiogenic effects. Altogether, these data demonstrate that NaHS modifies, in a specific manner, the chemokine/cytokine secretome of cultured human keratinocytes.

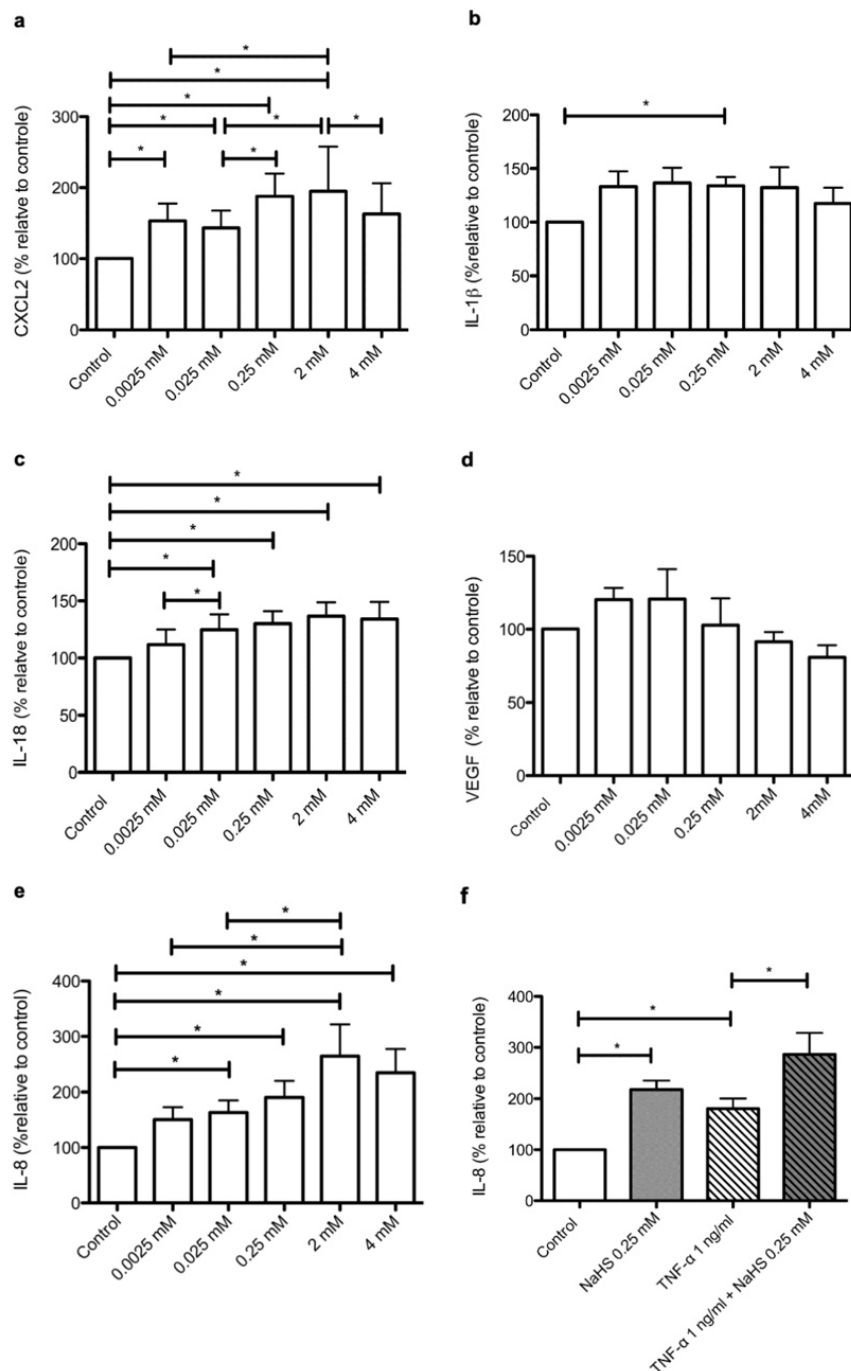


Figure 3. NaHS treatment modifies the cytokine/chemokine secretion profile of human epidermal cell sheets. Human epidermal cell sheets were cultured under control conditions or stimulated with NaHS at 0.0025, 0.025, 0.25, 2, or 4mM, alone or in combination with TNF- α (1 ng/mL Cell supernatants were then recovered 24 h after stimulation and the cytokines CXCL2 (a), IL-1 β (b), IL-18 (c), VEGF (d) and IL-8 (e–f) were measured by ELISA. Results are expressed as percentages relative to control measures observed in the absence of NaHS and/or TNF- α stimulation. Experiments were performed on epidermal cell sheets obtained from at least five distinct donors. The statistical significance of paired comparisons was assessed with the Wilcoxon test. *: $p < 0.05$.

2.6. Distinct Molecular Pathways Mediate the Stimulating Effects of NaHS on the Synthesis of IL-1 β and IL-18 by Cultured Human Keratinocytes

To start getting insights into the molecular pathways involved in NaHS-induced alterations of the secretome of cultured human keratinocytes, we assessed whether a pharmacological inhibition of human caspase-1 could block, at least partially, the stimulating effects exerted by NaHS on IL-1 β and IL-18. We observed that, as expected, the stimulating effect of NaHS on IL-18 was significantly dampened in the presence of the caspase-1 inhibitor Z-WHED-FMK (Figure 4a). In contrast, this was not observed regarding IL-1 β synthesis (Figure 4b). It should be noticed that such a negative result might be explained by two combined parameters: i) the relatively low amplitude of the stimulating impact of NaHS on IL-1 β secretion and ii) the fact that dimethylsulfoxide (DMSO), used as a vehicle for the caspase-1 inhibitor Z-WHED-FMK, has itself exhibited a slight stimulating effect on IL-1 β secretion. Finally, a western blot analysis showed that NaHS increased the levels of intracytoplasmic IL-1 β proform (Figure 4c), indicating that mechanisms complementing the caspase-1/inflammasome pathway may support the pro-inflammatory effects exerted by NaHS on cultured human keratinocytes.

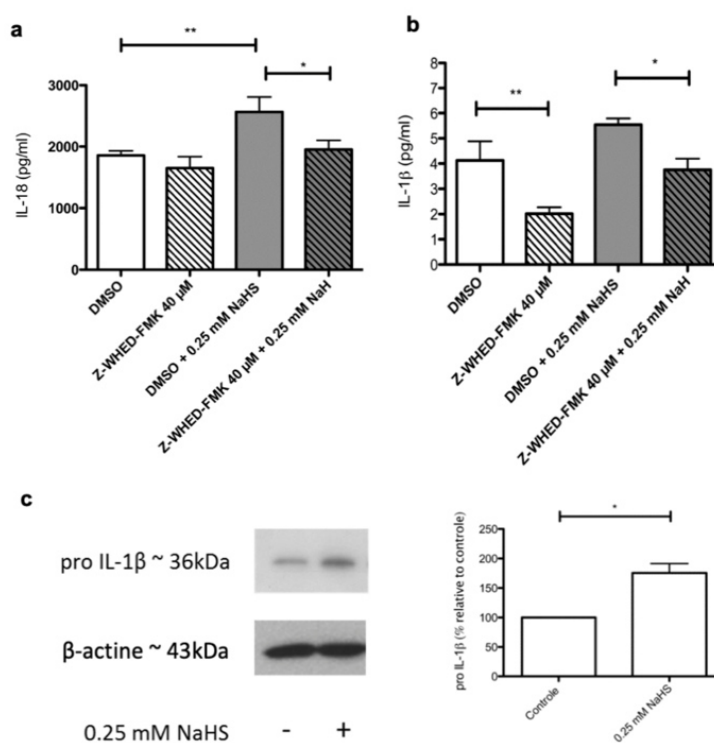


Figure 4. Role of the caspase-1 inflammasome pathway in NaHS-induced synthesis of IL-18 and IL-1 β . Human epidermal cell sheets were stimulated with NaHS at 0.25 mM in the presence of either the caspase-1 inhibitor Z-WHED-FMK 40 μ M diluted in DMSO or DMSO alone (a,b). Cell supernatants were then recovered 24h after stimulation and the cytokines IL-18 (a) and IL-1 β (b) were measured by ELISA. In other experiments, the amount of IL-1 β pro-form was measured by western blotting on protein extracts obtained from control or NaHS-treated human epidermal cell sheets (c). Experiments were performed three to five times on human epidermal cell sheets derived from one donor. Statistical significance of unpaired comparisons was assessed with the Mann and Whitney test. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

3. Discussion

Most of the results presented in this paper were obtained with a concentration of 0.25 mM NaHS, i.e., 14 mg/L NaHS. Since each NaHS molecule generates one H₂S molecule, the expected concentration

of H₂S corresponding to 0.25 mM NaHS is likely to stay in the concentration ranges previously measured in sulfur-rich spa waters, i.e., 0.5 to 20 mg/L [29]. We also demonstrated that a single stimulation with NaHS was sufficient to induce the subsequent accumulation of H₂S in the cytoplasm of cultured keratinocytes. These observations thus support the relevance of our experimental setting to study the molecular impact of sulfur-rich spa waters on human skin cells.

It should be noted that, among cells of the keratinocyte lineage, only keratinocyte stem cells and progenitors are endowed with the ability to proliferate under physiological conditions. Nevertheless, to our knowledge, the few works reporting on the effects of NaHS on the proliferation of human keratinocytes were performed exclusively on transformed or cancerous keratinocyte cell lines [6,8,10]. Using two distinct experimental settings, i.e., clonogenic cultures of keratinocytes and cultures of epidermal cell sheets, we found that NaHS hampered the growth of keratinocyte progenitors and stem cells. These findings contradict previous results obtained with keratinocyte cell lines [6,8] and provide a possible explanation for the reported beneficial effects exerted by sulfur-rich spa waters in patients suffering from psoriasis, a keratinocyte hyperproliferative skin disease.

The present paper is also the first work reporting on a global mapping, at both the mRNA and protein levels, of the molecular effects exerted by NaHS on cultured human keratinocytes. Our data show that human keratinocytes exposed to NaHS engage an oxidative stress response involving SOD2, NQO1 and CUL3. We also report here that the whole list of currently known targets of sulfide-rich compounds is highly significantly enriched in antioxidant stress response genes. Accordingly, in other models and cell types, NaHS was similarly found to induce an oxidative stress response via the up-regulation of SOD1, SOD2, CAT (Catalase) and/or GPX (glutathione peroxylase 1) [30–32]. More specifically, previous reports demonstrated in non-skin cells that the NaHS-induced up-regulation of *NQO1* and *SOD2* mRNAs [33,34] was mediated by the transcription factor NFEL2 (nuclear factor erythroid 2 like 2, also known as NRF2), a key orchestrator of the genomic oxidative stress response [35–37]. In this view, based on the well-established role of cullin-3 as a promoter of NRF2 degradation [34,38,39], the NaHS-induced up-regulation of *CUL3* mRNA levels in human keratinocytes might reflect a negative feedback loop aimed at terminating the oxidative stress response. In any case, the primary molecular mechanisms linking H₂S to oxidative stress remain poorly understood. Of note, any intracytoplasmic elevation of H₂S levels results in the generation of reactive sulfur species (RSS), which, just as reactive oxygen species (ROS), trigger an anti-oxidative stress response [40]. In a rather provocative view, a recent paper proposed that in archaic forms of life, coping with a sulfur-rich environment was the primary function of genes which are now devoted to protect cells from oxidative stress [41].

Besides oxidative-stress-related molecules, we also found that, in epidermal cell sheets, NaHS specifically promoted the secretion of IL-8 and CXCL2, two cytokines/chemokines constitutively expressed by keratinocytes [25,26,42] and involved in both skin inflammatory responses [17,19] and skin repair [43,44]. In contrast, NaHS did not promote or only modestly promoted the synthesis of molecules that are frequently up-regulated under skin inflammatory conditions, namely VEGF and IL-1 β . Overall, the impact of NaHS on the secretory profile of human keratinocytes is specific and finely tuned and appears to involve multiple mechanisms operating at the transcriptional, translational and, possibly, post-translational levels.

Our work provides experimental evidence that H₂S contained in sulfur-rich spa waters is a bio-active component able to modify the immunological status of non-diseased human keratinocytes. Further studies are needed to establish causal links between the above-identified biological effects and the previously reported medical benefits afforded by sulfur-rich spa waters in conditions such as psoriasis, eczema or wound healing [1–4]. In particular, it would be interesting to assess the effects of NaHS on keratinocytes derived from psoriatic lesions.

4. Materials and Methods

4.1. Ethical Statement

Samples were anonymized, and written informed consent was obtained in accordance with the ethical guidelines of Lyon University Hospital (Hospices Civils de Lyon) and the principles of the Declaration of Helsinki. All the samples used in this study belong to a collection of human skin samples declared to the French research ministry (Declaration no. DC-2008-162), delivered to the Bank of Tissues and Cells of the Hospices Civils de Lyon.

4.2. Generation of Cultured Human Epidermal Sheets

Normal human epidermal keratinocyte were grown on a feeder layer of irradiated human fibroblasts as previously described [45,46] in keratinocyte culture medium (KCM). See the Supplementary Data for further details. When needed, cells were harvested with trypsin-EDTA 0.05% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and collected for analysis.

4.3. NaHS

For each experiment, a fresh solution of 0.25 M NaHS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolved in PBS was prepared and used as a stock solution to perform ad-hoc primary dilution in DMEM supplemented with 0.1% FCS. Depending on the desired final concentrations, secondary dilutions were then performed in cell culture medium.

4.4. Measurements of H₂S in Culture Supernatants

H₂S concentrations were measured in culture medium as previously described [47,48] with slight modifications. Briefly, supernatants were collected at different time points (0–10–20–30–60 min–4 h–24 h) following the addition of 0.25 mM NaHS to the cell culture medium. A quantity of 500 µL of harvested supernatant was then mixed with 250 µL of zinc acetate (1% w/v), and 133 µL of *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine sulfate (20 mM) in 7.2 M HCl was then added followed by 133 µL of FeCl₃ (30 mM) in 1.2 M HCl and 250 µL of trichloroacetic acid (10%, w/v). Within 15 min thereafter, absorbance was measured at 670 nm. In parallel, a calibration curve was obtained from the analysis of defined H₂S concentrations (5–20–50–100–250 µM).

4.5. Fluorescence-Based Detection of Intracellular H₂S

Keratinocytes were cultured until sub-confluence on cover glasses in a 24-well plate. NaHS (0.25 or 2 mM) and H₂S fluorescent probes (100 µM, P3, Sigma) were co-incubated for 1 h at 37 °C and 5% CO₂. Cells were rinsed 3 times in PBS 1X and fixed in 4% formaldehyde. Cover glasses were then transferred on a slide. Detection of intracellular fluorescence was carried out on an Eclipse 50i microscope (Nikon, Champigny sur Marne, Val-de-Marne, France).

4.6. Clonogenic Assay

A keratinocyte clonogenic assay was performed as previously described following a procedure routinely used in our laboratory [49]. See the Supplementary Data for further information. Experiments were performed on cells derived from five independent donors and a total of 12 flasks per donor (6 treated and 6 untreated) were analyzed.

4.7. RNA-seq and Proteomics Analyses

Epidermal cell sheets were generated by culturing human keratinocytes for 12 days as described above. Epidermal cell sheets were then treated or not for 24 h with 0.25 mM NaHS then lysed using a RLT lysis buffer (Qiagen, Hilden, Germany) for RNA-seq analyses or mechanically detached using a cell scraper for proteomics analyses. RNA-seq and proteomics analyses were performed by the

Lyon-1 university genomics platform ProfileXpert and the Lille university proteomics platform PRISM (Proteomics Inflammatory Response Mass Spectrometry, INSERM U1192), respectively, as previously described [50–53] and detailed in the Supplementary Data.

4.8. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Standard procedures were applied and are detailed in the Supplementary Data.

4.9. Western Blot Analysis

Standard procedures were applied and are detailed in the Supplementary Data. To ensure that equal loading had been performed, membrane stainings with amido black were assessed as previously described [54]. Alternatively, membranes were incubated with an antibody against β -actin (1:2000, sc-47778, Clone C4, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg, Germany).

4.10. Statistical Analysis

Quantitative data obtained by ELISA or western blotting were generated from at least 5 independent experiments in which NaHS-stimulated cells were compared to control untreated cells. Statistical significance was calculated using the paired Wilcoxon test. In some experiments, the analyzed epidermal cell sheets were all generated from the same donor, and a Mann and Whitney test was thus used. To identify differentially expressed genes or proteins in RNA-seq and proteomics experiments, respectively, paired Student's *t*-tests were performed, and adjusted *p*-values were then calculated using the Benjamini–Hochberg procedure. All statistical analyses were performed using the software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Statistically significant differences in figures are indicated by asterisks as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

4.11. Data Availability

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository (<https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/>) with the dataset identifier PXD01824. The RNA-seq data have been deposited on the GEO repository with the identifier GSE148985.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/13/4648/s1>. Figure S1. NaHS induces the intracytoplasmic accumulation of H₂S in keratinocyte. Figure S2. Representative flow cytometry data obtained on dissociated cells derived from cultured human epithelial cell sheets (Kera) vs irradiated fibroblasts (Fibros) used as a feeder layer for epidermal cell sheets. Figure S3. Impact of NaHS on the cell viability of cultured human keratinocyte. Figure S4. NaHS stimulates the synthesis of SOD2 by human epidermal cell sheets. Figure S5. NaHS stimulates the synthesis of IL-8 by human epidermal cell sheets. Figure S6. NaHS treatment modifies the cytokine/chemokine profile of human epidermal cell sheets. Table S1. Mean values obtained from the analysis of dissociated epidermal cell sheets ($n = 44$) for CD49f, CD90 and HMB45. Table S2. List of proteins detected by liquid chromatography/mass spectrometry as being modulated by NaHS in human epidermal cell sheets. Table S3. List of genes targeted by hydrogen sulfide-containing compounds according to the CTD database (only protein-coding genes were retained). Table S4. List of genes displaying significant differential expression in NaHS-treated vs control epidermal cell sheets.

Author Contributions: O.G.-A.: conceptualization, investigation, visualization, data curation and writing (original draft preparation); M.G.: investigation; J.-P.G.: investigation and data curation; M.S.: data curation, resources, and writing (review and editing); N.L.: conceptualization, supervision, funding acquisition and writing (review and editing); L.M.: conceptualization, supervision, funding acquisition and writing (review and editing); C.A.: conceptualization, data curation, supervision, funding acquisition and writing (original draft preparation); S.N.: conceptualization, data curation, supervision, funding acquisition and writing (original draft preparation). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by a grant (to SN and CA) and a doctoral scholarship (to OG) from the French association for research on spa waters (AFRETH: “Association Française pour la Recherche Thermale”).

Acknowledgments: This research was also supported by the “Ministère de L'Education Nationale, L'Enseignement Supérieur et de la Recherche”, by INSERM, Hospices Civils de Lyon, CHRU Lille, University Claude Bernard Lyon-1 and University of Lille.

Conflicts of Interest: Laurent Misery is a consultant for Avène, Uriage and La Roche-Posay.

Abbreviations

| | |
|------------------|---------------------|
| NAHS | Sodium hydrosulfide |
| H ₂ S | Hydrogen sulfide |
| IL | Interleukin |

References

1. Carbajo, J.M.; Maraver, F. Sulphurous Mineral Waters: New Applications for Health. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2017**, *2017*, 1–11. [[CrossRef](#)]
2. Gianfaldoni, S.; Tchernev, G.; Wollina, U.; Rocchia, M.G.; Fioranelli, M.; Gianfaldoni, R.; Lotti, T. History of the Baths and Thermal Medicine. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* **2017**, *5*, 566–568. [[CrossRef](#)]
3. Huang, A.; Seité, S.; Adar, T. The use of balneotherapy in dermatology. *Clin. Dermatol.* **2018**, *36*, 363–368. [[CrossRef](#)]
4. Matz, H.; Orion, E.; Wolf, R. Balneotherapy in dermatology. *Dermatol. Ther.* **2003**, *16*, 132–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Davinelli, S.; Bassetto, F.; Vitale, M.; Scapagnini, G. Chapter 10—Thermal Waters and the Hormetic Effects of Hydrogen Sulfide on Inflammatory Arthritis and Wound Healing. In *The Science of Hormesis in Health and Longevity*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 121–126.
6. Xie, X.; Dai, H.; Zhuang, B.; Chai, L.; Xie, Y.; Li, Y. Exogenous hydrogen sulfide promotes cell proliferation and differentiation by modulating autophagy in human keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *472*, 437–443. [[CrossRef](#)]
7. Mirandola, P.; Gobbi, G.; Micheloni, C.; Vaccarezza, M.; Di Marcantonio, D.; Ruscitti, F.; de Panfilis, G.; Vitale, M. Hydrogen sulfide inhibits IL-8 expression in human keratinocytes via MAP kinase signaling. *Lab. Investig.* **2011**, *91*, 1188–1194. [[CrossRef](#)]
8. Gobbi, G.; Ricci, F.; Malinverno, C.; Carubbi, C.; Pambianco, M.; de Panfilis, G.; Vitale, M.; Mirandola, P. Hydrogen sulfide impairs keratinocyte cell growth and adhesion inhibiting mitogen-activated protein kinase signaling. *Lab. Investig.* **2009**, *89*, 994–1006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Yang, C.; Yang, Z.; Zhang, M.; Dong, Q.; Wang, X.; Lan, A.; Zeng, F.; Chen, P.; Wang, C.; Feng, J. Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced cytotoxicity and inflammation in HaCaT cells through inhibition of ROS/NF- κ B/COX-2 pathway. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21971. [[CrossRef](#)]
10. Merighi, S.; Gessi, S.; Varani, K.; Fazzi, D.; Borea, P.A. Hydrogen sulfide modulates the release of nitric oxide and VEGF in human keratinocytes. *Pharmacol. Res.* **2012**, *66*, 428–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Li, A.; Simmons, P.J.; Kaur, P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 3902–3907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Krebsbach, P.H.; Villa-Diaz, L.G. The Role of Integrin α 6 (CD49f) in Stem Cells: More than a Conserved Biomarker. *Stem Cells Dev.* **2017**, *26*, 1090–1099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Davis, A.P.; Grondin, C.J.; Johnson, R.J.; Sciaky, D.; McMorran, R.; Wieggers, J.; Wieggers, T.C.; Mattingly, C.J. The Comparative Toxicogenomics Database: Update 2019. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D948–D954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kuleshov, M.V.; Jones, M.R.; Rouillard, A.D.; Fernandez, N.F.; Duan, Q.; Wang, Z.; Koplev, S.; Jenkins, S.L.; Jagodnik, K.M.; Lachmann, A.; et al. Enrichr: A comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W90–W97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ross, D.; Siegel, D. NQO1 in protection against oxidative stress. *Curr. Opin. Toxicol.* **2018**, *7*, 67–72. [[CrossRef](#)]
16. Kobayashi, A.; Kang, M.-I.; Okawa, H.; Ohtsui, M.; Zenke, Y.; Chiba, T.; Igarashi, K.; Yamamoto, M. Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase to Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 7130–7139. [[CrossRef](#)]
17. Boro, M.; Balaji, K.N. CXCL1 and CXCL2 Regulate NLRP3 Inflammasome Activation via G-Protein-Coupled Receptor CXCR2. *J. Immunol.* **2017**, *199*, 1660–1671. [[CrossRef](#)]
18. De Filippo, K.; Dudeck, A.; Hasenberg, M.; Nye, E.; van Rooijen, N.; Hartmann, K.; Gunzer, M.; Roers, A.; Hogg, N. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood* **2013**, *121*, 4930–4937. [[CrossRef](#)]

19. Rajarathnam, K.; Schnoor, M.; Richardson, R.M.; Rajagopal, S. How do chemokines navigate neutrophils to the target site: Dissecting the structural mechanisms and signaling pathways. *Cell. Signal.* **2019**, *54*, 69–80. [[CrossRef](#)]
20. Rouault, C.; Pellegrinelli, V.; Schilch, R.; Cotillard, A.; Poitou, C.; Tordjman, J.; Sell, H.; Clément, K.; Lacasa, D. Roles of chemokine ligand-2 (CXCL2) and neutrophils in influencing endothelial cell function and inflammation of human adipose tissue. *Endocrinology* **2013**, *154*, 1069–1079. [[CrossRef](#)]
21. Guo, H.; Callaway, J.B.; Ting, J.P.-Y. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 677–687. [[CrossRef](#)]
22. Lee, D.-J.; Du, F.; Chen, S.-W.; Nakasaki, M.; Rana, I.; Shih, V.F.S.; Hoffmann, A.; Jamora, C. Regulation and function of the caspase-1 in an inflammatory microenvironment. *J. Investig. Dermatol.* **2015**, *135*, 2012–2020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kim, H.; Kang, J.S.; Lee, W.J. The Production IL-21 and VEGF in UVB-irradiated Human Keratinocyte Cell Line, HaCaT. *Immune Netw.* **2010**, *10*, 75–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Viac, J.; Palacio, S.; Schmitt, D.; Claudy, A. Expression of vascular endothelial growth factor in normal epidermis, epithelial tumors and cultured keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* **1997**, *289*, 158–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Rennekampff, H.-O.; Hansbrough, J.F.; Kiessig, V.; Doré, C.; Sticherling, M.; Schröder, J.-M. Bioactive Interleukin-8 Is Expressed in Wounds and Enhances Wound Healing. *J. Surg. Res.* **2000**, *93*, 41–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sticherling, M.; Bornscheuer, E.; Schröder, J.M.; Christophers, E. Localization of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8-immunoreactivity in normal and psoriatic skin. *J. Investig. Dermatol.* **1991**, *96*, 26–30. [[CrossRef](#)]
27. Bhattacharyya, S.; Dudeja, P.K.; Tobacman, J.K. Tumor Necrosis Factor α -induced Inflammation Is Increased but Apoptosis Is Inhibited by Common Food Additive Carrageenan. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 39511–39522. [[CrossRef](#)]
28. Zhou, P.; Lu, S.; Luo, Y.; Wang, S.; Yang, K.; Zhai, Y.; Sun, G.; Sun, X. Attenuation of TNF- α -Induced Inflammatory Injury in Endothelial Cells by Ginsenoside Rb1 via Inhibiting NF- κ B, JNK and p38 Signaling Pathways. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 464. [[CrossRef](#)]
29. Carubbi, C.; Gobbi, G.; Bucci, G.; Gesi, M.; Vitale, M.; Mirandola, P. Skin, Inflammation and Sulfurous Waters: What is Known, What is Believed, Skin, Inflammation and Sulfurous Waters: What is Known, What is Believed. *Eur. J. Inflamm.* **2013**, *11*, 591–599. [[CrossRef](#)]
30. Zhao, F.; Lei, F.; Yan, X.; Zhang, S.; Wang, W.; Zheng, Y. Protective Effects of Hydrogen Sulfide Against Cigarette Smoke Exposure-Induced Placental Oxidative Damage by Alleviating Redox Imbalance via Nrf2 Pathway in Rats. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *48*, 1815–1828. [[CrossRef](#)]
31. Liang, Y.; Zheng, P.; Li, S.; Li, K.; Xu, H. Nitrate reductase-dependent NO production is involved in H₂S-induced nitrate stress tolerance in tomato via activation of antioxidant enzymes. *Sci. Hortic.* **2018**, *229*, 207–214. [[CrossRef](#)]
32. Wen, Y.-D.; Wang, H.; Kho, S.; Rinkiko, S.; Sheng, X.; Shen, H.-M.; Zhu, Y.-Z. Hydrogen Sulfide Protects HUVECs against Hydrogen Peroxide Induced Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e53147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Glory, A.; Averill-Bates, D.A. The antioxidant transcription factor Nrf2 contributes to the protective effect of mild thermotolerance (40 °C) against heat shock-induced apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *99*, 485–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Shen, J.; Rasmussen, M.; Dong, Q.-R.; Tepel, M.; Scholze, A. Expression of the NRF2 Target Gene NQO1 Is Enhanced in Mononuclear Cells in Human Chronic Kidney Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 9091879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Xie, Z.-Z.; Liu, Y.; Bian, J.-S. Hydrogen Sulfide and Cellular Redox Homeostasis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 6043038. [[CrossRef](#)]
36. Meng, W.; Pei, Z.; Feng, Y.; Zhao, J.; Chen, Y.; Shi, W.; Xu, Q.; Lin, F.; Sun, M.; Xiao, K. Neglected role of hydrogen sulfide in sulfur mustard poisoning: Keap1 S-sulphydration and subsequent Nrf2 pathway activation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–17. [[CrossRef](#)]
37. Corsello, T.; Komaravelli, N.; Casola, A. Role of Hydrogen Sulfide in NRF2- and Sirtuin-Dependent Maintenance of Cellular Redox Balance. *Antioxidants (Basel)* **2018**, *7*, 129. [[CrossRef](#)]

38. Kaspar, J.W.; Jaiswal, A.K. An Autoregulatory Loop between Nrf2 and Cul3-Rbx1 Controls Their Cellular Abundance. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 21349–21358. [[CrossRef](#)]
39. Li, R.; Jia, Z.; Zhu, H. Regulation of Nrf2 Signaling. *React. Oxyg. Species (Apex)* **2019**, *8*, 312–322. [[CrossRef](#)]
40. Olson, K.R.; Gao, Y.; Arif, F.; Arora, K.; Patel, S.; DeLeon, E.R.; Sutton, T.R.; Feelisch, M.; Cortese-Krott, M.M.; Straub, K.D. Metabolism of hydrogen sulfide (H₂S) and Production of Reactive Sulfur Species (RSS) by superoxide dismutase. *Redox Biol.* **2017**, *15*, 74–85. [[CrossRef](#)]
41. Olson, K.R.; Gao, Y. Effects of inhibiting antioxidant pathways on cellular hydrogen sulfide and polysulfide metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *135*, 1–14. [[CrossRef](#)]
42. Olaru, F.; Jensen, L.E. Staphylococcus aureus stimulates neutrophil targeting chemokine expression in keratinocytes through an autocrine IL-1alpha signaling loop. *J. Investig. Dermatol.* **2010**, *130*, 1866–1876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ridiandries, A.; Tan, J.T.M.; Bursill, C.A. The Role of Chemokines in Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Gillitzer, R.; Goebeler, M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J. Leukoc. Biol.* **2001**, *69*, 513–521. [[PubMed](#)]
45. Barrandon, Y.; Green, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 2302–2306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Black, A.F.; Bouez, C.; Perrier, E.; Schlotmann, K.; Chapuis, F.; Damour, O. Optimization and characterization of an engineered human skin equivalent. *Tissue Eng.* **2005**, *11*, 723–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Zhu, Y.Z.; Wang, Z.J.; Ho, P.; Loke, Y.Y.; Zhu, Y.C.; Huang, S.H.; Tan, C.S.; Whiteman, M.; Lu, J.; Moore, P.K. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats. *J. Appl. Physiol.* **2007**, *102*, 261–268. [[CrossRef](#)]
48. Li, L.; Bhatia, M.; Zhu, Y.Z.; Zhu, Y.C.; Ramnath, R.D.; Wang, Z.J.; Anuar, F.B.M.; Whiteman, M.; Salto-Tellez, M.; Moore, P.K. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J.* **2005**, *19*, 1196–1198. [[CrossRef](#)]
49. Jobeili, L.; Rousselle, P.; Béal, D.; Blouin, E.; Roussel, A.-M.; Damour, O.; Rachidi, W. Selenium preserves keratinocyte stemness and delays senescence by maintaining epidermal adhesion. *Aging (Albany NY)* **2017**, *9*, 2302–2315. [[CrossRef](#)]
50. Arab, T.; Raffo-Romero, A.; Van Camp, C.; Lemaire, Q.; Le Marrec-Croq, F.; Drago, F.; Aboulouard, S.; Slomianny, C.; Lacoste, A.-S.; Guigon, I.; et al. Proteomic characterisation of leech microglia extracellular vesicles (EVs): Comparison between differential ultracentrifugation and Optiprep™ density gradient isolation. *J. Extracell. Vesicles* **2019**, *8*, 1603048. [[CrossRef](#)]
51. Sinel, C.; Cacaci, M.; Meignen, P.; Guérin, F.; Davies, B.W.; Sanguinetti, M.; Giard, J.-C.; Cattoir, V. Subinhibitory Concentrations of Ciprofloxacin Enhance Antimicrobial Resistance and Pathogenicity of Enterococcus faecium. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e02763-16. [[CrossRef](#)]
52. Cardon, T.; Hervé, F.; Delcourt, V.; Roucou, X.; Salzet, M.; Franck, J.; Fournier, I. Optimized Sample Preparation Workflow for Improved Identification of Ghost Proteins. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 1122–1129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Delloye-Bourgeois, C.; Bertin, L.; Thoinet, K.; Jarrosson, L.; Kindbeiter, K.; Buffet, T.; Tauszig-Delamasure, S.; Bozon, M.; Marabelle, A.; Combaret, V.; et al. Microenvironment-Driven Shift of Cohesion/Detachment Balance within Tumors Induces a Switch toward Metastasis in Neuroblastoma. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 427–443.e8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Bringuier, P.-P.; Schalken, J.A.; Hervieu, V.; Giroldi, L.A. Involvement of orphan nuclear receptor COUP-TFII in cadherin-6 and cadherin-11 regulation: Implications in development and cancer. *Mech. Dev.* **2015**, *136*, 64–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Supplementary material and methods

Generation of cultured human epidermal sheets

Normal human epidermal keratinocytes were isolated from human breast skin. Keratinocytes were grown on a feeder layer of irradiated human fibroblasts pre-seeded at 4000 cells/cm² in keratinocyte culture medium (KCM) containing a mix of 3:1 DMEM and HAM's F12 (Invitrogen, Carlsbad, USA), supplemented with 10% FCS, 10ng/ml epidermal growth factor (EGF; R&D systems, Minneapolis, MN, USA), 0.12 IU/ml insulin (Lilly, Saint-Cloud, France), 0.4 mg/ml hydrocortisone (UpJohn, St Quentin en Yvelines, France), 5 mg/ml triiodo-L-thyronine (Sigma, St Quentin Fallavier, France), 24.3 mg/ml adenine (Sigma), isoproterenol (Isuprel, Hospira France, Meudon, France) and antibiotics (20 mg/ml gentamicin (Phanpharma, Fougères, France), 100 IU/ml penicillin (Phanpharma), and 1 mg/ml amphotericin B (Phanpharma)). The medium was changed every two days. NHEK were then cultured over a period of 13 days according to the protocol currently used at the Bank of Tissues and Cells for the generation of clinical grade epidermal sheets used for the treatment of severe extended burns (Ref). When needed, cells were harvested with trypsin-EDTA 0.05% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and collected for analysis.

Clonogenic assay

Keratinocytes were seeded on a feeder layer of irradiated fibroblasts, at a clonal density of 10-20 cells/cm² and cultivated for 10 to 14 days. Three flasks per tested condition were fixed and colored in a single 30 mns step using rhodamine B (Sigma) diluted at 0.01 g/ml in 4% paraformaldehyde. In each tested condition, cells from 3 other flasks were numerated after detachment by trypsin treatment.

RNA-seq analyses

Epidermal cell sheets were generated by culturing for 12 days human keratinocytes as described above, in 6-well plates. Epidermal cell sheets were then treated or not for 24h with 0.25 mM NaHS then lysed using a RLT lysis buffer (Qiagen, Hilden, Germany) and conserved at -80°C until use. The whole RNA-seq procedure from RNA extraction to alignments of reads, data normalization, principal component analysis and identification of differentially-expressed mRNA species was performed by the Lyon-1 university genomics platform ProfileXpert and using the HiSeq 2500 platform (Illumina, 50 pb single read). To identify differentially-expressed genes, a paired student's *t*-test was performed and adjusted *p*-values were then calculated using the Benjamini-Hochberg procedure.

Proteomics Analysis

Epidermal cell sheets were generated by culturing for 12 days human keratinocytes as described above, in 175 cm² culture flasks. Epidermal cell sheets were then treated or not with 0.25 mM NaHS for 24h, washed two times with PBS and mechanically detached using a cell scraper. The retrieved cell suspension was centrifuged and cell pellets were conserved at -80°C until further analysis. The whole proteomics analysis from protein extraction to analysis by mass spectrometry and bioinformatics identification and quantification of proteins was performed by the University of Lille and INSERM U1192 laboratory "PRISM" (Proteomics Inflammatory response Mass Spectrometry) and using the LC-MS (liquid chromatography – mass spectrometry) apparatus Q-Exactive Orbitrap from Thermo Fisher Scientific. To identify differentially-expressed proteins, a paired student's *t*-test was performed, and adjusted *p*-values were then calculated using the Benjamini-Hochberg procedure.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) protocol

Epidermal cell sheets were generated by culturing for 12 days human keratinocytes as described above, in 6-well plates. Epidermal cell sheets were then treated or not for 24h with different concentrations of NaHS. Cell supernatants were harvested and the following human cytokines were measured using ELISA kits according to the manufacturer's instructions: IL-8 (KAC1301, Biosource, Nivelles, Belgium), VEGF (DVE00, R&D systems, Minneapolis, USA), CXCL2 (ab184862, Abcam, Cambridge, MA, USA), GDF15 (EHGDF15, Thermo Fisher Scientific, Frederick, MD, USA), IL-18 (ab215539, Abcam) and IL-1 β (KHC0011, Invitrogen). Alternatively, ELISA was performed on cell extracts for the measure of SOD2 (ab178012, Abcam). In any case, samples were run in duplicate.

Western blot analysis

Epidermal cell sheets were generated by culturing for 12 days human keratinocytes as described above, in 24-well plates. Epidermal cell sheets were then treated or not for 24h with different concentrations of NaHS, washed once with PBS 1X and lysed with Laemmli lysis buffer. Protein concentration was determined using the Qubit Protein

Article n°1: Molecular Mapping of Hydrogen Sulfide Targets in Normal Human Keratinocytes

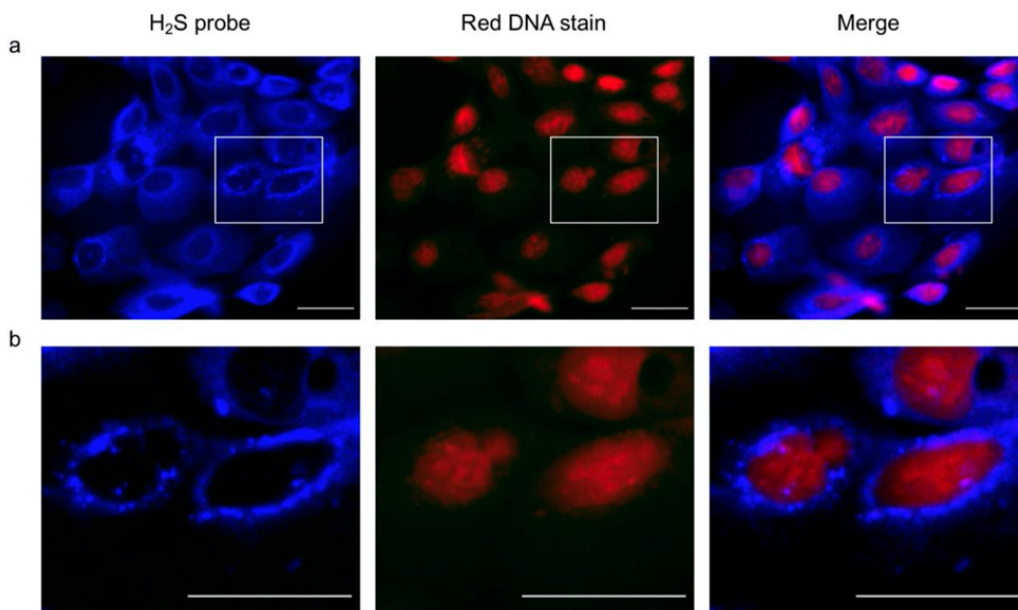
Assay Kit. Equal amounts of total protein (40µg) from treated or untreated cells were analyzed by western blot analysis. Briefly, proteins were separated in 12-15% Tris-Glycine SDS-PAGE gels and transferred to a PVDF membrane. The following primary antibodies were then applied overnight at 4°C: human proIL-1β (1:500, MAB201, Clone # 8516, R&D systems) or β-actin (1:2000, sc-47778, Clone C4, Santa Cruz Biotechnology) as a loading control. Membranes were then washed once in PBS 1X and incubated for 45 mns with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgGs (Jackson immunoresearch, Milan Analytica, La Roche, Switzerland). Finally, blots were developed using the chemiluminescent detection reagent ECL (Covalight) and exposed to X-ray films

Cell viability

Cultured human epidermal sheets treated or not with different NaHS concentrations (0.0025 – 0.025 – 0.25 – 2 – 4 mM) for 24h were trypsinized with trypsin-EDTA 0.05% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and stained with trypan blue in order to count living cells. The % of viability corresponds to the calculated ratio of unstained cells vs total cells. In another set of experiments, a MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was performed. Briefly, keratinocytes were seeded at a concentration of 8 000 cells/cm² in 96-well plates, on a on a feeder layer of irradiated human fibroblasts. At confluence, cells were treated or not with different concentrations of NaHS (0.0025 – 0.025 – 0.05 – 0.125 – 0.25 – 2 – 4 mM) for 24h. Absorbance measures at 565 nm were then recorded and the % of viability was calculated for each condition as the ratio of the mean absorbance observed for the treated over the mean absorbance observed for negative controls (untreated cells). Cultured keratinocytes deriving from 3 distinct donors were tested and triplicate experiments were performed for each tested condition.

Supplementary data

Figure S1. NaHS induces the intracytoplasmic accumulation of H₂S in keratinocyte. To ensure that H₂S accumulated in the cytoplasm of cultured keratinocytes following 0.25 mM NaHS stimulation, cells were sequentially incubated with an H₂S fluorescent probe and the far-red fluorescent nuclear dye NUCLEAR-ID (Enzo life Sciences, Farmingdale, NY, USA). In the lower panels (b) are shown high magnification views of the areas delineated by white line squares in the upper panels (a). Scale bar: 0.03 mm



Article n°1: Molecular Mapping of Hydrogen Sulfide Targets in Normal Human Keratinocytes

Figure S2. Representative flow cytometry data obtained on dissociated cells derived from cultured human epithelial cell sheets (Kera) vs irradiated fibroblasts (Fibros) used as a feeder layer for epidermal cell sheets. Cells derived from epidermal cell sheets exhibit a CD49^{high}/CD90^{low} phenotype whereas irradiated fibroblasts exhibit a CD90^{high}/CD49^{low} phenotype.

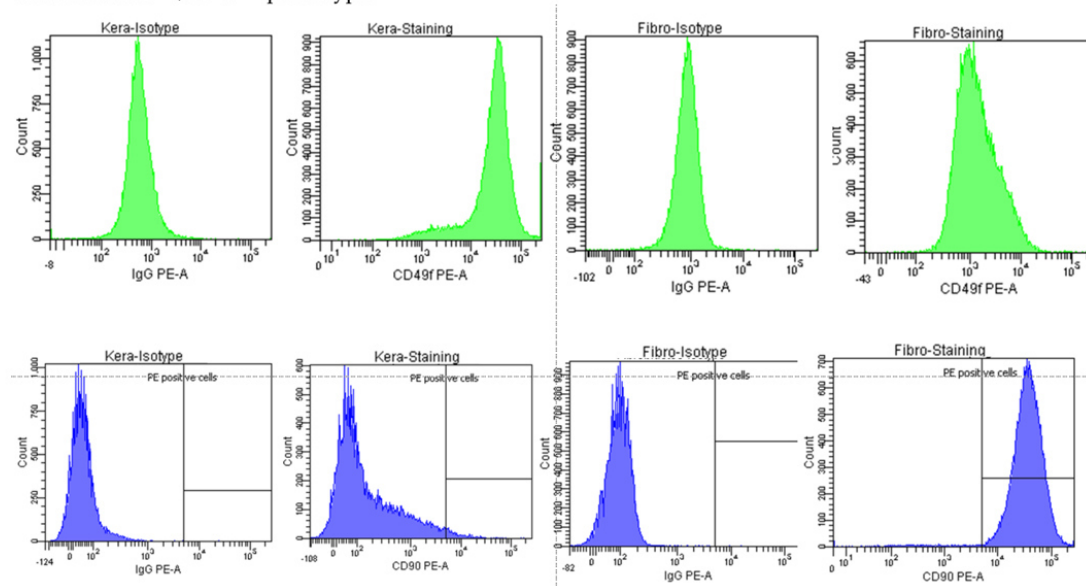
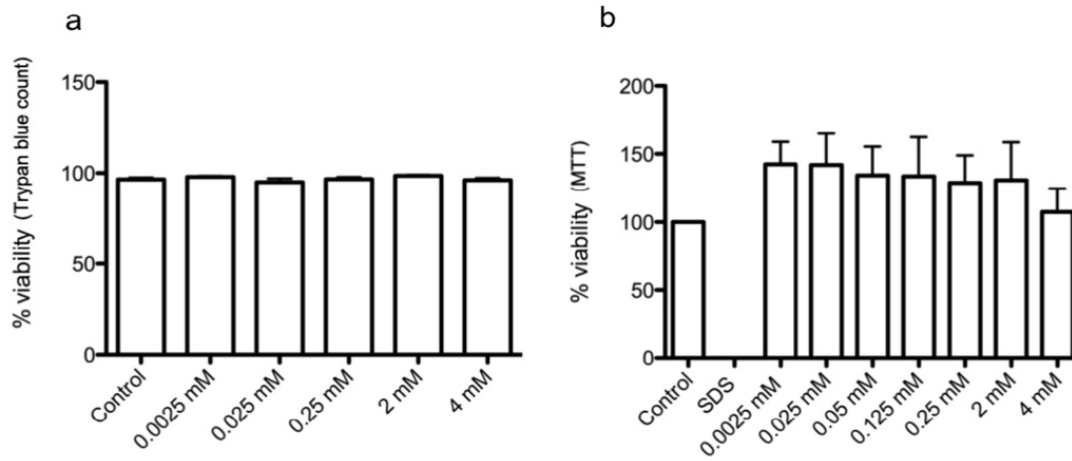


Table S1. Mean percentages of CD49^{high}, CD90^{high} and HMB45⁺ cells observed from the analysis of dissociated epidermal cell sheets (n = 44)

| Mean % of CD49 ^{high} cells (flow cytometry) | Mean % of CD90 ^{high} cells (flow cytometry) | Mean % of HMB45 ⁺ cells (immunohistochemistry) |
|--|--|--|
| 97.7 ± 2.2% | 3.56 ± 2.8% | 0% |

Article n°1: Molecular Mapping of Hydrogen Sulfide Targets in Normal Human Keratinocytes

Figure S3. Impact of NaHS on the cell viability of cultured human keratinocytes. Human epidermal cell sheets were cultured under control conditions or stimulated with NaHS at concentrations ranging from 0.0025 to 4 mM for 24h. Cells were then harvested and viability was measured after Trypan blue staining (a) (experiments performed on cells derived from 6 distinct donors) or by MTT assay (b) (experiments performed on cells derived from 3 distinct donors).

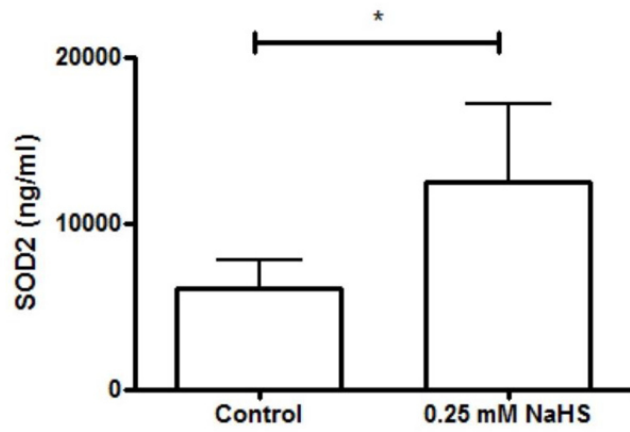


Article n°1: Molecular Mapping of Hydrogen Sulfide Targets in Normal Human Keratinocytes

Table S2. List of proteins detected by liquid chromatography/mass spectrometry as being modulated by NaHS in human epidermal cell sheets

| Protein symbol | Protein name | P-value |
|--------------------------------|---|---------|
| Up-regulated proteins | | |
| <i>FAM129B</i> | Family with sequence similarity 129, member B | 0.0133 |
| <i>RAB2A</i> | Ras-related protein Rab-2A | 0.0272 |
| <i>HNRNPU</i> | Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U | 0.0395 |
| <i>SND1</i> | Staphylococcal Nuclease And Tudor Domain Containing 1 | 0.0399 |
| <i>SOD2</i> | Superoxide Dismutase 2 | 0.0474 |
| Down-regulated proteins | | |
| <i>SEC22B</i> | SEC22 Homolog B, Vesicle Trafficking Protein | 0.0160 |
| <i>MT-CO2</i> | Mitochondrially Encoded Cytochrome C Oxidase I | 0.0184 |
| <i>ALDOA</i> | Aldolase, Fructose-Bisphosphate A | 0.0331 |
| <i>S100A14</i> | S100 Calcium Binding Protein A14 | 0.0405 |
| <i>LAD1</i> | Ladinin 1 | 0.0487 |

Figure S4. NaHS stimulates the synthesis of SOD2 by human epidermal cell sheets. Human epidermal cell sheets were cultured under control conditions or were stimulated for 24h with 0.25 mM NaHS. Cells were then harvested and SOD2 was measured by ELISA on protein extracts. Experiments were performed on epidermal cell sheets obtained from 6 distinct donors. Results are expressed as percentages relative to control conditions. Statistical significance of paired comparisons was assessed with the Wilcoxon test. *: $p < 0.05$.



Article n°1: Molecular Mapping of Hydrogen Sulfide Targets in Normal Human Keratinocytes

Table S3. List of genes targeted by hydrogen sulfide-containing compounds according to the CTD database (only protein-coding genes were retained)

| Gene symbol | | | | | | | |
|-------------|--------|---------|---------|----------|---------|----------|-----------|
| AADAC | BRD4 | CTGF | FN1 | HTR1A | MGMT | PON2 | SREBF1 |
| ABCB1 | BTF3 | CTH | FOS | HTR1B | MIR143 | PON3 | SREBF2 |
| ABCC1 | BTG1 | CTNNB1 | FOXO3 | HTR3A | MIR145 | PPARA | SRSF1 |
| ABCC2 | CALR | CTSB | FOXP3 | HTR7 | MIR200B | PPARB | STK25 |
| ABCC3 | CAMKK2 | CUL1 | FOXQ1 | HYOU1 | MIR200C | PPARG | STX2 |
| ABCC4 | CAPN1 | CUL3 | FSHB | IFITM1 | MIR21 | PPARGC1A | SV2B |
| ABCC6 | CAPN2 | CXCL2 | FTH1 | IFNA1 | MIR221 | PPP1R12A | TAGLN2 |
| ABCF1 | CAPZA1 | CXCL8 | FTL | IFNGR1 | MMP2 | PRAM1 | TERT |
| ABL1 | CASP1 | CXCR4 | FTMT | IFNGR2 | MMP7 | PRCP | TGFB1 |
| ACHE | CASP12 | CYGB | FUBP1 | IFT57 | MMP9 | PRDM2 | TGFB3 |
| ACOX1 | CASP3 | CYP19A1 | G6PC | IGFBP4 | MPV17 | PRDX3 | TGFBR2 |
| ACTA2 | CASP4 | CYP1A1 | G6PD | IKKB | MSRA | PROC | TIMP1 |
| ACTB | CASP7 | CYP1A2 | GADD45A | IL10 | MTOR | PSMA1 | TIMP2 |
| ACTG1 | CASP8 | CYP1B1 | GAPDH | IL1A | MYC | PSMC2 | TLR10 |
| ADORA2A | CASP9 | CYP2A6 | GCK | IL1B | MYD88 | PSMD1 | TLR3 |
| ADRB1 | CAST | CYP2B1 | GCLC | IL1R2 | MYH7 | PTAFR | TLR4 |
| AGT | CAT | CYP2B10 | GDF15 | IL1RAP | NAGLU | PTGS1 | TLR6 |
| AIFM2 | CAV1 | CYP2B15 | GGT1 | IL1RAPL2 | NDRG1 | PTGS2 | TNF |
| AK2 | CBL | CYP2B2 | GJA1 | IL1RL2 | NEFH | PTK2 | TNFAIP3 |
| AKR1A1 | CBS | CYP2B6 | GLRX2 | IL1RN | NEFL | PTP4A3 | TNFAIP8 |
| AKR7A3 | CCL2 | CYP2C19 | GLUL | IL2 | NEFM | PTPRC | TNFRSF10B |
| AKT1 | CCL3 | CYP2C9 | GPT | IL2RA | NFE2L2 | RARA | TNFRSF1A |
| ALDH1 | CCNA2 | CYP2D6 | GRB2 | IL37 | NFKB2 | RARB | TNFRSF1B |
| ALDH1A1 | CCNB1 | CYP2E1 | GRIN1 | IL4 | NFKBIA | RB1 | TNFSF10 |
| ALDH1A7 | CCND1 | CYP3A11 | GRIN2A | IL6 | NLRC4 | RBMX | TOLLIP |
| ALDH2 | CCND3 | CYP3A18 | GSK3B | INA | NOS1 | RBP1 | TP53 |
| ALDH8A1 | CCNG2 | CYP3A2 | GSN | IRAK1 | NOS2 | RELA | TPT1 |
| ALDOC | CCR3 | CYP3A23 | GSR | IRAK2 | NOS3 | RGN | TRAF6 |
| ALOX5 | CCS | CYP3A4 | GSS | IRF1 | NOTCH1 | RGS2 | TREM1 |
| ALPL | CD14 | CYP4A1 | GSTA1 | ITGA4 | NOX4 | ROCK1 | TRIB3 |
| AMH | CD55 | CYP4A14 | GSTA2 | ITGA5 | NPPA | ROCK2 | TRPA1 |
| ANXA1 | CDC25C | CYP51 | GSTA3 | ITGAM | NPPB | RPL13A | TUBB |
| AOX1 | CDH1 | CYP7A1 | GSTA4 | ITGAV | NQO1 | RPL17 | TWIST1 |
| APAF1 | CDH5 | DACH1 | GSTA5 | ITGB1 | NR1I3 | RPS27A | TXNIP |
| APOA1 | CDK1 | DDHD2 | GSTM1 | ITGB3 | NUCB1 | RPS6KB1 | TXNRD1 |
| AQP4 | CDK2 | DDT | GSTM2 | ITGB4 | ODC1 | RPTOR | TXNRD2 |
| AQP9 | CDK4 | DDX3Y | GSTM3 | JUN | OGDH | RTN1 | UBA7 |
| AQR | CDKN1A | DEDD2 | GSTM4 | KCNA5 | OGT | S100A11 | UCHL1 |
| AR | CDKN1B | DES | GSTP1 | KCND3 | OXR1 | SELL | UCP1 |
| ARHGDB | CEBPA | DFFA | GSTT1 | KCNH2 | OXS1 | SERPINA1 | UGT1A1 |

Article n°1: Molecular Mapping of Hydrogen Sulfide Targets in Normal Human Keratinocytes

| | | | | | | | |
|----------|---------|----------|-----------|----------|---------|----------|---------|
| ARHGEF18 | CEBPB | DHCR24 | GSTZ1 | KEAP1 | P4HB | SERPINE1 | UGT1A6 |
| ATF3 | CEBPE | DIABLO | GULO | KIF3A | PARP1 | SERPINH1 | UGT1A9 |
| ATF4 | CES1F | DNAJC27 | HDAC1 | KIT | PCBP1 | SET | UGT2A3 |
| ATF6 | CES2A | DYNLRB1 | HES1 | KRT10 | PCNA | SHC1 | UGT2B35 |
| ATG13 | CFL1 | EDN1 | HEY1 | KRT8 | PDHB | SIRT1 | UGT2B36 |
| ATG14 | CFLAR | EGFR | HEY2 | KYAT1 | PDIA3 | SIRT3 | UGT2B4 |
| ATG3 | CHEK1 | EIF1AY | HIF1A | LAMP1 | PDIA4 | SKP1A | UGT3A1 |
| ATG7 | CHMP5 | EIF2AK3 | HIPK1 | LDHA | PDYN | SLC1A2 | UGT3A2 |
| ATOX1 | CHUK | EIF4E | HIST1H1C | LPA | PENK | SLC2A3P1 | ULK1 |
| ATP5PD | CLDN1 | EIF4EBP1 | HIST1H2BM | MAP1LC3A | PEX5 | SLC38A2 | USP5 |
| BAD | CLDN11 | EIF4H | HMGB1 | MAP2K4 | PGK1 | SLC3A1 | UVRAG |
| BAK1 | CLDN2 | ENO1 | HMGCR | MAP2K7 | PGLYRP3 | SLC3A2 | VCAM1 |
| BAX | CLDN3 | EPHX1 | HMOX1 | MAP3K3 | PGM1 | SLC6A4 | VDAC1 |
| BBC3 | CLDN4 | EVL | HNF4A | MAP3K5 | PIK3R1 | SLC7A11 | VDAC2 |
| BCL2 | CLDN5 | F2RL1 | HNRNPA2B1 | MAPK1 | PIM1 | SLC7A9 | VEGFA |
| BCL2L1 | COG3 | FA2H | HNRNPC | MAPK14 | PKIA | SLCO1A1 | VIM |
| BCR | COLEC12 | FADD | HNRNPDL | MAPK3 | PLAUR | SNAI1 | XBP1 |
| BDNF | COX17 | FAS | HNRNPH1 | MAPK8 | PLIN2 | SNX17 | XIAP |
| BID | CP | FASLG | HOMER3 | MB | PLIN3 | SOD1 | XPA |
| BIRC2 | CPT2 | FASN | HSPA5 | MCL1 | PML | SOD2 | XRCC5 |
| BIRC3 | CREB1 | FBXO16 | HSPA8 | MDM2 | POLD1 | SORD | XRCC6 |
| BIRC5 | CRYL1 | FBXW4P1 | HSPA9 | MDM4 | POMC | SORL1 | ZFYVE16 |
| BMI1 | CSTB | FMO1 | HSPD1 | MERTK | PON1 | SQSTM1 | ZKSCAN5 |

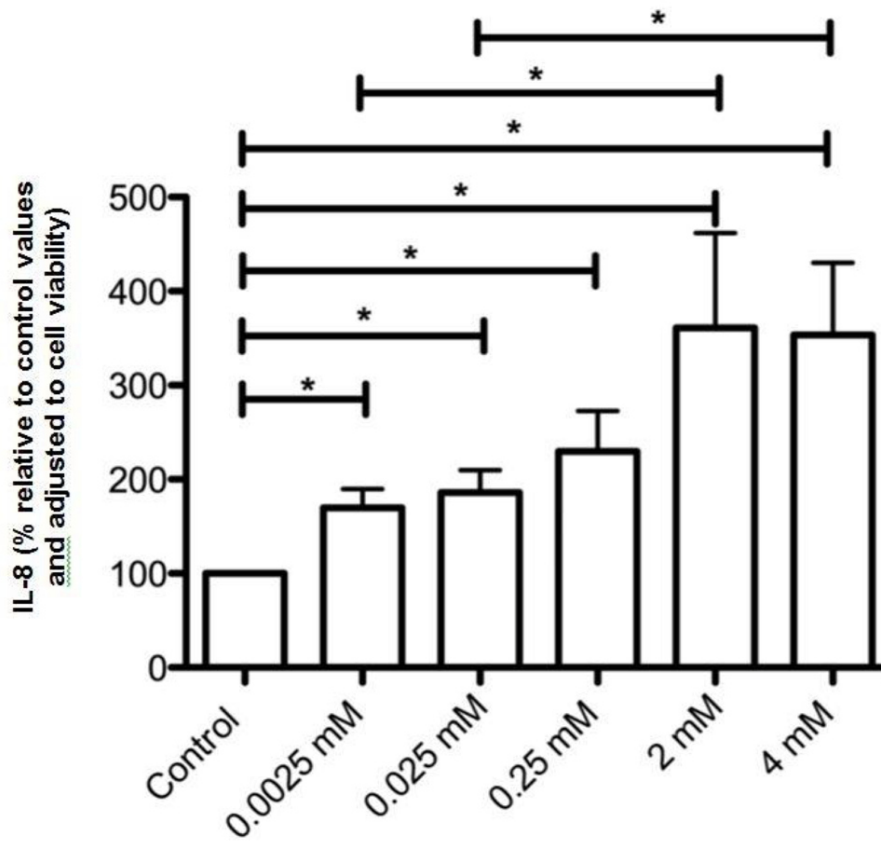
Article n°1: Molecular Mapping of Hydrogen Sulfide Targets in Normal Human Keratinocytes

Table S4. List of genes displaying significant differential expression in NaHS-treated vs control epidermal cell sheets

| Gene symbol | | | | | | | |
|----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|---------|
| Up-regulated genes | | | | | | | |
| ABHD12 | CANX | FAM122B | LPP | NDUFA12 | PPIEL | SEPT2 | USP1 |
| ABLIM2 | CASP1 | FARP2 | LPPR2 | NDUFAF4 | PPP1R2P3 | SHMT1 | VPS45 |
| ADRM1 | CAST | FBXL4 | MARVELD2 | NGDN | PPP2R5E | SLC35F3 | WDR31 |
| AFAP1L2 | CCDC34 | FGFR1OP | MASTL | NOL8 | PRC1 | SLC3A2 | WFS1 |
| AKR1B10 | CCDC41 | FLJ44635 | MCPH1 | NOP58 | PRTFDC1 | SLC6A14 | WNK1 |
| AKR1C1 | CCDC88A | GALC | MECR | NQO1 | PSEN2 | SLC6A15 | WNT5A |
| ANAPC11 | COL4A3BP | GDF15 | MEF2D | NSA2 | PSMB2 | SMAD1 | ZNF3 |
| ARMCX6 | COL6A3 | GORASP1 | MELK | NSUN2 | PTPLA | SPINT1 | ZNF473 |
| ARPC3 | CTSC | GPATCH11 | METTL12 | NUCB2 | QTRTD1 | SPRR2A | ZNF527 |
| ATP5J | CUL3 | GTF3C5 | METTL21D | PCID2 | RAB23 | SYT14 | ZNF778 |
| BCAT2 | CXCL2 | HHAT | MPZL1 | PITPNM3 | RABL2B | TAF9B | |
| BCCIP | DAAM1 | HNRNPA1 | MROH1 | POLG | RIF1 | TLE3 | |
| BCL2L13 | DPH3 | KIN | MSLN | POMT1 | RIT1 | TLK1 | |
| BLM | DSTYK | KYNU | MTIF2 | PPFIBP2 | SCAI | TOM1 | |
| C18orf25 | DYRK4 | LACTB | NCOA7 | PPHLN1 | SCP2 | UBE2G2 | |
| C7orf49 | ERLEC1 | LNPEP | NCOR2 | PPHLN1 | SEC11A | UGT1A6 | |
| Down-regulated genes | | | | | | | |
| ABCB7 | CA9 | ECSIT | GORASP1 | MEF2D | PPP1R3C | RUNX1 | SUCO |
| ABTB1 | CACNG4 | EFEMP2 | HOMER3 | MGST1 | PPP6R2 | SCP2 | SYNCRIP |
| ACADS | CAMKK2 | ENC1 | HOTAIRM1 | MPDU1 | PRICKLE1 | SDHAP3 | TCIRG1 |
| AKIRIN1 | CBY1 | ENO2 | IGSF8 | MXD3 | PRKCZ | SLC11A2 | TGIF1 |
| ANKRD37 | CCDC41 | FAM122B | IRF7 | MYO19 | PRODH | SLC16A3 | TLE3 |
| APOBEC3B | CCDC88A | FBXL4 | KLK8 | NDRG4 | PRRX2 | SLC6A11 | TMC8 |
| ARHGAP24 | CDK5RAP1 | FBXW7 | KRT79 | NDUFA4L2 | PRTFDC1 | SMPD1 | TMEM217 |
| BAMBI | CEPT1 | FGFR1OP | LGALS1 | NR1H3 | PTK2 | SMYD3 | TRIM65 |
| BARD1 | CIRBP | FHIT | LIMA1 | NR2C1 | PTPN13 | SNORA48 | UBE2G2 |
| BCL2L11 | CPQ | FKRP | LOXL4 | NTAN1 | PTPRB | SPATA20 | VTCN1 |
| BNIP1 | CSRNP2 | FLG | LTBP3 | OIP5 | RABGAP1L | SPG20 | WFS1 |
| BTD | DAZAP1 | FXYD5 | LYNX1 | PFKP | RAD51C | SPG7 | WWC1 |
| BTG2 | DAZAP1 | FZD8 | LYPLA1 | PITPNM3 | RARB | SPINT1 | YPEL5 |
| C14orf159 | DCAF17 | GABRP | LYSMD4 | PLCG1 | RASGRP3 | ST20 | YWHAZ |
| C16orf13 | DCAF6 | GALC | MAPK7 | PMS2 | RCAN3 | ST3GAL4 | ZBTB43 |
| C18orf56 | DCAF8 | GGA1 | MASTL | POLG | REPIN1 | STOML1 | ZNF345 |
| C19orf52 | DEGS2 | GIPC1 | MDH1 | PPHLN1 | RIMS3 | STX4 | ZNF542 |
| C5orf56 | DLG1 | GLIS2 | MED8 | PPP1R13L | RTN2 | STXBP2 | |

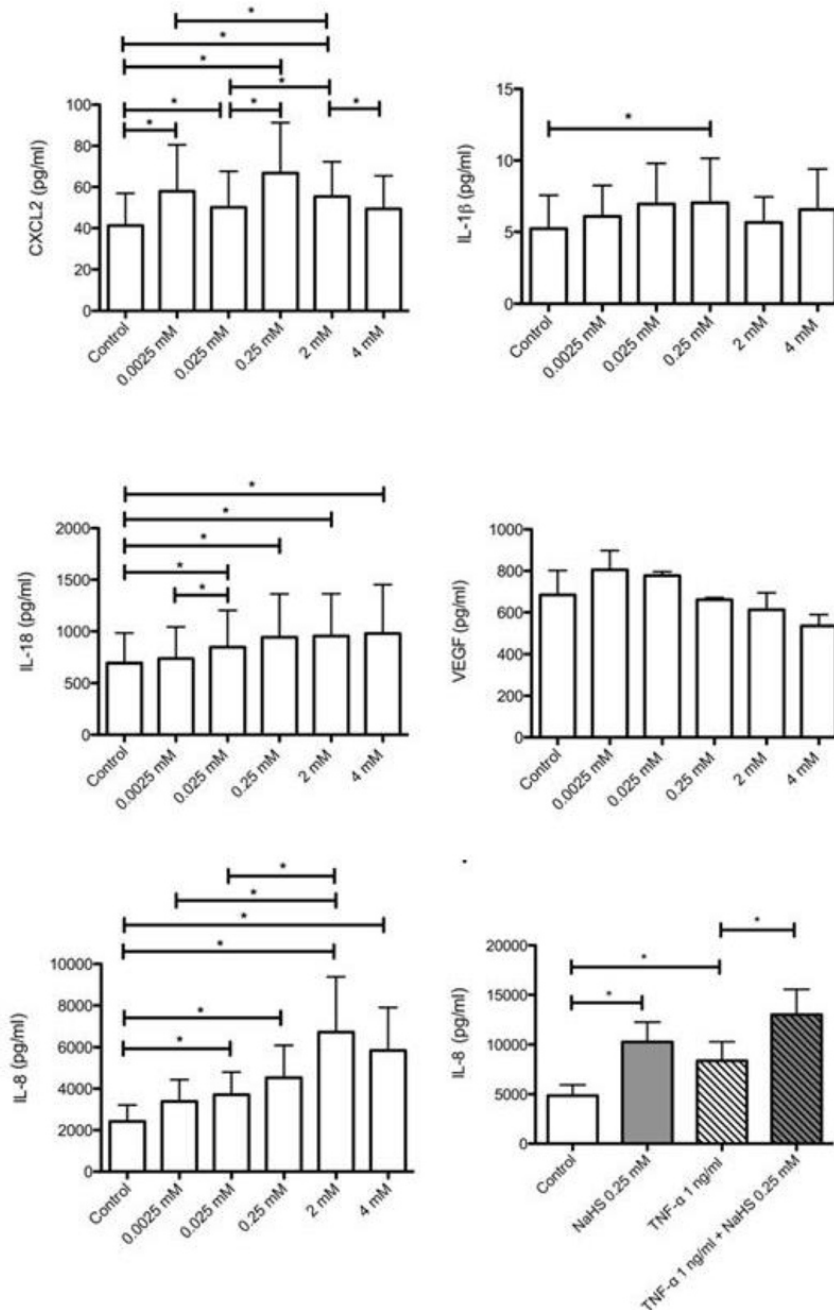
Article n°1: Molecular Mapping of Hydrogen Sulfide Targets in Normal Human Keratinocytes

Figure S5. NaHS stimulates the synthesis of IL-8 by human epidermal cell sheets. Human epidermal cell sheets were cultured under control conditions or stimulated with NaHS at concentrations ranging from 0.0025 mM to 4 mM. After 24h after stimulation, supernatants were harvested and cells were trypsinized in order to count viable cells. IL-8 was measured by ELISA on culture supernatants. Experiments were performed on epidermal cell sheets obtained from at least 5 distinct donors. Results are expressed as percentages relative to control conditions and adjusted to the number of viable cells. Statistical significance of paired comparisons was assessed with the Wilcoxon test. *: $p < 0.05$.



Article n°1: Molecular Mapping of Hydrogen Sulfide Targets in Normal Human Keratinocytes

Figure S6. NaHS treatment modifies the cytokine/chemokine secretion profile of human epidermal cell sheets. Human epidermal cell sheets were cultured under control conditions or stimulated with NaHS at 0.0025, 0.025, 0.25, 2, or 4mM. In some experiments (lower right panel), cells were stimulated with NaHS (0.25 mM) and/or TNF- α (1 ng/ml). Cell supernatants were then recovered 24h after stimulation and the cytokines CXCL2, IL-1 β , IL-18, VEGF and IL-8 were measured by ELISA. Data are expressed in pg/ml. Experiments were performed on epidermal cell sheets obtained from at least 5 distinct donors. Statistical significance of paired comparisons was assessed with the Wilcoxon test. *: p < 0.05.



2. Mise en place d'un modèle *ex vivo* de brûlure du 2^{ème} degré sur explant de peau humaine

Notre objectif était ensuite d'évaluer l'impact de l'H₂S dans un modèle plus complexe que les cellules *in vitro* cultivées en 2D. A cet effet, nous avons mis au point un nouveau modèle *ex vivo* de brûlure du 2^{ème} degré sur culture d'explant de peau humaine. En utilisant un modèle *ex vivo*, on retrouve ainsi une structure 3D complexe avec la majorité des composants moléculaires et types cellulaires présents dans la peau. Pour tester l'activité de l'H₂S, il nous fallait choisir un vecteur permettant l'application topique de NaHS et nous avons opté pour un hydrogel de poloxamères thermosensible. L'avantage d'un tel gel est la possibilité de la manipuler en solution à température ambiante, ce qui permet d'incorporer facilement le NaHS au gel qui ne se solidifiera qu'à des températures supérieures à 30°C.

Lors de la mise en place d'un nouveau modèle *ex vivo* de brûlure sur explant de peau humaine, nous nous sommes attachés à respecter 2 contraintes qui nous paraissaient très importantes pour mimer au plus près la physiopathologie de la brûlure et de sa cicatrisation : i) la culture à l'interface air/liquide, ii) la mise en tension de la peau. Nous avons dans un premier temps vérifié la viabilité de la peau en culture puis caractérisé le modèle de brûlure en analysant la cinétique de : i) la réépithélialisation, ii) la prolifération des kératinocytes, iii) la réparation de la jonction dermo-épidermique, iv) le remodelage tissulaire du derme. Après avoir déterminé qu'une brûlure de 10s entraînait une brûlure du 2^{ème} degré, nous avons observé une réépithélialisation spontanée de l'épiderme par les kératinocytes en bordure de plaie, une reformation de la JDE et une synthèse de procollagène III. Nous avons évalué l'application de l'hydrogel de poloxamères sur la brûlure afin de vérifier son impact sans ajout d'actif et valider ainsi le modèle. L'hydrogel de poloxamères n'a pas empêché la fermeture de la plaie bien qu'entraînant un retard de réépithélialisation.



Article

Characterization of a Topically Testable Model of Burn Injury on Human Skin Explants

Olivia Gross-Amat ^{1,2,3,*} , Marine Guillen ^{1,2}, Damien Salmon ⁴, Serge Nataf ^{1,2,3,†} and Céline Auxenfans ^{2,5,†}

¹ Lyon-Est School of Medicine, University Claude Bernard Lyon-1, 69100 Villeurbanne, France; marine.guillen@univ-lyon1.fr (M.G.); serge.nataf@inserm.fr (S.N.)

² Bank of Tissues and Cells, Lyon University Hospital (Hospices Civils de Lyon), 69003 Lyon, France; celine.auxenfans@chu-lyon.fr

³ CarMeN Laboratory, INSERM U1060, INRA U1397, INSA de Lyon, 69600 Oullins, France

⁴ Fundamental, Clinical and Therapeutic Aspects of Skin Barrier Function, EA4169, University of Lyon 1, 69008 Lyon, France; salmondam@hotmail.fr

⁵ Tissue Biology and Therapeutic Engineering Laboratory, UMR 5305, 69007 Lyon, France

* Correspondence: olivia.gross.amat@free.fr

† These authors contributed equally to the paper.

Received: 1 September 2020; Accepted: 16 September 2020; Published: 22 September 2020



Abstract: Severe burn injuries remain a major health problem due to high rates of mortality, residual morbidity, and/or aesthetic damages. To find new therapies aimed at promoting a harmonious healing of skin burns, it is important to develop models which take into account the unique properties of the human skin. Based on previously described models of burn injury performed on human skin explants, we hypothesized that maintaining explants under constant tension forces would allow to more closely reproduce the pathophysiological processes of skin remodeling. We thus. Here, we set up and characterized an improved model of deep second-degree burn injury on ex vivo cultured human skin explants at air-liquid interface and maintained under conditions of constant tension forces. A spontaneous re-epithelialization of the lesion was observed 8 to 9 days post burn and was found to rely on the proliferation of basal keratinocytes at the wound edges. Collagen VII at the dermo-epidermal junction reformed along with the progression of re-epithelialization and a synthesis of procollagen III was observed in the dermis at the wound site. These findings indicate that our model is suitable for the assessment of clinically-relevant therapies aimed at modulating the kinetics of re-epithelialization and/or the activation of fibroblasts following skin burn injuries. In this regard, we evaluated the use of a thermoreversible poloxamer hydrogel as a vehicle for topically-testable therapeutic molecules. Our data showed that, although useful for drug formulation, the p407/p188 poloxamer hydrogel induces a delay of skin re-epithelialization in humans skin explants submitted to experimental burn injury.

Keywords: burn; human skin; ex vivo; wound healing; poloxamer hydrogel

1. Introduction

Burns, irrespective of their severity level, are one of the most common causes of accidental injuries worldwide [1–4]. In first-degree burns, only the superficial layers of the epidermis are affected, allowing tissue repair via the mobilization of the keratinocyte stem cells and progenitors residing in the basal layer [5]. As a result, first-degree burns heal spontaneously without scar formation and do not require any treatment other than a topical moisturizer [6]. In contrast, third-degree burns do not heal spontaneously and require surgical intervention to cover wounds (autografts, allografts, epidermal

sheets) [5,7]. Although current treatments have greatly increased the survival rate of patients suffering from extended third-degree burns [8], it is estimated that burns cause 180,000 deaths per year according to a recent report of the World Health Organization. In addition to being potentially fatal, severe skin burns may result in long-term functional and/or aesthetic complications [9], notably when the healing process is hampered by secondary infections and abnormal tissue remodeling. [3]. Finally, superficial partial-thickness (superficial second-degree) burns spontaneously heal within a time period of 7 to 14 days post-burn, as there are still mitotically active stem cells in the basal layer. On the other hand, deep second-degree burns destroy the entire epidermis, including the cells of the basal layer, and result in the formation of a scar. Delayed complications may occur during the healing process of deep second-degree burns requiring then the use of surgical treatments [6,7]. Currently, the most commonly used treatment for second-degree burns worldwide consists of the topical application of 1% silver sulfadiazine. However, despite the effectiveness and ease of use of such a topical treatment, side effects of silver sulfadiazine have been reported such as hyperpigmentation, delayed wound closure, and neutropenia [10,11]. It is, thus, essential to improve the management and treatment of second-degree burns and to generate a reliable and standardized model performed on human cells. Indeed, while a number of potential molecular targets have been identified in animal models of deep second-degree burns, the clinical translatability of such findings needs to be confirmed by ex vivo or in vivo human models. In particular, it is now well established that the human skin exhibits unique features in terms of histological structure and ability to heal via re-epithelialization rather than skin contraction as observed in rodents [12–14]. The skin of pigs harbors similarities with the human skin; however, issues linked to ethics, reproducibility, and cost [15] render difficult the setting up and use of burn models performed in pigs. Alternatively, human skin explants have been successfully used to mimic some aspects of skin burn injuries [12,16–18]. However, to our knowledge, such experimental models did not take into account the impact of tension forces on skin remodeling. In this context, our objective was to develop and characterize an improved model of second-degree burn injury performed on ex vivo cultured human skin explants cultured at air-liquid interface and maintained under constant tension forces. On this model, we performed a kinetics analysis of (i) re-epithelialization, (ii) keratinocyte proliferation, (iii) repair of the dermo-epidermal junctions, and (iv) tissue remodeling of the underlying dermis. Importantly, we tested the use of a thermoreversible poloxamer hydrogel as vehicle for the future evaluation of topically applied drugs aimed at treating second-degree burns. We discuss the advantages and possible drawbacks of our model as compared to previously published experimental models of second-degree burns.

2. Results

2.1. Histological Characterization of Ex Vivo Cultured Human Skin Explants

In order to optimize our protocol of ex vivo cultured skin explants grown at the air-liquid interface, we compared two different culture media (Figure 1) with regard to the general skin histological structure. To this aim, hematoxylin phloxine saffron (HPS) staining was performed on skin explants on days 0, 7, 14, and 21 after culture initiation. When comparing results obtained with medium A (a standard culture medium) vs. medium B (a culture medium routinely used for three-dimensional (3D) cultures of human skin cells) (see detailed composition in Section 4), we observed that, at late time points (days 14 and 21), the epidermis tended to detach from the underlying dermis in skin explants cultured in medium B. Although medium B was a priori more suited to our experimental settings, we opted for medium A. Under these experimental conditions, the histological structure of skin explants remained overall unchanged. However, a decrease of 40% in nucleated epidermal cells could be demonstrated on day 14 (data not shown). On the other hand, the thickness of the stratum corneum, a skin layer exclusively formed by non-nucleated cells, increased progressively from day 0 to day 14, a process likely due to the lack of mechanical friction forces exerted on skin explants. In order to evaluate the dynamics of epidermal cells renewal in cultured skin explants, Ki67, an antigen present on a

protein expressed at the time of proliferation, localized to the chromosomes in mitosis [19], commonly used as a marker of proliferation, was evaluated at different time points following culture initiation (Figure 2a). As expected, the observed decrease in nucleated epidermal cells in cultured skin explants was accompanied by a parallel decrease in keratinocyte proliferation index (Figure 2a). While skin explants on day 0 contained on average 6% proliferating keratinocytes, there were still 4% proliferating keratinocytes on day 5, but this percentage dropped to 1–2% on days 9 and 14 (Figure 2b).

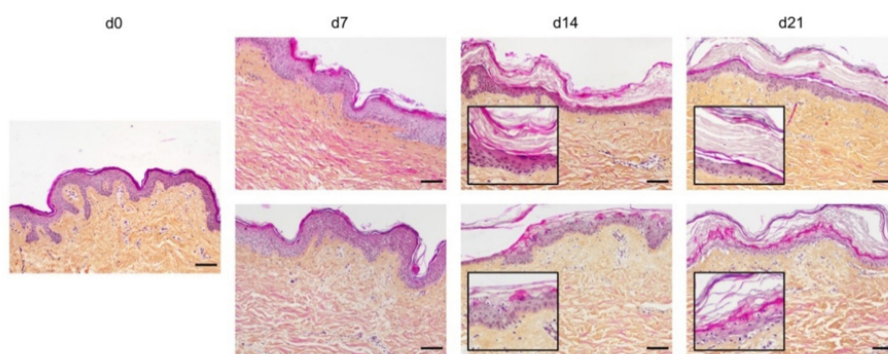


Figure 1. Assessment of culture media impact on ex vivo cultured human skin explants. Hematoxylin phloxine saffron (HPS) staining was performed on human skin explants harvested at different time points of the culture. Results obtained with two distinct culture media were compared: medium A (standard culture medium; upper panels) and medium B (medium used for three-dimensional (3D) cultures of skin cells; lower panels). From day 14 onward, skin explants cultured in medium B exhibited a detachment of the epidermis (bottom panels—days 14 and 21). Results obtained for each condition are representative of three series of experiments performed on skin explants derived from three donors. Scale bar: 100 μ m.

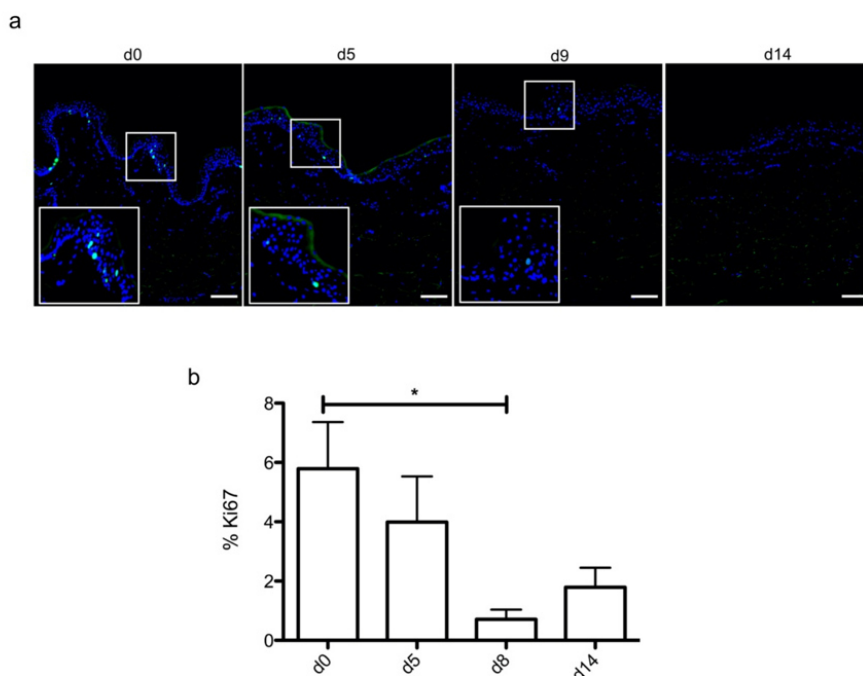


Figure 2. Demonstration of a persisting proliferating potential in the basal keratinocytes of cultured human skin explants. (a) Immunostaining of the proliferation marker Ki67 was performed on human

skin explants harvested at different time points of the culture. Ki67⁺ keratinocytes were observed in the basal layer in freshly isolated skin explants (day 0) and were still detectable on day 5 following culture initiation. Only a few Ki67⁺ cells remained detectable in the basal layer of skin explants from day 9 onward. (b) The proliferation index of keratinocytes (ratio of proliferating cells relative to the total number of epidermal cells) was measured in human skin explants harvested at different time points of the culture. For each donor ($n = 3$) and for each time point, measurements were carried out on three distinct areas and expressed as mean values. Statistical significance was assessed with the paired t -test. *: $p < 0.05$. Scale bar: 100 μm .

2.2. Setting up of an Experimental Model of a Deep Second-Degree Burn Injury on Ex Vivo Cultured Human Skin Explants

A metal rod heated to 100 °C was applied for different time periods (1 s, 5 s, and 10 s) on ex vivo cultured human skin explants (Figure 3). HPS staining was then performed on burnt areas at 10 min post burn, and on days 7, 14, and 21. We observed that a 1 s long application impacted only the superficial epidermal layers without damaging the basal layer (days 0 and 7) and was followed by a full re-epithelialization (day 14), which corresponds to a model of first-degree burn. In contrast, a 5 s or 10 s long application of the heated metal rod induced lesions of the whole epidermis layers as assessed by HPS staining. More specifically, we found that, 10 min after experimental burns were performed, epidermal cells were vacuolized throughout all epidermal layers and the epidermis was detached from the dermis. On day 7, following the debridement step performed on day 1, the burnt area was devoid of epidermis, which corresponds to the histological features of a deep second-degree burn. Following either 5 s or 10 s long experimental burns, the epidermis was fully re-epithelialized on day 14 post burn. This re-epithelialized epidermis comprised all the epidermal layers up to the stratum corneum (Figure 3). Since burns of longer durations are more likely to also impact the dermis, we chose to further assess our model under conditions of 10 s long experimental burns.

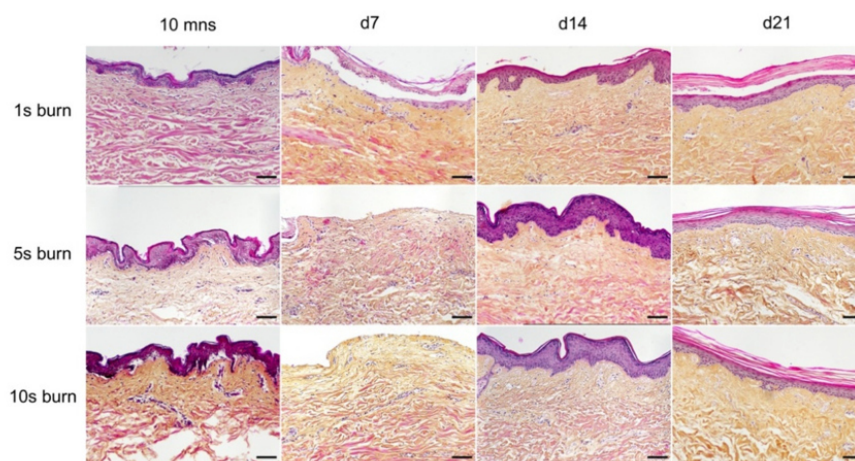


Figure 3. Assessment of burn duration impact on epidermal integrity in ex vivo cultured human skin explants. Hematoxylin phloxine saffron (HPS) staining was performed on human skin explants harvested at different time points post burn (10 min and days 7, 14, and 21). Burns were generated with a metal rod heated to 100 °C and applied for 1 s (upper panels), 5 s (middle panels) or 10 s (bottom panels). A 1 s burn impacted only the superficial layers of the epidermis, whereas 5 s and 10 s burns induced alterations of the whole epidermis. Under the three conditions tested, the burnt area was fully re-epithelialized on day 14. Images were taken in the center of the burn. Results obtained for each condition are representative of three series of experiments performed on skin explants derived from three donors. Scale bar: 100 μm .

2.3. Kinetics of Re-Epithelialization in Human Skin Explants Subjected to Experimental Deep-Second Degree Burn Injury

To investigate the kinetics of re-epithelialization in our model of experimental burn injury, serial histological analyses were performed on lesioned skin explant samples obtained from three distinct donors. The extent of re-epithelialization was assessed on days 0, 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, and 14 post burn by HPS staining. Slight interindividual differences were observed regarding the time point from which re-epithelialization initiates (day 8 for two donors, day 9 for one donor). Numeration of Ki67⁺ proliferating keratinocytes was obtained on days 0, 5, 8, 9, and 14. However, the same series of events took place in the burnt area, as exemplified in Figure 4: (i) proliferating keratinocytes formed a monolayer of cells on a restricted area localized on the edges of the lesion (re-epithelialization, day 1); (ii) the whole lesioned area was then progressively colonized by a monolayer of proliferating keratinocytes (re-epithelialization, days 2–4); (iii) the epidermis progressively thickened from the edges to the center of lesions, leading eventually to the formation of a stratum corneum layer (re-epithelialization, day 6). Of note, before re-epithelialization of the injured skin initiated, the percentage of proliferating keratinocytes increased on day 5 post burn in the non-lesioned areas adjacent to the lesion edges (Figure 4c). Interestingly, when a hair follicle could be observed in such adjacent non-lesioned areas, we could also demonstrate the presence of Ki67 proliferating cells which appeared to form a migratory stream from hair follicles toward the lesion edges (Figure 4d). Initiation of re-epithelialization was paralleled by a marked increase in keratinocyte proliferation index which reached 56% at the wound margins (Figure 4b,c). Such an index then decreased over time along with the progression of re-epithelialization from the edges to center of lesions and in parallel with the progressive thickening of the epidermis. Thus, on day 14 post burn, the keratinocyte proliferation index reached similar levels (10%) to that observed in non-lesioned skin explants on day 0 of the culture protocol (6%).

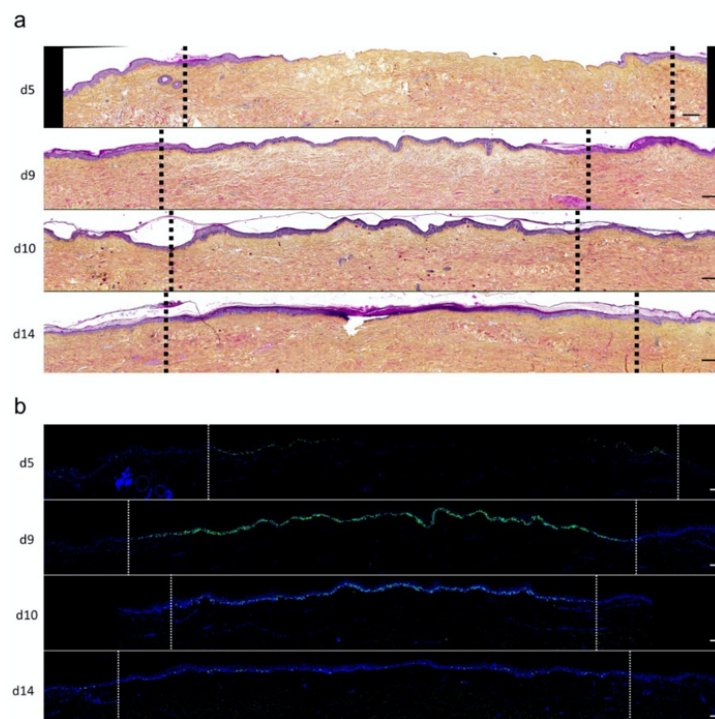


Figure 4. Cont.

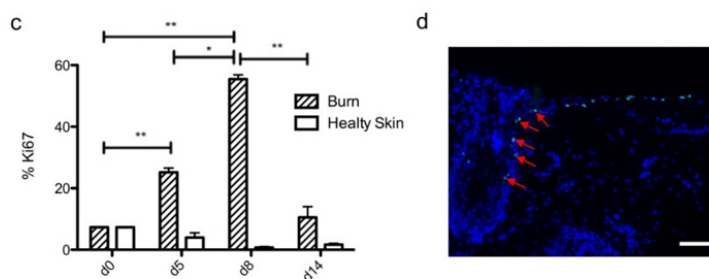


Figure 4. Kinetics of re-epithelialization from day 8 onward in ex vivo cultured human skin explants submitted to 10 s long experimental burn injury. Following a 10 s long experimental burn performed on ex vivo cultured human skin explants, the kinetics of re-epithelialization was assessed by HPS staining (a) and immunostaining of the proliferation marker Ki67 (b–d). (a) Wound closure was operated by proliferating keratinocytes which migrated from the wound edges and then formed an epidermal tongue on d5, before covering the whole lesioned area on day 8. A complete differentiation of the epidermis up to the formation of the superficial layers, including the stratum corneum, was then observed on day 14. (b,c) The keratinocyte proliferation index (ratio of proliferating Ki67⁺ cells relative to the total number of epidermal cells) was measured in human skin explants harvested at different time points of the culture. For each donor ($n = 3$) and for each time point, measurements were carried out on both edges of the lesion and expressed as mean values. On day 5 post burn, proliferating basal keratinocytes were only observed in the epidermal tongue, close to the wound margins. In this area, the keratinocyte proliferation index more than doubled as compared to the proliferation index observed in day 0 (control) skin explants (c). A peak in keratinocyte proliferation index was observed on day 8/9 with 55% of proliferating cells in the edges of the re-epithelialized lesion. Interestingly, several layers of Ki67⁺ epidermal cells were observed at this stage. Finally, on day 14 post burn, the keratinocyte index reached a mean of 10%, close to that observed in the epidermis of day 0 (control) skin explants (6%). (d) Demonstration of proliferating cells within the dermis in close vicinity to a hair follicle at the edge of the lesioned area (red arrows). Dashed lines in black (a) or white (b) delineate the burnt area from the adjacent non-lesioned skin areas. Statistical significance was assessed with the paired *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Scale bar: 100 μm .

2.4. Kinetics of Dermal Remodeling in Human Skin Explants Subjected to Experimental Deep Second-Degree Burn Injury

In order to quantitatively and qualitatively assess dermal remodeling in our experimental model of deep second-degree burn injury, we performed serial immunostainings of collagen I, collagen III, procollagen III, and α -smooth muscle actin (α SMA), a marker of myofibroblasts, on skin explants on days 0, 5, 8, 10, and 14 post burn. While the levels and expression patterns of collagen I, collagen III, and α SMA appeared unchanged at the different time points studied (Figure S1, Supplementary Materials), we observed a marked decrease in procollagen III staining intensity starting on day 8 in the dermis underlying the burnt epidermal area (Figure 5). Although less pronounced, such a decreased staining intensity was still observed on day 10 post burn. On day 14, procollagen III staining intensity returned to basal levels and was comparable to day 0 staining. It should be noticed that, on day 5 post burn, we repeatedly found that human leukocyte antigen (HLA) class II positive cells appeared to accumulate in the wound margins in both the epidermis and dermis (Figure S2, Supplementary Materials). This observation, which may reflect a nonspecific activation of immune or nonimmune cells in particular blood vessels (Figure S2, Supplementary Materials), indicates that human skin explants are endowed with a certain level of immunocompetence, which may prove to be of interest in future studies.

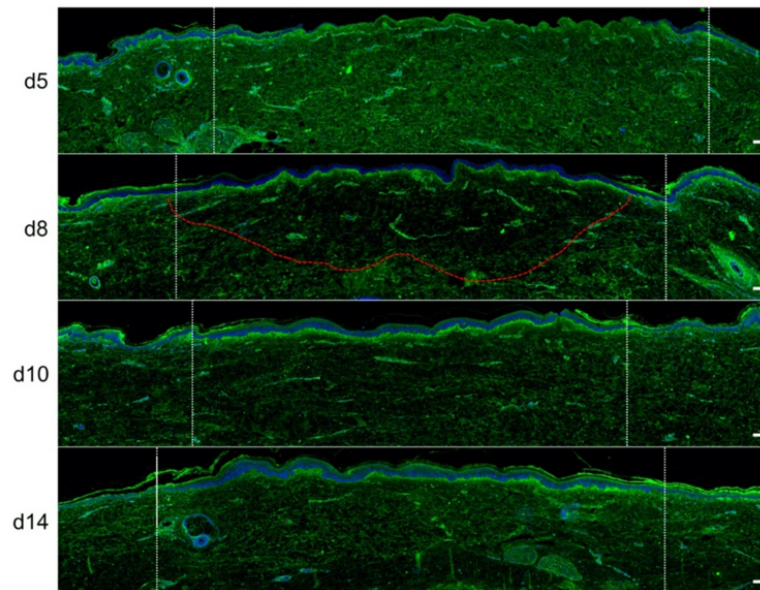


Figure 5. Kinetics of procollagen III synthesis in ex vivo cultured human skin explants submitted to 10 s long experimental injury. Immunostaining of procollagen III was performed on human skin explants harvested at different time points post burn (days 5, 8, 10, and 14). No significant change was observed on day 5. On day 8, a decreased intensity in procollagen III staining (area delimited by a red dotted line) was observed in the dermal area adjacent to the burnt epidermis. On day 10, this decrease in procollagen III staining intensity was less pronounced but still present until it returned to baseline levels on day 14. Experiments were performed on skin explants derived from three donors. White dashed lines delineate the burnt area. Scale bar: 100 μm .

2.5. Kinetics of Dermo-Epidermal Junction (DEJ) Restoration in Human Skin Explants Subjected to Experimental Deep Second-Degree Burn Injury

To assess the kinetics of DEJ regeneration in our model of experimental deep second-degree burn injury, a staining of collagen VII was carried out on days 5, 8, 10, and 14 post burn (Figure 6). Interestingly, while no collagen VII staining remained present at the DEJ on day 5 post burn, the process of re-epithelialization was temporally associated with a progressive restoration of the DEJ. Such a process could be demonstrated at the DEJ of newly formed monolayers of keratinocytes, in the lesion edges. However, the intensity of collagen VII staining appeared to also parallel the progressive increase in epidermis thickness, which similarly started in the lesion edges before extending toward the center of the burnt area (Figure 6a,b).

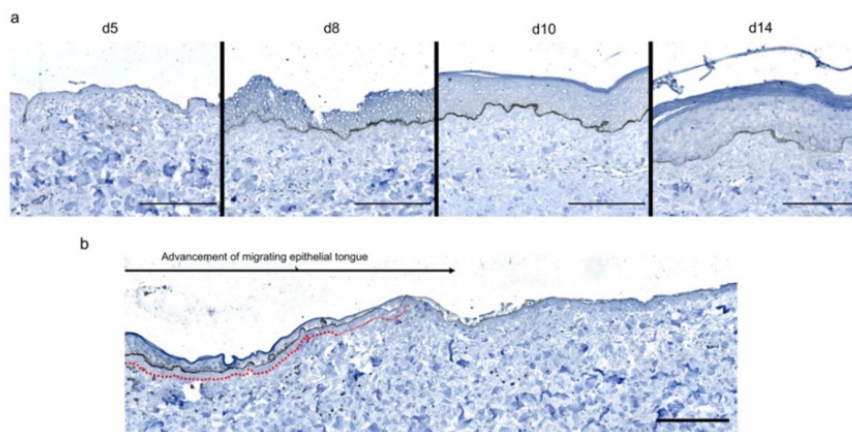


Figure 6. Kinetics of the dermo-epidermal junction (DEJ) repair in ex vivo cultured human skin explants submitted to 10 s long experimental burn injury. A 10 s burn was carried out on ex vivo cultured human skin explants and collagen VII immunostaining was performed on skin samples of the burn area harvested at different time points post burn (days 5, 8, 10, and 14). (a) In the center of the burnt area, no collagen VII remained detectable on day 5. However, in the same area, neosynthesized collagen VII was observed at the DEJ of the re-epithelialized epidermis on day 8 and onward. (b) In the wound margins, collagen VII staining was observed at the DEJ of the epidermal tongue formed by a few layers of cells. Experiments were performed on skin explants derived from three donors. Scale bar: 100 μm .

2.6. The Topical Application of a Poloxamer Hydrogel Delays but Does Not Prevent Tissue Repair in Human Skin Explants Subjected to Experimental Deep Second-Degree Burn Injury

We then sought to determine whether our experimental model could be suitable for the therapeutic assessment of topically applied regenerative compounds. To this goal, we assessed the impact of a poloxamer hydrogel which was previously shown to exhibit exploitable vehicle properties in the context of pharmacological tests [20–22]. Daily topical applications of such a poloxamer hydrogel were performed on areas of lesioned skin explants in our model of experimental second-degree burn injury. Serial HPS staining and immunolabeling of Ki67⁺ proliferating keratinocytes were then performed on skin explants on days 5, 8/9, 10, and 14 post burn (Figure 7b). Surprisingly, we constantly observed that initiation of re-epithelialization was delayed in hydrogel-treated skin explants as could be observed only on day 10 as compared to day 8 in untreated burnt explants (Figure 7a). However, a full re-epithelialization was achieved on day 14 in hydrogel-treated skin explants, indicating that, once re-epithelialization is initiated, tissue repair is otherwise unchanged by the topical application of a poloxamer hydrogel. Favoring this view, the proliferation index of keratinocytes in the lesioned area was delayed by roughly 2 days but followed a kinetics which was strictly similar to that observed in untreated skin explants submitted to experimental injury (Figure 7c). Thus, on day 5, 7% proliferating keratinocytes were observed at the edges of the gel-treated burn areas compared to 27% for untreated burns (Figure 7c). In the hydrogel-treated burn area, the percentage of proliferating cells reached 47% on day 8, which is similar to the proliferation index observed in untreated burnt explants (55%). On the other hand, on day 14, the hydrogel-treated burn still contained 33% proliferating keratinocytes compared to 10% in untreated burnt explants.

Topical treatment with poloxamer gel, thus, causes a delay in re-epithelialization and a delay in keratinocyte proliferation but does not prevent or qualitatively modify the process of epidermal tissue repair.

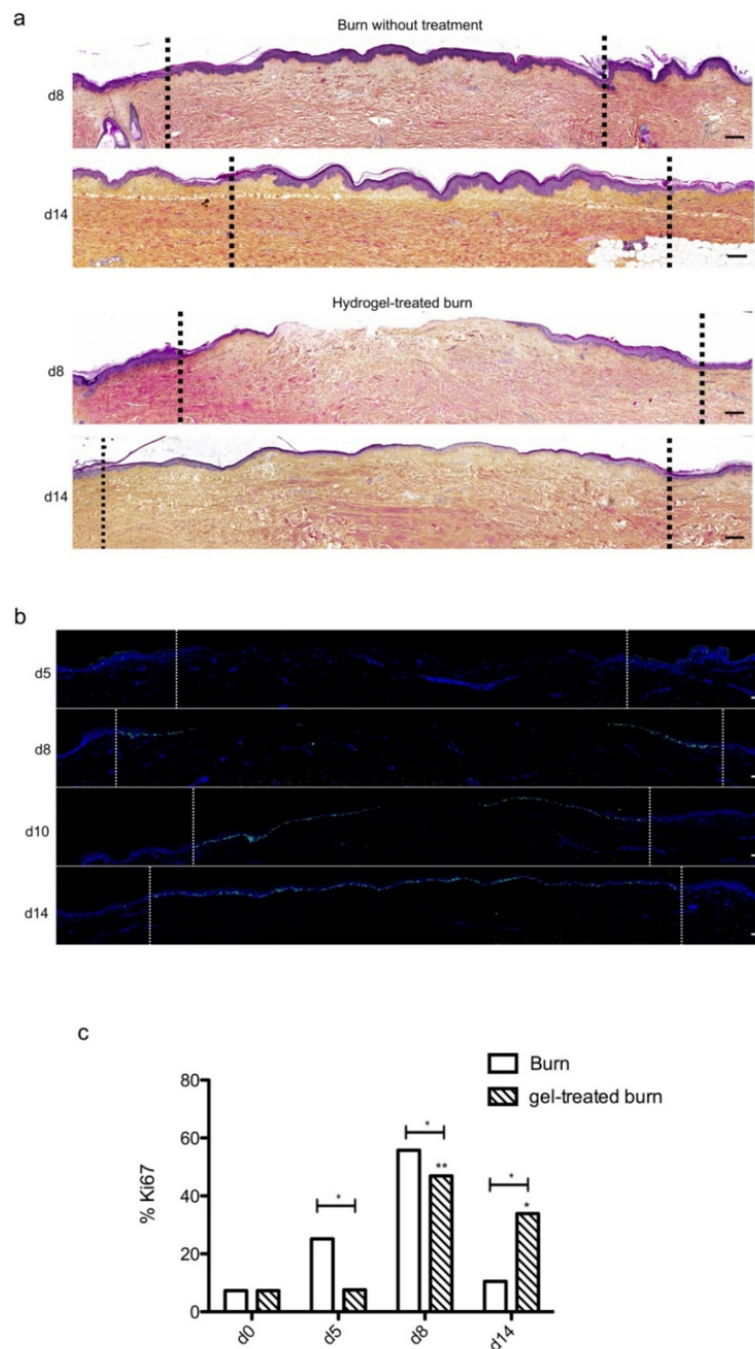


Figure 7. Kinetics of re-epithelialization in poloxamer hydrogel-treated ex vivo cultured human skin explants submitted to 10 s long experimental burn injury. A 10 s burn was carried out on ex vivo cultured human skin explants and, after wound debridement, on day 1, daily treatment with poloxamer p407/p188 hydrogel was applied. The impact of hydrogel applications on the healing process was assessed by (a) morphological analysis using HPS staining and (b) immunostaining of the proliferation marker Ki67. (a,b) On day 8 post burn, the hydrogel-treated lesion was not re-epithelialized, in contrast to the untreated lesion. The treated wound was re-epithelialized on day 14 but only 3–4 layers of keratinocytes

were observed in the central burnt area, indicating that re-epithelialization was delayed by hydrogel treatment. (c) The keratinocyte proliferation index (ratio of Ki67⁺ proliferating cells relative to the total number of epidermal cells) was measured in human skin explants harvested at different time points of the culture. For each donor ($n = 3$) and for each time point, measurements were carried out on both edges of the lesion and expressed as mean values. No increase in proliferation index was noticed on day 5 in gel-treated lesions in contrast to the untreated lesions. On day 8, the proliferation index was similar in both conditions (47% in gel-treated lesions vs. 55% in untreated lesions). On day 14, the proliferation index in gel-treated burns was higher as compared to untreated burns (33% in gel-treated lesions vs. 6% in untreated lesions). Dashed lines in black (a) or white (b) delineate the burnt area. Statistical significance was assessed with the paired *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Scale bar: 100 μm .

We also assessed the impact of poloxamer hydrogel on the dermal extracellular matrix remodeling and focused our analysis of the kinetics of procollagen III staining alterations (Figure 8). As observed with regard to re-epithelialization and keratinocyte proliferation index, we found that the synthesis of procollagen III followed a delayed kinetics of alterations in hydrogel-treated vs. untreated burnt explants. Such a delay may be estimated to reach 2 days and was responsible for obvious differences in terms of procollagen III staining intensities on day 10 post burn when comparing hydrogel-treated vs. untreated burnt explants. On day 14, however, the same amount of procollagen III was observed in the center of the burnt area irrespective of the application of a poloxamer hydrogel.

The poloxamer gel caused a delay in re-epithelialization, with a delay in keratinocyte proliferation and a delay in the production of procollagen III. However, the gel did not prevent re-epithelialization and complete healing of both the epidermis and the dermis to occur on day 14.

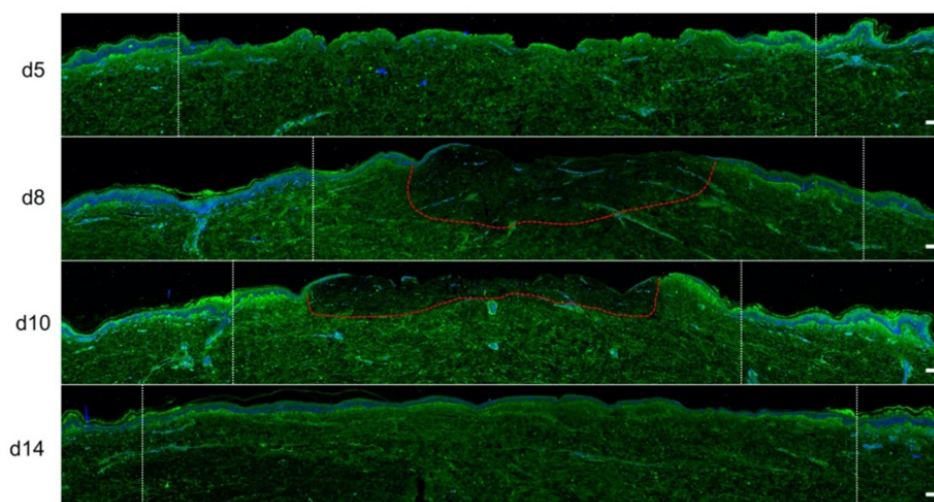


Figure 8. Kinetics of procollagen III synthesis in poloxamer hydrogel-treated ex vivo cultured human skin explants submitted to 10 s long experimental burn injury. Immunostaining of procollagen III was performed on gel-treated human skin explants harvested at different time points post burn (days 5, 8, 10, and 14). After wound debridement, on day 1, daily treatment with poloxamer p407/p188 hydrogel was applied. No significant change was observed on day 5 in the burn area compared to healthy skin. On day 8, a decreased intensity in procollagen III staining (area delimited by a red dotted line) was observed in the dermal area adjacent to the burnt epidermis. On day 10, this decrease in procollagen III staining intensity was less pronounced but still present until it returned to baseline levels on day 14. Experiments were performed on skin explants derived from three donors. White dashed lines delineate the burnt area. Scale bar: 100 μm .)

3. Discussion

Until now, only few published studies reported on the use of human skin explant to perform *ex vivo* models of deep second-degree burns [12,16,18,23]. The experimental protocol we elaborated differs from those previously described with regard to at least two parameters discussed below: (i) the larger size of skin explants, and (ii) the application of a tension force. Our model was indeed carried out on large skin explants of 16 cm² compared to an average of 1–2 cm² in similar models [12,16,23]. Such a larger size is an advantage as it allows comparisons between different experimental conditions (e.g., treated vs. control) skin explants deriving from the same donor and cultured under the same conditions. Culturing the explant at the air-liquid interface, a condition rarely achieved in burn models performed on skin explants [12], is also critical in order to reproduce the native conditions of the human skin. Finally, the application of a tension force on skin explants is also potentially important as it was proposed to condition the extent of dermal tissue remodeling in experimental models of burns [12]. Indeed, skin fibroblasts are endowed with biomechanical properties allowing to sense physical forces applied to the dermis to translate these into an adapted molecular behavior, notably with regard to the synthesis of extracellular matrix (ECM) proteins and the acquisition of an α -SMA⁺ myofibroblast phenotype. While we did not observe any increase in the density of α -SMA⁺ myofibroblasts during the course of our model, we demonstrated a decreased synthesis of procollagen III in the burnt dermis, which, to our knowledge, has not been reported in previous models of experimental burns performed on human skin explants. Such a decreased expression observed on day 8 was followed by a return to baseline levels on day 14, while the expression pattern of collagen I and III remained unchanged during the same period of time. It should be noted that, although burns alter the molecular composition of the dermal extracellular matrix, immune cells (e.g., macrophages) are required to eliminate deposits of altered ECM proteins [24]. In our model, the absence of blood circulation, which prevents a significant recruitment of immune cells in the injured area, may explain why collagen I and III immunostaining appeared unchanged. In contrast, the decreased intensity in procollagen III staining reflects an altered secretory behavior of fibroblasts, which is not linked to the scavenging of ECM proteins by macrophages.

Interestingly, the re-epithelialization process in our model appeared to follow a similar kinetics of events to that observed *in vivo* in acutely injured human skins [25]. Such events notably include keratinocyte proliferation occurring initially at the wound edges and allowing the formation of an epidermal tongue which progressively covers the entire lesioned area in approximately 8–9 days. Moreover, as reported *in vivo* [5], the regeneration of the dermo-epidermal junction follows the same kinetics of progression than the tongue of epidermal regeneration.

An interesting finding of our study was that keratinocyte stem cells and progenitors robustly proliferated up to at least 14 days post burn. In contrast, keratinocyte proliferation was relatively low in control skin explants and tended to decrease over time in our culture conditions. This decrease in proliferative cells in the control skin could be due to the absence of friction. Indeed, it was previously shown that subtle alterations of the stratum corneum, similar to the physiological alterations induced *in vivo* by friction forces, are able to stimulate the proliferation of basal keratinocytes in 3D models of cultured skin cells [26]. The molecular mechanisms involved in the regulation of keratinocyte proliferation in 3D models of epidermal or whole-skin cultures are not fully understood. Trophic factors are possibly missing in our culture system. This holds true notably for blood-derived trophic factors such as transforming growth factor (TGF)- β 1, epidermal growth factor (EGF), and platelet-derived growth factor (PDGF) secreted notably by the platelets during the healing process [27–30]. In the absence of fibroblasts, the weakening of the stratum corneum triggers a stimulation of cultured keratinocytes aimed at restoring the cutaneous barrier [26]. Thus, keratinocytes of cultured human skin explants maintain their proliferative potential; however, in the absence of a stimulus applied to the stratum corneum, they no longer proliferate. In any case, our results confirm previous studies pointing to the drawbacks of models using long-term *ex vivo* cultures of human skin explants [31,32]. It appears that maintaining such skin explants beyond 14 days of culture may induce experimental

biases. This point is all the more important when studies rely on wound models requiring extended periods of culture. As compared to the excisional wound model described by Xu et al., we found that re-epithelialization following experimental burn on human skin explants is slower (8–9 days versus 6 days in the excisional wound model model). Nevertheless, our model still allows studying under unbiased conditions the early stages of burn healing, including re-epithelialization, EDJ repair, and procollagen III synthesis.

An important aim of our study was to determine whether our experimental model of second-degree burn was suitable for the therapeutic assessment of topically applied candidate molecules. A major issue in this context was first to validate the usability of a vehicle as a drug-delivery system to test healing drugs. Such a vehicle had to harbor at least two important features: (i) a gel-type texture allowing a prolonged contact of the tested therapeutic molecule with burnt skin area, and (ii) a previously demonstrated lack of local and general toxicity. We opted for a poloxamer p407/p188 hydrogel exhibiting several interesting physical properties. First, the poloxamer hydrogel p407/p188, as with other poloxamer hydrogel mixes, has the advantage of being thermoreversible. The hydrogel is a low-viscosity solution at room temperature and solidifies into a gel at temperatures >30 °C. This gelification is due to an aggregation of molecules in micelles [21,33]. This property makes the poloxamer hydrogel ideal for topical application as it may be easily handled in liquid solution and gels once applied to the skin, being thus maintained on the treated area. Currently, poloxamer hydrogel alone is not used in the treatment of burns. It is studied only as a vehicle for active ingredients. Of note, several studies demonstrated local tolerance to p407 poloxamer hydrogel when tested on the skin, including the burnt skin [22,34]. Moreover, a number of studies used a poloxamer hydrogel as a vehicle for bioactive molecules aimed at promoting skin healing [21,34–38]. These various studies highlighted the value of using a poloxamer hydrogel as a delivery system for an active ingredient. As an example, a poloxamer hydrogel allows the transcutaneous delivery of morphine, the analgesic effects of which were observed up to 24 h after application [35]. Furthermore, a hyaluronic-acid- and chitosan-containing p407 poloxamer hydrogel was successfully used for the topical application of vitamins (A, D and E) in a mouse burn model [34]. However, it should be noted that, in the abovementioned works, the impact of poloxamer hydrogel alone was not assessed. Indeed, to our knowledge, only one study tested the potential toxicity of p407 poloxamer hydrogel on skin cells [38], more specifically, the fibroblastic murine cell line NIH 3T3. In this regard, we present the first in-depth analysis of the impact exerted by p407/p188 poloxamer hydrogel on the healing process of cultured human skin explants. To our surprise, we found that p407/p188 poloxamer hydrogel delayed by several days the re-epithelialization of the burnt area. Nevertheless, the re-epithelialization process was completed before day 14 demonstrating the usability of this hydrogel in our model of second-degree burn. How p407/p188 poloxamer hydrogel impacts re-epithelialization remains to be established. A possible explanation could be that the accessibility of oxygen to the superficial skin layers of skin explants is somehow altered by the hydrogel and cannot be balanced by blood-borne sources of oxygen. Another possibility could be that poloxamer hydrogel induces local modifications of the tension forces and/or other physical parameters which are instructing the proliferation of keratinocytes in human skin explants. In any case, we show that, when testing bioactive hydrogels in our model of burn injury, a control condition consisting of the application of the hydrogel alone is indispensable for a reliable interpretation of results. The major interest of poloxamer hydrogel is its thermosensitivity, which allows easy use with a simple solubility of the active principle in order to test its impact. Future studies will be aimed at testing candidate healing molecules in our model, notably new molecules harboring more efficient antimicrobial and trophic properties than silver sulfadiazine, the currently most frequently used topical treatment for second-degree burns [10,11]. Finally, it should be noticed that beyond the therapeutic evaluation of topically-applied molecules, our model may be used for the assessment of strategies based on the graft of cells (for e.g., mesenchymal stem cells or keratinocytes) [39,40] of tissue (for e.g., epidermal cell sheets or 3D reconstructed skin) [41–43].

4. Materials and Methods

4.1. Ethical Statement

Skin samples were anonymized, and informed consent was obtained in accordance with the ethical guidelines from Lyon University Hospital (Hospices Civils de Lyon) and the principles of the Declaration of Helsinki. All the samples used in this study belong to a collection of human skin samples declared to the French research ministry (Declaration no. DC-2008-162 delivered to the Bank of Tissues and Cells of the Hospices Civils de Lyon).

4.2. Skin Explant and Burn Procedure

All skin explants were obtained from residual tissues generated from elective abdominoplasties. The workflow of our experimental procedures is depicted in Figure 9, and a step-by-step description is provided below.

1. Subcutaneous fat was carefully removed with a sterilized scalpel. Skin samples were cleansed with 70% ethanol, washed two times for 15 min in phosphate-buffered solution (PBS), and then soaked in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with antibiotics (100 mg/mL gentamicin (Panpharma, Fougères, France), 400 IU/mL penicillin (Panpharma), and 4 mg/mL amphotericin B (Panpharma)) overnight at 4 °C.
2. Skin explants were cut into small pieces of hexagonal shapes with sides measuring 2.5 cm. A sterilized blotting paper pattern of the desired size was used to allow a regular and reproducible cut.
3. Sutures were performed on each corner of the shape in order to mount skin explants on metal grids and to prevent the occurrence of retractions.
4. Grids were placed in Petri dishes (100 × 20 mm) containing medium, and explants were cultured in the liquid–air interface.
5. Burns were performed with a 5 mm diameter metal rod which was immersed in a bath of hot water heated to 100 °C. The heated metal rod was applied for 1, 5, or 10 s on skin explants. Several burns were performed on each explant so that comparisons between time points and/or culture conditions could be performed on skin explants derived from the same donor (Figure 10). The debridement of skin lesions was performed on day 1 post burn with a sterile compress.

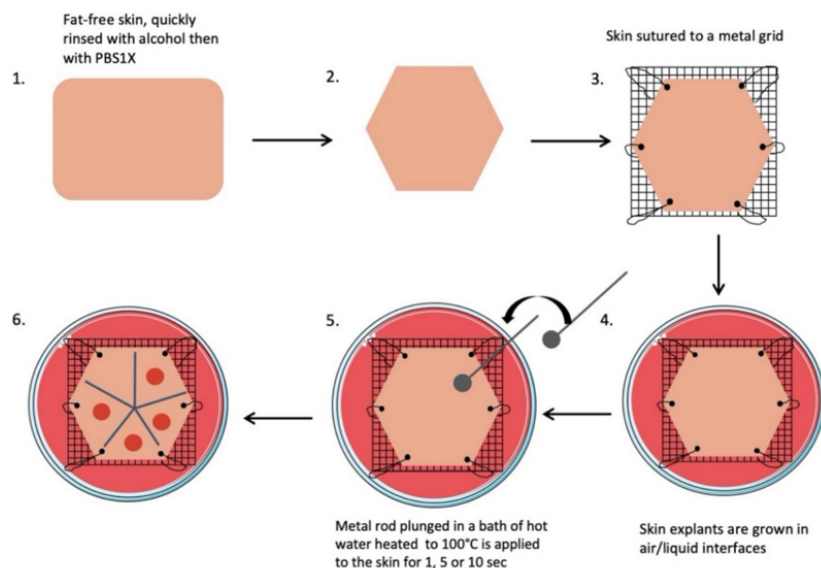


Figure 9. Scheme of the burn procedure on human skin explant model.

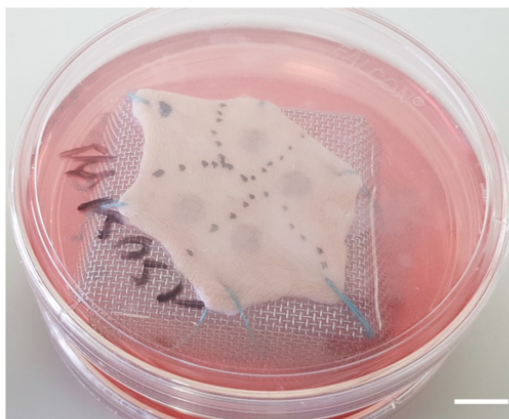


Figure 10. Picture of a human skin explant 12 h after experimental burn, before skin debridement (scale bar: 1 cm).

Two different media were tested: (i) medium A is routinely used for the culture of a large range of human cells and is composed of DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics (20 mg/mL gentamicin (Phanpharma), 100 IU/mL penicillin (Phanpharma), and 1 mg/mL amphotericin B (Phanpharma)); (ii) medium B, used otherwise in our laboratory for the *in vitro* 3D culture of reconstituted human skins, is composed of DMEM supplemented with 8 mg/mL bovine serum albumin (Sigma, St Quentin Fallavier, France), 0.12 IU/mL insulin, 0.4 µg/mL hydrocortisone, and antibiotics. In both cases, culture media were replaced every other day.

4.3. Hydrogel Treatment

A poloxamer hydrogel was used as to test the feasibility of performing topical pharmacological assays on our model. The gel generously provided by Dr. Salmon (EA4169 “Fundamental, Clinical and Therapeutic Aspects of Skin Barrier Function”, University of Lyon 1, Lyon, France) was composed of 25% p407 and p188 (5:1) poloxamers diluted in 1× PBS. With this composition of poloxamers, the generated hydrogel is liquid at temperatures <30 °C and acquires the physical features of a gel at temperatures >30 °C. Since skin explants were cultured at a temperature of 37 °C, the applied hydrogel was maintained on the site of tested skin area.

The hydrogel was applied daily and removed each time with a sterile compress after 6 h of application.

4.4. Histological and Immunohistological Analysis of Skin Explants

The skin explants were harvested at different time points following culture initiation. Under experimental conditions of burn, the whole lesioned area was excised and cut in two pieces which were either embedded in optimal cutting temperature compound (OCT) and stored at −20 °C until use or immediately fixed with 4% formaldehyde before being embedded in paraffin.

Tissue blocks were cut into 5 µm thick slides. For histological analysis, paraffin-embedded formalin-fixed samples, after dewaxing and rehydration, were stained with hematoxylin phloxine saffron (HPS).

For immunochemistry, tissue sections were incubated in 5% H₂O₂/3% normal goat serum (NGS; Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK) to inactivate endogenous peroxidases. Nonspecific binding was blocked in PBS containing 4% bovine serum albumin (BSA; Sigma, St Quentin Fallavier, France) and 5% NGS. Slides were then incubated with primary antibodies overnight at 4 °C: collagen VII (dilution 1:50, clone 4D2, sc-33710, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Hiedelberg, Germany) and HLA-DR/DP/DQ/DX (dilution 1:1500, clone CR3/43, sc-53302, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Hiedelberg, Germany).

Secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse (Dako) was incubated for 1 h at room temperature. Labeling was revealed using 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Dako) and slides were counterstained using Harris' hematoxylin (25%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). For collagen VII immunostaining, an initial step of heat-mediated and enzymatic antigen retrieval using trypsin (10 min at 37 °C, ab970, Abcam, Cambridge, MA, USA) was performed prior to incubation with the primary antibody.

For immunofluorescence, labeling was performed either on 5 µm thick paraffin-embedded formalin-fixed samples (for Ki67, procollagen III, and αSMA) or on air-dried 5 µm thick cryosections (for collagen I and III immunostaining). Slides were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: Ki67 (dilution 1:50, clone MIB-1, GA626, DakoCytomation, Glostrup, Denmark), procollagen III (dilution 1:500, clone M-58, Merck, Darmstadt, Germany), αSMA (dilution 1:200, NCL-L-SMA, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK) collagen I (dilution 1:500, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK), and collagen III (dilution 1:250, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK). Sections were then incubated for 1 h at room temperature with secondary anti-mouse or anti-rabbit antibodies coupled to the fluorochrome Alexa 488 (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Nuclei were visualized with Hoechst stain.

Image acquisition for Figure 1 was performed using an Eclipse 50i microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France). All other images were acquired using a slide scanner (Axioscan Zeiss, Wetzlar, Germany) in order to enable a global view of the whole burnt area and of adjacent non-lesioned tissues.

4.5. Fluorescence-Based Detection of Intracellular H₂S

Keratinocytes were cultured until sub-confluence on cover glasses in a 24-well plate. NaHS (0.25 or 2 mM) and H₂S fluorescent probe (100 µM, P3, Sigma) were co-incubated for 1 h at 37 °C and 5% CO₂. Cells were rinsed three times in PBS 1× and fixed in 4% formaldehyde. Cover glasses were then transferred on a slide. Detection of intracellular fluorescence was carried out on an Eclipse 50i microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France).

4.6. Image Analysis

Image processing and analysis were performed using the Image J software (Research Service Branch, US National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Ki67-positive epidermal cells were counted and expressed as a percentage relative to the total number of nuclei in the epidermal area analyzed. For αSMA, collagen I, collagen III, and HLA, the surfaces covered by staining were measured and expressed as a percentage relative to the total dermal area analyzed. When needed, measurements were performed at both edges of the burnt area, as well as at the center of the lesioned area.

4.7. Statistical Analysis

For all data, the GraphPad Prism 4 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) was used to determine statistical significance with the paired *t*-test; statistically significant differences are indicated by asterisks as follows: * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01.

Supplementary Materials: Supplementary Materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/18/6956/s1>: Figure S1. Kinetics of α-SMA, collagen I, and collagen III dermal expression in ex vivo cultured human skin explants submitted to 10 s long experimental injury; Figure S2. Increase in HLA class II staining at the edge of the lesion on day 5 post burn in ex vivo cultured human skin explants submitted to 10 s long experimental injury.

Author Contributions: O.G.-A., conceptualization, investigation, visualization, data curation, and data writing (original draft preparation); M.G., investigation; D.S., investigation and conceptualization; C.A., conceptualization, data curation, supervision, funding acquisition, and data writing (original draft preparation); S.N., conceptualization, data curation, supervision, funding acquisition, and data writing (original draft preparation). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by a grant (to S.N. and C.A.) and a doctoral scholarship (to O.G.-A.) from the French association for research on spa waters (AFRETH: "Association Française pour la Recherche Thermale").

Acknowledgments: This research was also supported by the “Ministère de L’Education Nationale, L’Enseignement Supérieur et de la Recherche”, by INSERM, Hospices Civils de Lyon, University Claude Bernard Lyon-1.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

| | |
|------|--------------------------|
| αSMA | α-smooth muscle actin |
| DEJ | dermo-epidermal junction |
| HLA | human leukocyte antigen |

References

- Forjuoh, S.N. Burns in low- and middle-income countries: A review of available literature on descriptive epidemiology, risk factors, treatment, and prevention. *Burns* **2006**, *32*, 529–537. [CrossRef] [PubMed]
- Peck, M.D.; Kruger, G.E.; van der Merwe, A.E.; Godakumbura, W.; Ahuja, R.B. Burns and fires from non-electric domestic appliances in low and middle income countries Part I. The scope of the problem. *Burns* **2008**, *34*, 303–311. [CrossRef] [PubMed]
- Shpichka, A.; Butnaru, D.; Bezrukov, E.A.; Sukhanov, R.B.; Atala, A.; Burdukovskii, V.; Zhang, Y.; Timashev, P. Skin tissue regeneration for burn injury. *Stem Cell Res Ther.* **2019**, *10*, 94. [CrossRef] [PubMed]
- Smolle, C.; Cambiaso-Daniel, J.; Forbes, A.A.; Wurzer, P.; Hundeshagen, G.; Branski, L.K.; Hussef, F.; Kamolz, L.-P. Recent Trends in Burn Epidemiology Worldwide: A Systematic Review. *Burns* **2017**, *43*, 249–257. [CrossRef]
- Hall, C.; Hardin, C.; Corkins, C.J.; Jiwani, A.Z.; Fletcher, J.; Carlsson, A.; Chan, R. Pathophysiologic Mechanisms and Current Treatments for Cutaneous Sequelae of Burn Wounds. *Compr. Physiol.* **2017**, *8*, 371–405.
- Finnerty, C.; Jeschke, M.; Branski, L.; Barret, J.; Dziewulski, P.; Herndon, D. Hypertrophic scarring: The greatest unmet challenge after burn injury. *Lancet* **2016**, *388*, 1427–1436. [CrossRef]
- Jeschke, M.G.; Shahrokhi, S.; Finnerty, C.C.; Branski, L.K.; Dibildox, M. Wound Coverage Technologies in Burn Care: Established Techniques. *J. Burn Care Res.* **2018**, *39*, 313–318. [CrossRef]
- Capek, K.D.; Sousse, L.E.; Hundeshagen, G.; Voigt, C.D.; Suman, O.E.; Finnerty, C.C.; Jennings, K.; Herndon, D.N. Contemporary Burn Survival. *J. Am. Coll. Surg.* **2018**, *226*, 453–463. [CrossRef]
- Spanholtz, T.A.; Theodorou, P.; Amini, P.; Spilker, G. Severe Burn Injuries. *Deutsches Aerzteblatt Online*. Available online: <https://www.aerzteblatt.de/10.3238/arztebl.2009.0607> (accessed on 18 September 2009).
- Saeidinia, A.; Keihanian, F.; Lashkari, A.P.; Lahiji, H.G.; Mobayyen, M.; Heidarzade, A.; Golchai, J. Partial-thickness burn wounds healing by topical treatment. *Medicine* **2017**, *96*, e6168. [CrossRef]
- Wasiak, J.; Cleland, H.; Campbell, F.; Spinks, A. Dressings for superficial and partial thickness burns. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2013**, *2013*, CD002106. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7065523/> (accessed on 20 July 2020).
- Coolen, N.A.; Vlig, M.; van den Bogaardt, A.J.; Middelkoop, E.; Ulrich, M.M.W. Development of an in vitro burn wound model. *Wound Repair Regen.* **2008**, *16*, 559–567. [CrossRef]
- Qu, M.; Nourbakhsh, M. Current experimental models of burns. *Discov. Med.* **2017**, *23*, 95–103.
- Zomer, H.D.; Trentin, A.G. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *J. Dermatol. Sci.* **2018**, *90*, 3–12. [CrossRef] [PubMed]
- Nielson, C.B.; Duethman, N.C.; Howard, J.M.; Moncure, M.; Wood, J.G. Burns: Pathophysiology of Systemic Complications and Current Management. *J. Burn Care Res.* **2017**, *38*, e469–e481. [CrossRef] [PubMed]
- Qu, M.; Kruse, S.; Pitsch, H.; Pallua, N.; Nourbakhsh, M. Viability of human composite tissue model for experimental study of burns. *Discov. Med.* **2016**, *22*, 19–28. [PubMed]
- Kratz, G. Modeling of wound healing processes in human skin using tissue culture. *Microsc. Res. Tech.* **1998**, *42*, 345–350. [CrossRef]
- Sivamani, R.; Pullar, C.; Manabat-Hidalgo, C.; Rocke, D.; Carlsen, R.; Greenhalgh, D.; Isseroff, R.R. Stress-Mediated Increases in Systemic and Local Epinephrine Impair Skin Wound Healing: Potential New Indication for Beta Blockers. *PLoS Med.* **2009**, *6*, e12. [CrossRef]

19. Cuylen, S.; Blaukopf, C.; Politi, A.Z.; Müller-Reichert, T.; Neumann, B.; Poser, I.; Ellenberg, J.; Hyman, A.A.; Gerlich, D.W. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature* **2016**, *535*, 308–312. [[CrossRef](#)]
20. Akkari, A.C.S.; Papini, J.Z.B.; Garcia, G.K.; Franco, M.K.K.D.; Cavalcanti, L.P.; Gasperini, A.; Alkschbirs, M.I.; Yokaichyia, F.; de Paula, I.; Tófoli, G.R.; et al. Poloxamer 407/188 binary thermosensitive hydrogels as delivery systems for infiltrative local anesthesia: Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation. *Mater. Sci. Eng.* **2016**, *68*, 299–307. [[CrossRef](#)]
21. Ban, E.; Park, M.; Jeong, S.; Kwon, T.; Kim, E.-H.; Jung, K.; Kim, A. Poloxamer-Based Thermoreversible Gel for Topical Delivery of Emodin: Influence of P407 and P188 on Solubility of Emodin and Its Application in Cellular Activity Screening. *Molecules* **2017**, *22*, 246. [[CrossRef](#)]
22. Dumortier, G.; Grossiord, J.L.; Agnely, F.; Chaumeil, J.C. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 2709–2728. [[CrossRef](#)]
23. Emanuelsson, P.; Kratz, G. Characterization of a new in vitro burn wound model. *Burns* **1997**, *23*, 32–36. [[CrossRef](#)]
24. Tiwari, V.K. Burn wound: How it differs from other wounds? *Indian J. Plast. Surg.* **2012**, *45*, 364–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sorg, H.; Tilkorn, D.J.; Hager, S.; Hauser, J.; Mirastschijski, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur. Surg. Res.* **2017**, *58*, 81–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ajani, G.; Sato, N.; Mack, J.A.; Maytin, E.V. Cellular Responses to Disruption of the Permeability Barrier in a 3-Dimensional Organotypic Epidermal Model. *Exp. Cell Res.* **2007**, *313*, 3005–3015. [[CrossRef](#)]
27. Yamakawa, S.; Hayashida, K. Advances in surgical applications of growth factors for wound healing. *Burns Trauma* **2019**, *7*, 10. [[CrossRef](#)]
28. Demidova-Rice, T.N.; Hamblin, M.R.; Herman, I.M. Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 2: Role of Growth Factors in Normal and Pathological Wound Healing: Therapeutic Potential and Methods of Delivery. *Adv. Skin Wound Care* **2012**, *25*, 349–370. [[CrossRef](#)]
29. Chong, D.L.W.; Trinder, S.; Labelle, M.; Rodriguez-Justo, M.; Hughes, S.; Holmes, A.M.; Scotton, C.J.; Porter, J.C. Platelet-derived transforming growth factor- β 1 promotes keratinocyte proliferation in cutaneous wound healing. *J. Tissue Eng. Regen Med.* **2020**, *14*, 645–649. [[CrossRef](#)]
30. Jeschke, M.G.; van Baar, M.E.; Choudhry, M.A.; Chung, K.K.; Gibran, N.S.; Logsetty, S. Burn injury. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2020**, *6*, 11. [[CrossRef](#)]
31. Steinstraesser, L.; Rittig, A.; Gevers, K.; Sorkin, M.; Hirsch, T.; Kesting, M.; Sand, M.; Al-Benna, S.; Langer, S.; Steinau, H.U.; et al. A human full-skin culture system for interventional studies. *Eplasty* **2009**, *9*, e5.
32. Xu, W.; Jong Hong, S.; Jia, S.; Zhao, Y.; Galiano, R.D.; Mustoe, T.A. Application of a partial-thickness human ex vivo skin culture model in cutaneous wound healing study. *Lab Invest.* **2012**, *92*, 584–599. [[CrossRef](#)]
33. Veyries, M.L.; Couarraze, G.; Geiger, S.; Agnely, F.; Massias, L.; Kunzli, B.; Faurisson, F.; Rouveix, B. Controlled release of vancomycin from Poloxamer 407 gels. *Int. J. Pharm.* **1999**, *192*, 183–193. [[CrossRef](#)]
34. Soriano-Ruiz, J.L.; Calpena-Campmany, A.C.; Silva-Abreu, M.; Halbout-Bellowa, L.; Bozal-de Febrer, N.; Rodríguez-Lagunas, M.J. Design and evaluation of a multifunctional thermosensitive poloxamer-chitosan-hyaluronic acid gel for the treatment of skin burns. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *142*, 412–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Heilmann, S.; Küchler, S.; Wischke, C.; Lendlein, A.; Stein, C.; Schäfer-Korting, M. A thermosensitive morphine-containing hydrogel for the treatment of large-scale skin wounds. *Int. J. Pharm.* **2013**, *444*, 96–102. [[CrossRef](#)]
36. Li, X.; Li, A.; Feng, F.; Jiang, Q.; Sun, H.; Chai, Y.; Yang, R.; Wang, Z.; Hou, J.; Li, R. Effect of the hyaluronic acid-poloxamer hydrogel on skin-wound healing: In vitro and in vivo studies. *Anim. Models Exp. Med.* **2019**, *2*, 107–113. [[CrossRef](#)]
37. Brugués, A.; Naveros, B.; Calpena, A.; Hernandez, P.; Fisa, R.; Lizandra, C. Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped in stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 227–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Yang, X.; Yang, R.; Chen, M.; Zhou, Q.; Zheng, Y.; Lu, C.; Bi, J.; Sun, W.; Huang, T.; Li, L.; et al. KGF-2 and FGF-21 poloxamer 407 hydrogel coordinates inflammation and proliferation homeostasis to enhance wound repair of scalded skin in diabetic rats. *BMJ Open Diabetes Res. Care* **2020**, *8*, e001009. [[CrossRef](#)]

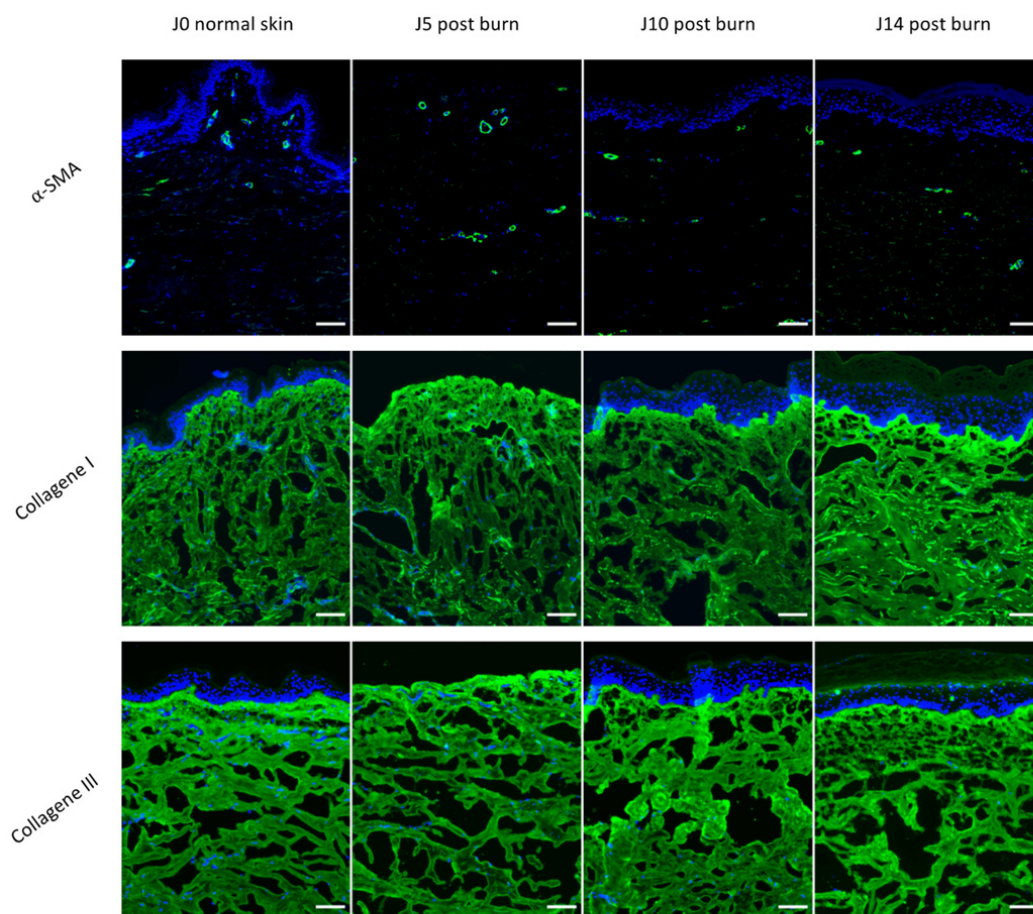
39. Chen, M.; Przyborowski, M.; Berthiaume, F. Stem Cells for Skin Tissue Engineering and Wound Healing. *Crit. Rev. Biomed Eng.* **2009**, *37*, 399–421. [[CrossRef](#)]
40. Ochiai, H.; Kishi, K.; Kubota, Y.; Oka, A.; Hirata, E.; Yabuki, H.; Iso, Y.; Suzuki, H.; Umezawa, A. Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds of pigs. *Regen Ther.* **2017**, *7*, 8–16. [[CrossRef](#)]
41. Thépot, A.; Desanlis, A.; Venet, E.; Thivillier, L.; Justin, V.; Morel, A.P.; Defraipont, F.; Till, M.; Krutovskikh, V.; Tommasino, M.; et al. Assessment of transformed properties in vitro and of tumorigenicity in vivo in primary keratinocytes cultured for epidermal sheet transplantation. *J. Skin Cancer* **2011**, *2011*, 936546. [[CrossRef](#)]
42. Li, H.; Berthod, F.; Xu, W.; Damour, O.; Germain, L.; Auger, F.A. Use of in vitro reconstructed skin to cover skin flap donor site. *J. Surg. Res.* **1997**, *73*, 143–148. [[CrossRef](#)]
43. Black, A.F.; Bouez, C.; Perrier, E.; Schlotmann, K.; Chapuis, F.; Damour, O. Optimization and Characterization of an Engineered Human Skin Equivalent. *Tissue Eng.* **2005**, *11*, 723–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

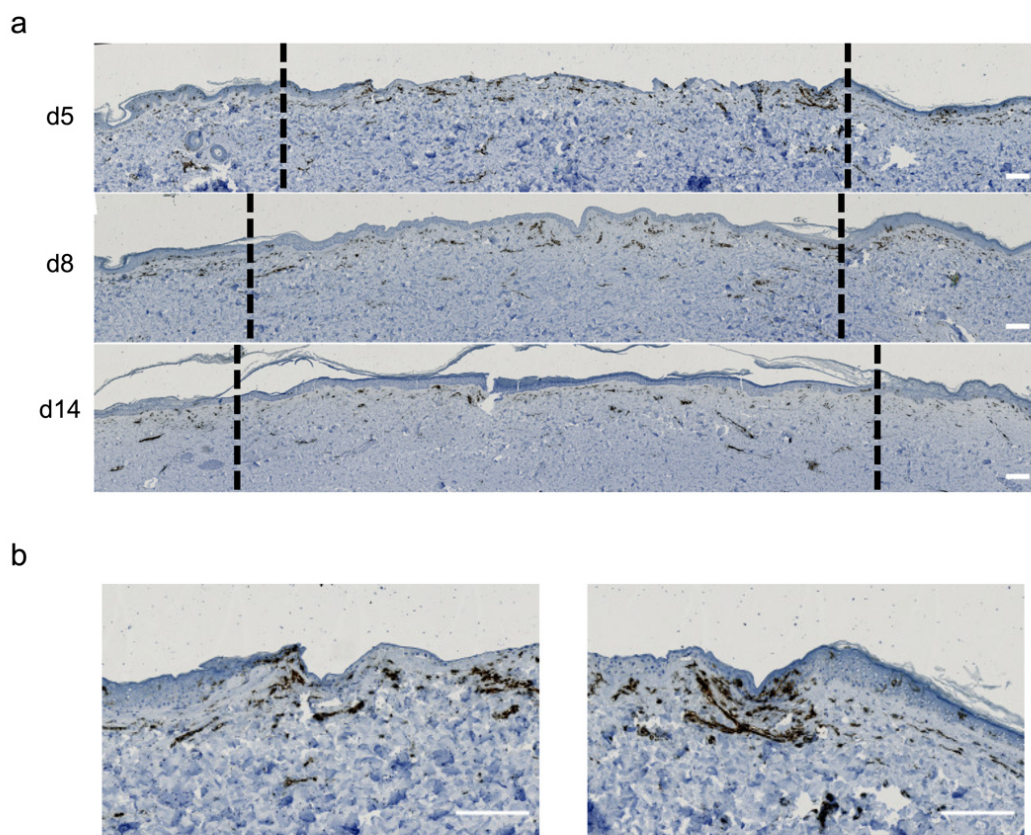
Supplementary Materials

Figure S1. Kinetics of α -SMA, Collagen I, and Collagen III dermal expression in *ex vivo* cultured human skin explants submitted to 10s-long experimental injury. Immunostainings of the dermal proteins α -SMA (a), Collagen I (b), and Collagen III (c) were performed on human skin explants harvested at different time points post-burn (d5, d10 and d14). Results were compared to those obtained in non-lesioned skin explants (d0). No significant difference was observed when comparing non-lesioned vs lesioned skin explants, irrespective of the time point considered following burn injury. Results obtained for each condition are representative of 3 series of experiments performed on skin explants derived from 3 donors. Scale bar: 100 μ m.



Article n°2: Characterization of a Topically Testable Model of Burn Injury on Human Skin Explants

Figure S2. Increase of HLA class II staining at the edge of the lesion at d5 post-burn in *ex vivo* cultured human skin explants submitted to 10s-long experimental injury. Immunostainings of HLA class II molecules were performed on human skin explants harvested at different time points post-burn (d5, d10 and d14) (a). A local increase of HLA class II immunostaining was observed at d5 post-burn in the dermis and epidermis at the edges of the injured area. Such an increase is transient as immunostaining intensity returns to baseline levels at d8 onwards. Black dashed lines delineate the burnt area. (b) High magnification views of HLA class II immunostainings observed at the edges of the burnt area at d5 post-burn. Results obtained for each condition are representative of 3 series of experiments performed on skin explants derived from 3 donors. Scale bar: 100 μ m.



3. Analyse des effets d'une application topique de NaHS sur un modèle *ex vivo* de brûlure du 2^{ème} degré

L'objectif de ce travail était de tester l'efficacité de deux méthodes de traitement de brûlure sur notre modèle *ex vivo* de brûlure du 2^{ème} degré : une application topique d'hydrogel de poloxamères contenant du NaHS et une injection dermique d'ASCs (Adipose-derived Stem Cells) encapsulés. Deux axes sont ainsi étudiés, l'utilisation d'un agent pharmaceutique d'une part, et d'une thérapie cellulaire de l'autre. Une des caractéristiques principales de notre étude est de mettre en place des techniques transposables en pour une utilisation clinique sachant qu'une partie des études ajoutent l'actif d'intérêt dans le milieu de culture dans les modèles *ex vivo* de cicatrisation.

Le premier traitement utilisé a été l'application topique d'un hydrogel de poloxamères contenant du NaHS. L'intérêt était de vérifier l'impact du NaHS sur la réparation cutanée dans un contexte de brûlure. Bien que nous ayons pu noter que l'hydrogel seul entraîne une diminution de la réépithélialisation de la brûlure, il n'empêche pas la fermeture de la plaie. La thermosensibilité de l'hydrogel permet une intégration simple du NaHS. Nous avons choisi de tester deux concentrations de NaHS (0,25 mM et 0,5 mM), en sachant que l'absorption de l'actif dans nos conditions expérimentales pouvait être diminuée en comparaison avec l'étude *in vitro*.

Le deuxième traitement testé a été une injection dermique d'ASCs encapsulés ou non. Cette partie de résultats s'inscrit dans le travail de thèse de Lucille Capin. L'intérêt des ASC dans le traitement des brûlures réside notamment dans le large spectre de facteurs sécrétés par ces dernières. Il a été mis en évidence notamment que les ASCs encapsulés sécrètent une quantité plus importante d'IL-8, d'IL-6 et de VEGF par rapport aux cellules en monocouches (Capin et al., 2020). L'encapsulation permet également de protéger les cellules lors de l'injection et une fois dans le lit de la plaie.

De manière similaire à la caractérisation du modèle de brûlure, les brûlures ont été analysées après les différents traitements en suivant la cinétique de : i) la réépithélialisation (coloration

NaHS-hydrogel and encapsulated Adipose-derived stem cells evaluation on an ex-vivo second degree burn model

HPS), ii) la prolifération des kératinocytes (Ki67) et iii) le remodelage tissulaire du derme (le procollagène III, le collagène III, le collagène I, α SMA et HLA).

En ce qui concerne les résultats obtenus après application du NaHS, nous avons pu identifier : i) un retard (à 0,25 mM) ou blocage complet (à 0,5 mM) de la réépithélialisation de la plaie traitée au NaHS et ii) une diminution de la synthèse de procollagène III.

Nous avons pu ainsi déterminer l'impact du NaHS sur la cicatrisation de la brûlure et vérifier également l'utilisation du modèle de brûlure pour d'autres traitements applicables en clinique comme l'injection d'ASCs.

Les résultats sont rassemblés dans un article en cours de finalisation avant soumission.

1 Article

2 NaHS-hydrogel and encapsulated Adipose-derived
3 stem cells evaluation on an *ex-vivo* second degree
4 burn model5 Lucille Capin^{1,2,3,†} and Olivia Gross-Amat^{1,2,3,†}, Marie Calteau², Marie-Rose Rovere², Damien
6 Salmon⁴, Ali Mojallal^{1,3,6} and Céline Auxenfans^{2,5}7 ¹ Lyon-Est School of Medicine, University Claude Bernard Lyon-1, 69100 Villeurbanne, France;
8 marine.guillen@univ-lyon1.fr (M.G.)9 ² Bank of Tissues and Cells, Lyon University Hospital (Hospices Civils de Lyon), 69003 Lyon, France;
10 celine.auxenfans@chu-lyon.fr11 ³ CarMeN Laboratory, INSERM U1060, INRA U1397, INSA de Lyon, 69600 Oullins, France12 ⁴ Fundamental, Clinical and Therapeutic Aspects of Skin Barrier Function, EA4169, University of Lyon 1,
13 69008 Lyon, France; salmondam@hotmail.fr14 ⁵ Tissue Biology and Therapeutic Engineering Laboratory, UMR 5305, 69007 Lyon, France15 ⁶ Service de chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, Hôpital de la Croix Rousse, Hospices Civils de
16 Lyon, 69004 Lyon, France; alain-ali.mojallal@chu-lyon.fr

17 * Correspondence:

18 † Equal contribution.

19 Received: date; Accepted: date; Published: date

20

21 **Abstract:** Second-degree burns results in the loss of the epidermal barrier and could lead to delayed
22 complications during the healing process. Currently, therapeutic options to treat severe burns are
23 limited. Thus, this work aims to validate the effectiveness of two new treatments: topical application
24 of NaHS in a poloxamer hydrogel and dermal injection of adipose derived stem cells (ASCs)
25 encapsulated or grown as monolayer using our previous second degree burn model on skin explants.
26 Indeed, the observed benefits of NaHS, an H₂S donor, may include an antioxidant role, which might
27 be beneficial in the case of burns. Concerning ASCs, their interest in wound healing is more than well
28 documented. According to our results, our model allows to test treatments in conditions similar to a
29 clinical application. The effect of NaHS led to a delay in re-epithelialization, with a decrease in the
30 number of proliferating cells and a decrease in the synthesis of procollagen III. On the contrary, both
31 intradermal injection of ASCs, encapsulated or not, improve wound healing by accelerating re-
32 epithelialization and collagen I synthesis but only encapsulated ASCs accelerates keratinocytes
33 migration and increase the rate of procollagen III and collagen III.

34

35 **Keywords:** burn; human skin; *ex vivo*; wound healing; H₂S treatment; ASC treatment; encapsulation

36

37 1. Introduction

38 A second-degree, or partial-thickness, burn penetrates into but not through the dermis. This kind of
39 wound is therefore not harmless, the epidermal barrier being lost, the wound could form a blister or,
40 if uncovered, weeps interstitial fluid. Since the dermal plexus of vessels and nerves is intact, the
41 wound will blanch with pressure and the pain will be severe (1). Moreover, delayed complications

42 may occur during the healing process requiring then the use of surgical treatments (2,3). Currently,
43 for second-degree burn reference treatment consists in the topical application of 1% silver
44 sulfadiazine which does not improve re-epithelialization neither the quality of the scar (4,5). The
45 management of extensive and deep burns, such as epidermal sheets which are costly treatments and
46 require qualified personnel (6). It is, thus essential to find new treatments for second-degree burns
47 and test them on a reliable and standardized model closer as possible to physiological condition to
48 get relevant results and to limit animal studies. Because human skin and the human wound healing
49 process show specificities, the model used must be reproducible and humanly applicable to test the
50 effectiveness of treatments. This is why the use of an *ex vivo* model of human skin seems to be a
51 relevant choice as it allows to place itself in a condition similar to a physiological condition with all
52 the structures and different cell types resident in human skin *in vivo*. Although the *ex vivo* model
53 offers many advantages for the study of burn actives, few studies have established burn models on
54 human skin (7–11). Moreover, these studies using an *ex vivo* burn model have not been followed by
55 a test to target a treatment or a wound healing signaling pathway. Only one of these studies
56 investigated the impact of an active ingredient (11), however, as in many *ex vivo* skin repair studies,
57 the treatment was added to the culture medium (12,13). That's why we have previously developed a
58 second-degree burn model in order to test the efficacy of treatments on skin repair. In order to get
59 closer to a physiological situation, the explant is cultured at the air/liquid interface and the skin is put
60 under tension in order to reproduce the mechanical tensions (14).

61 We decided to test NaHS, which is a fast hydrogen sulfide (H₂S) donor and encapsulated ASCs
62 as a burn treatment on our second-degree burn model. H₂S is found in particular in some sulfur
63 thermal baths. Cures in these thermal waters have been used ancestrally in the treatment of
64 inflammatory dermatological pathologies such as psoriasis, atopic dermatitis and also chronic
65 wounds (15–18). Although the effects of H₂S have not yet been defined, the observed benefits may
66 include an antioxidant role, which may also be beneficial in the case of burns that result in increased
67 of ROS with a risk of oxidative stress (19–22). The second target of our study is the injection of ASCs
68 as a burn treatment. Even if the entire mechanism of action is not totally understood, the scientific
69 community agrees on the fact that ASCs have a huge potential in wound healing through their
70 regenerative properties. Indeed due to their plasticity (23) and their secretome (24), ASCs are
71 especially interesting in tissue repair. They could improve angiogenesis (25), have
72 immunomodulatory properties (26) and antifibrotic (27) and chemoattractant effect (28). Moreover,
73 their paracrine effect is able to influence cells behaviour within a pathological environment (29,30).
74 In the particular case of burn, ASCs treatment could potentially resolve immune system dysfunction,
75 re-epithelialization delay or the appearance of hypertrophic scar (31). To potentialize the therapeutic
76 effect of injected ASCs the strategy with the most potential appeared to us to be microencapsulation.
77 According to our previous results (32), encapsulation presents numerous advantages over the direct
78 injection route. In addition to maintaining good cell survival, encapsulation increase and enrich ASCs
79 secretome and recreates physiological conditions by mimicking the native ASCs microenvironment
80 without altering their stem cell properties. In this study, Our objective is to test the efficiency of two
81 treatments: i) topical application of NaHS in a poloxamer hydrogel, ii) dermal injection of adipose
82 derived stem cells (ASCs), encapsulated or not. On one hand we test two different administration
83 methods, one being a topical gel application and the other one being an intradermal injection. On the
84 other hand, we test the effect of a chemical active and a cellular therapy. We have chosen to
85 investigate these two targets as possible treatments for the improvement of second-degree burns.

86 2. Results

87 *Impact of NaHS and encapsulated ASCs on epidermidis of second degree ex-vivo burn model*

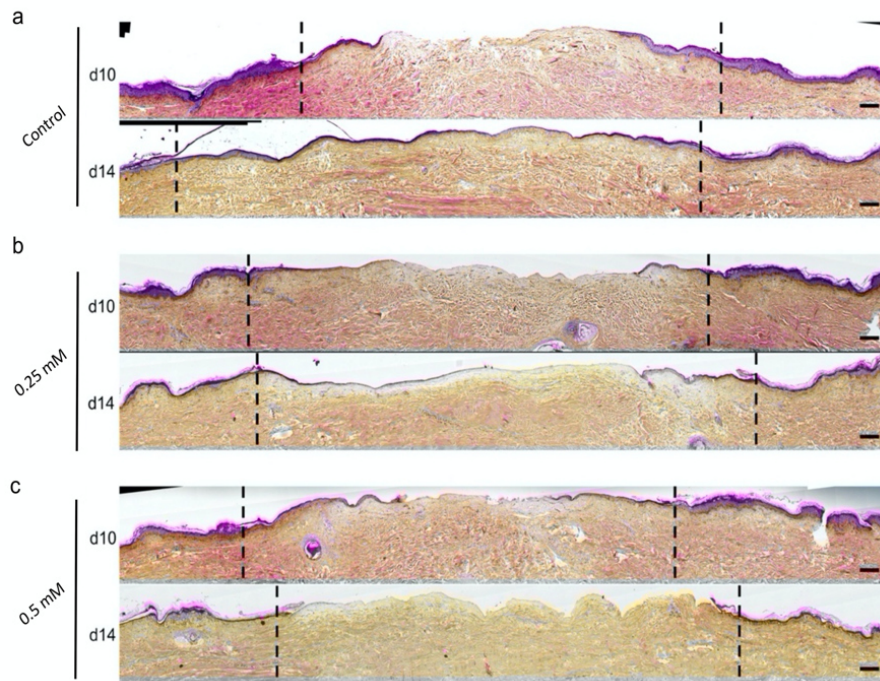
88 To investigate the impact of NaHS on burn in an *ex vivo* burn model, serial histological analysis
89 were performed on lesioned skin explant samples obtained from 3 distinct donors. The extent of re-
90 epithelialization was assessed on day 0, 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 14 post-burn by HPS, as described

91 previously (14). Days of interest were subsequently analyzed by immunostaining. Daily topical
92 applications of such a poloxamer hydrogel were performed on areas of lesioned skin explants in our
93 model of experimental second degree burn injury with or without NaHS (0.25 or 0.5 mM). On day 10
94 of the culture, we observe a similar re-epithelialization for the different conditions with or without
95 NaHS (Figure 1) with an advancement of the epidermal tongue allowing closure by the wound edges.
96 On the other hand, on day 14, it was observed that wounds treated with and were not completely re-
97 epithelialized at 0.25 mM NaHS (Figure 1b) and blocked at 0.5 mM (Figure 1c), compared to those
98 treated with hydrogel alone (Figure 1a). In addition, at 0.25 mM NaHS the epidermal advance
99 contained fewer 1-2 layers of keratinocyte cells (Figure 1b) compared to 4-5 layers for control (Figure
100 1a). Treatment at 0.5 mM NaHS had a more detrimental effect on the keratinocytes, at day 14 there
101 was a regression of epidermal tongue advancement, with only one layer of keratinocytes remaining,
102 and the wound remained completely open (Figure 1c). NaHS then appears to have a dose-dependent
103 effect resulting in delayed re-epithelialization.

104 We have previously observed that NaHS leads to a decrease in epidermal stem cell proliferation
105 (33). We thus verified by staining the proliferating cells, Ki67+, whether the NaHS-induced delay in
106 re-epithelialization is due to a decrease in proliferation. At the wound edges at day 5, we observed
107 no significant difference in the rate of proliferating cells (Figure 2d). On the other hand, at day 8, we
108 observe a higher rate of proliferating cells for control (48%) compared to NaHS-treated lesions (29%
109 at 0.25mM and 36% at 0.5mM). This difference in Ki67+ cells at the wound edge is no longer present
110 at day 14 although re-epithelialization is incomplete with NaHS treatment. Looking at proliferating
111 cells in the center of the burn, the percentage of Ki67+ cells is similar to the control for the condition
112 treated at 0.25 mM NaHS (Figure 2e). However, when staining is observed (Figure 2a-b), fewer Ki67+
113 cells are observed in the center of the burn when treated with 0.25 mM (Figure 2b) than for the control
114 condition (Figure 2a). The percentages of Ki67 are similar because the number of Ki67+ cells is related
115 to the total number of cells in the epidermis, but, as mentioned above, the control contains more
116 layers, i.e. more keratinocytes. Therefore, the number of proliferating cells remains higher for the
117 control condition although it is more difficult to compare to conditions with NaHS.

118 Although a blockage of the re-epithelialization was observed with the treatment at 0.5 mM NaHS
119 at 14 days, a large proportion of proliferating cells were observed on day 10. At the border on day 14,
120 although progress is significantly reduced, proliferating cells are still present. The NaHS appears to
121 slow down the proliferation but without inhibiting it completely.

122

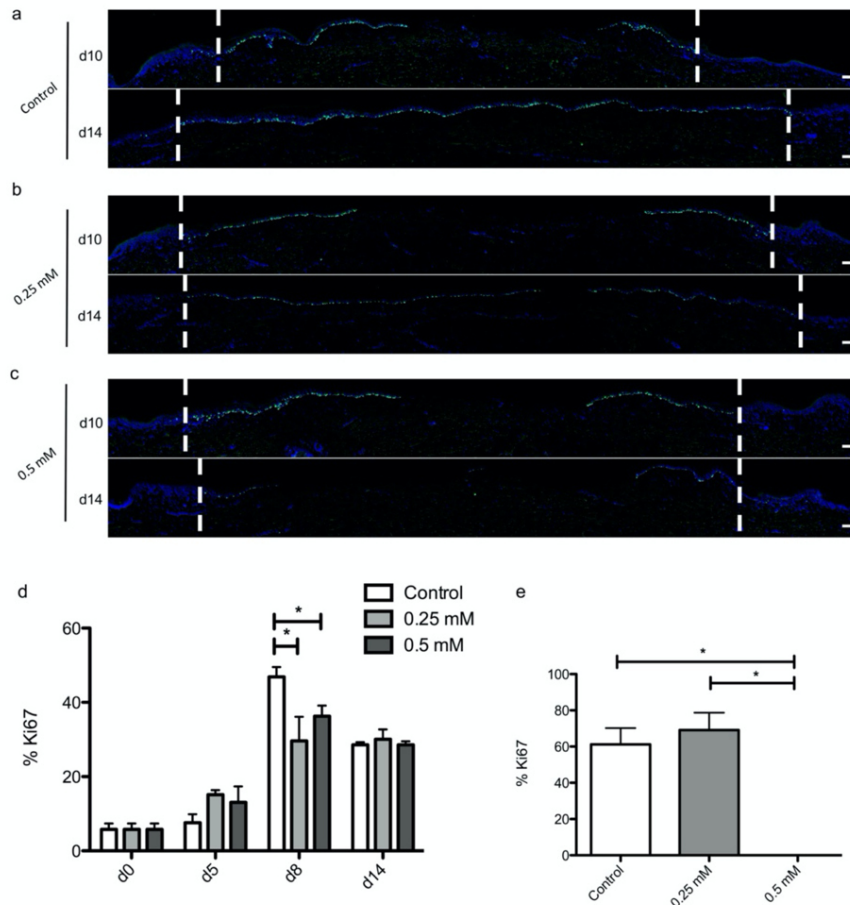


123

124 **Figure 1.** Histological analysis of second degree burn model ex-vivo after treatment with poloxamer
 125 hydrogel containing NaHS (0.25 mM - 0.5 mM). The impact of NaHS on burn reepithelization was
 126 observed by HPS staining at different time of culture (day 10 and day 14): (a) poloxamer hydrogel
 127 alone (Control), (b) 0.25mM or (c) 0.5mM NaHS-poloxamer hydrogel. The control burn treated with
 128 poloxamer hydrogel alone is completely re-epithelialized at d14 (a) whereas it is not complete for lesions treated
 129 with NaHS (b-c). At d14, we observe that a 0.25mM NaHS treatment decreases the reepithelization of the
 130 epidermis (b). A 0.5mM NaHS treatment results in a non-reepithelialized wound. Moreover, the epidermal
 131 tongue observed at d10 is no longer visible at d14 (c). Dashed lines in black delineate the burnt area. Experiments
 132 performed on skin explants derived from 3 donors. Scale bar: 100 μ m.

NaHS-hydrogel and encapsulated Adipose-derived stem cells evaluation on an ex-vivo second degree burn model

5 of 22



133

134

135 **Figure 2.** Second degree burn model ex-vivo after treatment with poloxamer hydrogel containing

136 NaHS (0.25mM - 0.5mM) were analyzed by Ki67. Immunostaining of Ki67 was performed on second degree

137 burn model harvested at different time points post burn (days 8, 10, and 14) : (a) poloxamer hydrogel alone

138 (Control), (b) 0.25mM or (c) 0.5mM NaHS-poloxamer hydrogel. The proliferation index of keratinocytes

139 (ratio of proliferating Ki67+ cells relative to the total number of epidermal cells) was measured in human skin

140 explants harvested at different time points of the culture. On day 8, at the lesion edges, a decrease of proliferation

141 is observed for lesions treated with NaHS-poloxamer hydrogel (48% in hydrogel-treated lesions vs. 29% and

142 36% in lesions treated with respectively 0.25mM and 0.5mM NaHS hydrogel). On day 14, the proliferation

143 index was similar in the different conditions with or without NaHS only on the lesion edges because, in the

144 center of the burn (e), there are no cells on the lesion treated with the hydrogel containing 0.5mM NaHS. For

145 each donor (n = 3) and for each time point, measurements were carried out on both edges (d) or at the center (e)

146 of the lesion and expressed as mean values. Dashed lines in white (a-b-c) delineate the burnt area. Statistical

147 significance was assessed with the paired *t*-test. * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01. Scale bar: 100 μ m.

148

149 Then, to investigate the impact of encapsulated ASCs on burn in an *ex vivo* burn model, serial

150 histological analysis were performed on lesioned skin explant samples obtained from 6 distinct

151 donors. (Figure 3a). One day after the burn process, burnt epidermis has been removed and

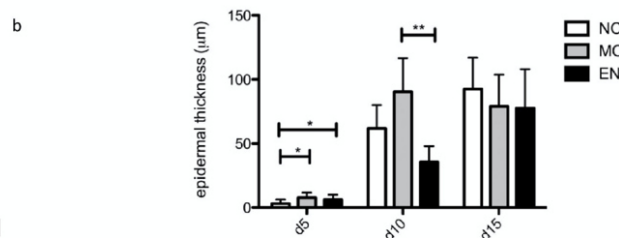
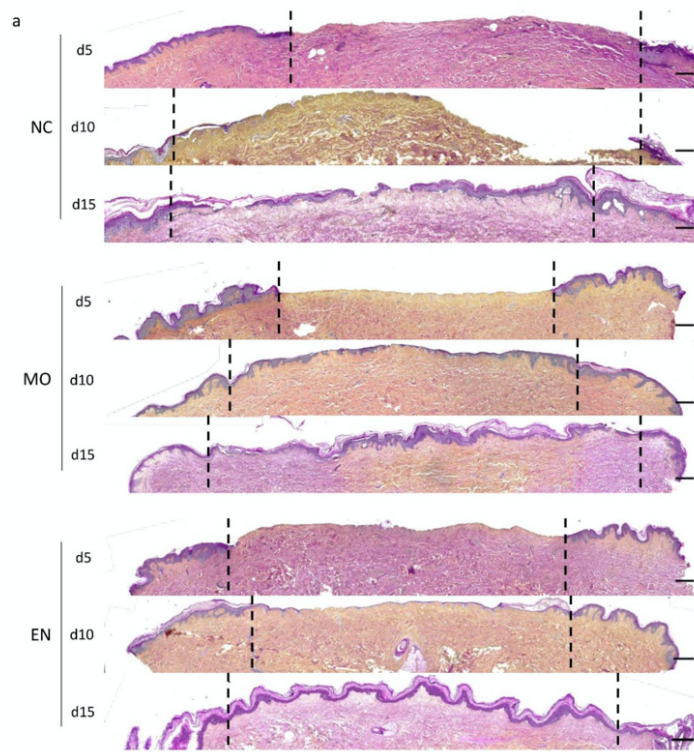
152 monolayer ASCs (MO) or encapsulated ASCs (EN) were injected in the dermis of distinct burnt areas.

No cells were injected in the negative control (NC) in order to assess the impact of ASCs treatment

153 on wound closure kinetics. After five days post burn, the entire burn area is visible in the three
154 conditions with few signs of re-epithelialization in treated skins. This observation is confirmed by
155 statistical analysis in Figure 3b. Interestingly, at day 10 on Figure 3a, the epidermis of explants treated
156 with MO-ASCs and EN-ASCs is almost fully restored whereas the re-epithelialization has barely
157 began in the negative control but according to epidermal thickness analysis the only significant
158 difference is between skin treated by MO and EN ASCs. Epidermis from explants treated with MO
159 ASCs appears thicker than which obtained after EN-ASCs treatment. However, at day 15, a complete
160 re-epithelialization is observed in all conditions. In explants treated with MO-ASCs, a thickening of
161 the epidermis is observed on images at the center of the wound while the new epidermis obtained
162 with EN-ASCs treatment is more homogeneous. Nevertheless, ASCs injection and particularly,
163 encapsulated ASCs injection damage the dermis. In MO and EN conditions holes were observed as
164 witnesses of the dermis deterioration. According to these results, ASCs treatment appears to
165 accelerate the wound closure and improve re-epithelialization in spite of a dermis deterioration.

166 In order to assess the impact of ASCs treatment on keratinocytes proliferation, immunostainings
167 of Ki67 were performed on human skin explants at day 5, 10 and 15 after the burn in the three
168 conditions: explant treated with monolayer ASCs (MO), explant treated with encapsulated ASC (EN)
169 and explant not treated, negative control (NC) (Figure 4). In the negative control on day 5,
170 keratinocytes have started to proliferate on the edges of the burn whereas in explants treated with
171 MO-ASCs and EN-ASCs keratinocytes have already reached the center of the burn (Figure 4a).
172 However, this difference of proliferation at day 5 between the explants treated and negative control
173 has not been found in the statistical analysis represented in Figure 4b. Indeed, the analysis of the
174 proliferation rate on the edges of the burn defined as the ratio of proliferating Ki67+ cells relative to
175 the total number of epidermal cells, has only revealed a difference of 8,2% at day 10 between MO and
176 EN conditions. Thus, on day 10 post burn, there were less keratinocytes proliferating on the edges of
177 the burn in EN condition than in MO condition. Keratinocytes in EN condition migrate to the center
178 of the burn earlier than in MO condition but this difference is not confirmed when compared with
179 negative control. Nevertheless, while differences on keratinocytes proliferation on the edges of the
180 burn are not clearly demonstrated between the three conditions, statistical analysis has shown a
181 significant difference in keratinocytes proliferation at the center of the burn (Figure 4c). Indeed, at
182 day 15 post burn, there were 7,9% more keratinocytes proliferating at the center of the wound in EN
183 condition than in negative control. The encapsulated ASCs treatment accelerate the proliferation
184 process by improving keratinocytes migration to the center of the burn.

185 We therefore observed opposite effects of the two tested treatments with deleterious effects of
186 NaHS and stimulating effects of encapsulated ASCs on re-epithelialization and keratinocytes
187 proliferation.

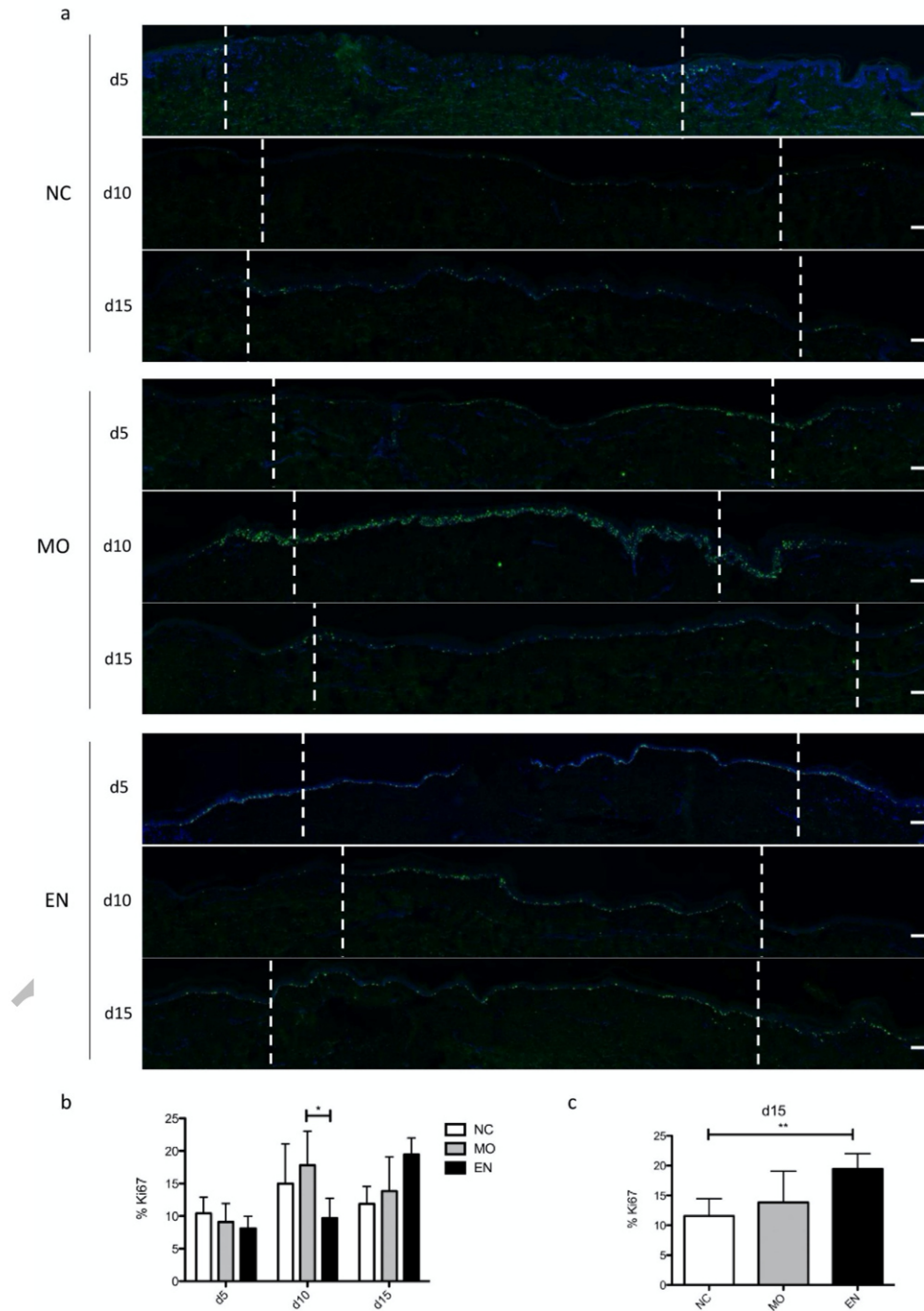


188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200

Figure 3. Histological analysis of second degree burn model ex-vivo after treatment with ASCs. (a) ASCs encapsulated (EN) and monolayer ASCs (MO) were intradermal injected. In the negative control (NC) no cell were injected. The impact of ASCs treatment on burn reepithelialization was observed by HPS staining at different time of the culture (day 5, 10 and 15). Explants treated with monolayer ASCs (MO) and encapsulated ASCs (EN) were already re-epithelialized on day 10 whereas re-epithelialization of the control burn (NC, not treated) has just started at this time point. Dashed lines in black delineate the burnt area. Scale bar: 100 µm. (b) Epidermal thickness was measured by Image J® at the center of the burn at three time point (day 5, 10 and 15) on images of HPS staining. At day 5, explants treated with ASCs have already started their re-epithelialization and the epidermis obtained after MO-ASCs treatment appears thicker than which obtained with EN-ASCs treatment on day 10. For each donor (n = 6) and for each time point, measurements were carried out at the center of the lesion and expressed as mean values. Statistical significance was assessed with the paired *t*-test. * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01.

NaHS-hydrogel and encapsulated Adipose-derived stem cells evaluation on an ex-vivo second degree burn model

8 of 22



201

202

203

204

205

206

207

Figure 4. Second degree burn model ex-vivo after treatment with ASCs from 6 donors were analyzed by Ki67. (a) Encapsulated ASCs (EN) and monolayer ASCs (MO) were intradermal injected. In the negative control (NC) no cell were injected. Expression of Ki67 at 5, 10 and 15 days were viewed in green color and cell nuclei in blue color. Dashed lines in white delineate the burnt area. Scale bar: 100 μm. (b) The proliferation index of keratinocytes (ratio of proliferating Ki67+ cells relative to the total number of epidermal cells) was measured in the edges of human skin explants harvested at different

NaHS-hydrogel and encapsulated Adipose-derived stem cells evaluation on an ex-vivo second degree burn model

9 of 22

208 time points of the culture. On day 10, at the lesion edges, a decrease of proliferation is observed for
209 lesions treated with EN ASCs compared to MO ASCs but not to CN. (c) The proliferation index of
210 keratinocytes (ratio of proliferating Ki67+ cells relative to the total number of epidermal cells) was
211 measured in human skin explants harvested at 15 days of the culture on the center of the burn. An
212 increase of proliferation is observed for explants treated with EN ASCs compared to negative control.
213 Statistical significance was assessed with the paired t-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

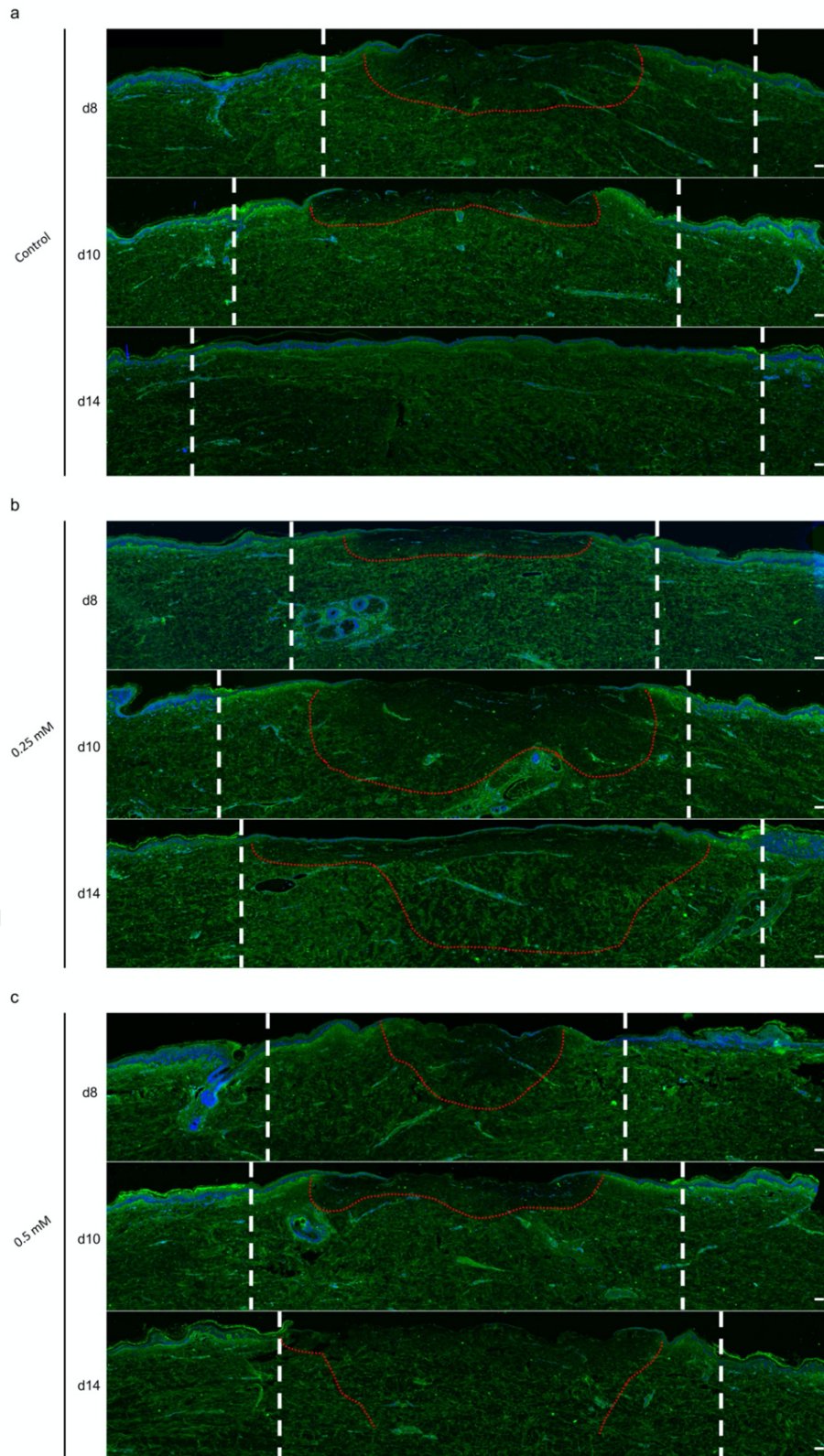
214

215 *Impact of NaHS and encapsulated ASCs on dermis of second degree ex-vivo burn model* We also
216 investigated the impact of NaHS in dermal proteins. An analysis of different proteins was performed:
217 α SMA, Collagen I, Collagen III, procollagen III on 3 donors. Although we were able to identify that
218 following the burn, in this *ex vivo* model, we do not observe any evolution in the staining α SMA,
219 Collagen I, Collagen III (14), it is interesting to see if the NaHS could nevertheless modify these
220 proteins. However, we could not observe any differences between the conditions independent of the
221 culture day for the proteins α SMA (Figure S1), Collagen I (Figure S2), Collagen III (Figure S3). On the
222 other hand, we could observe a decrease in the intensity of procollagen III staining, starting from day
223 8, similar to the control (Figure 5). In the control condition, this decrease in procollagen decreases on
224 day 10, and returns to a basal level on day 14 (Figure 5a). For wounds treated with NaHS, this
225 decrease in procollagen III intensity is still significant at day 10 and also at day 14 (Figure 5b-c). On
226 day 14, the area of decrease in intensity of procollagen III is more difficult to delineate although a
227 difference can be observed when comparing with the healthy (border) areas, the synthesis of
228 procollagen III could therefore be partly achieved although the epidermis was not re-formed.

229 Having identified that NaHS stimulates IL-8 secretion by keratinocytes *in vitro* (33), we sought
230 to verify whether NaHS could then stimulate the recruitment of immune cells at the wound site. We
231 then stained wounds treated or not treated with NaHS at different days of the culture with an HLA
232 staining that marks cells with MHC class II (macrophages, monocytes, dendritic cells). We observed
233 a slight increase in wound edge staining at day 8 for the NaHS-treated conditions (Figure S4b-c)
234 compared to the control condition (Figure S4a). This increase was not maintained at day 14.

235 NaHS has a dose-dependent impact resulting in a delay until wound re-epithelialization is
236 blocked after a second-degree burn, as well as a delay in procollagen III synthesis. This delay could
237 be impacted by a delay in proliferation as well as increased inflammation at the wound edge.

NaHS-hydrogel and encapsulated Adipose-derived stem cells evaluation on an ex-vivo second degree burn model



239 **Figure 5.** Second degree burn model ex-vivo after treatment with poloxamer hydrogel containing NaHS
240 (0.25mM - 0.5mM) were analyzed by procollagen III. Immunostaining of procollagen III was performed on
241 second degree burn model harvested at different time points post burn (days 8, 10, and 14) : (a) poloxamer
242 hydrogel alone (Control), (b) 0.25mM or (c) 0.5mM NaHS-poloxamer hydrogel. A decrease intensity of
243 procollagen III staining (area delimited by a red dotted line) was observed at day 8 and still present at day 10
244 until it returned to baseline levels on day 14. (b-c) For the NaHS-poloxamer hydrogel treatment, at both tested
245 concentrations, a decrease of procollagen III intensity staining was also observed at day 8, however is still
246 present and more expanded at day 10 and day14. Experiments were performed on skin explants derived from
247 three donors. White dashed lines delineate the burnt area. Scale bar: 100 μ m.

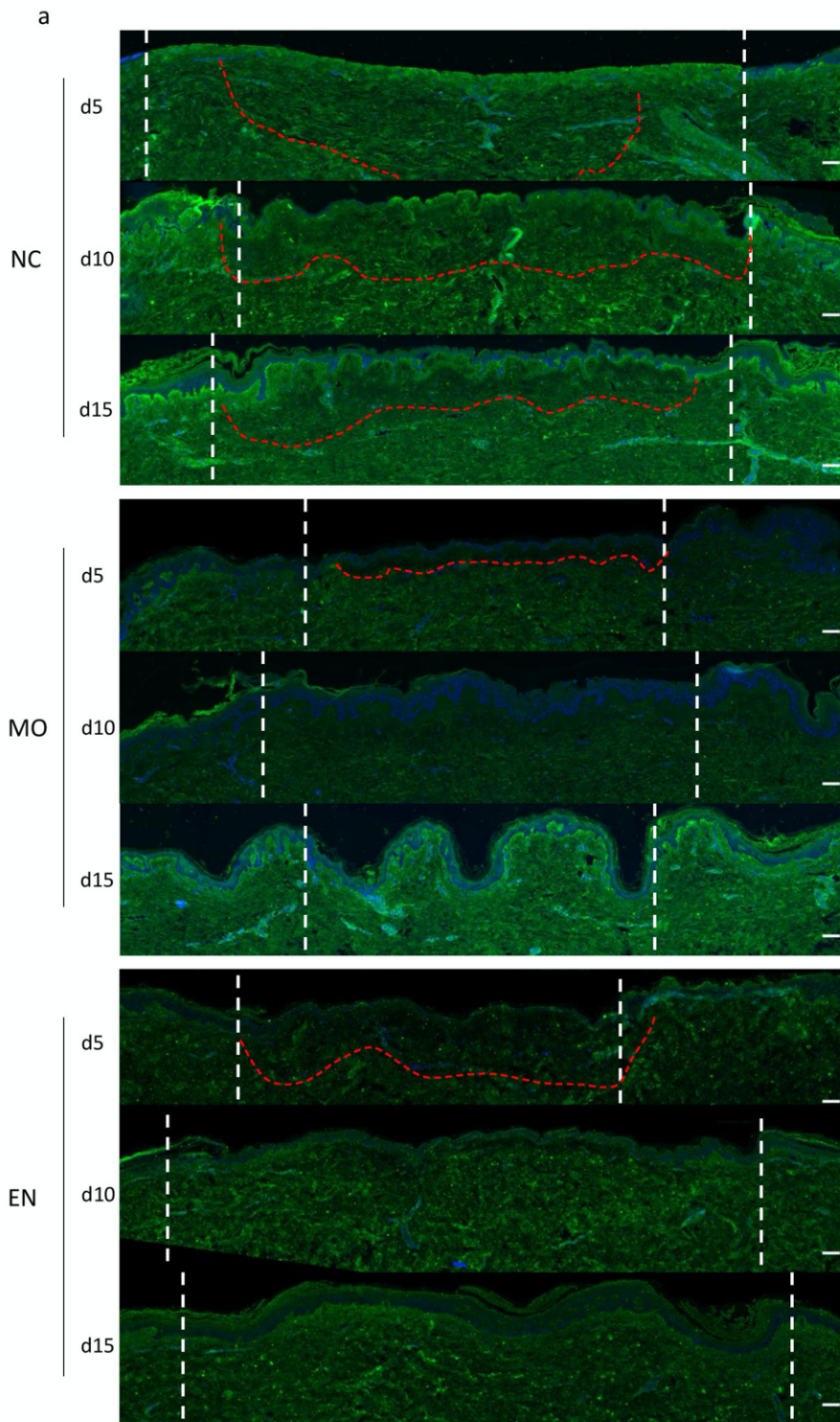
248

249 To investigate the impact of ASCs on dermal protein an analysis of α SMA, procollagen III,
250 collagen III and collagen I was performed on human explants. Although, any differences between the
251 conditions independent of the culture day, could be observed for the proteins α SMA (Figure S5),
252 some differences were observed on the collagen synthesis.

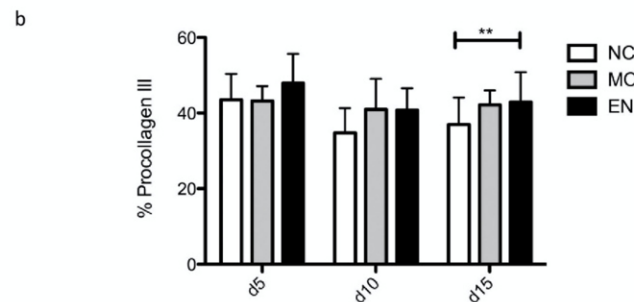
253 Concerning procollagen III, our results shows that ASCs plays a role in its synthesis. In the
254 negative control (NC) a decrease in the intensity of procollagen III staining is observed in the burn
255 area at day 5 and 10 and this phenomenon is attenuate on day 15 (Figure 6a). However, in explants
256 treated with MO-ASCs (MO) this decrease is not as clearly visible at any time point although a
257 difference can be observed when comparing with the healthy border on day 5 and 10. For the explants
258 treated with EN-ASCs (EN), this decrease in intensity is quite obvious on day 5 but more difficult to
259 delineate in day 10 and 15. Moreover, this difference in procollagen III synthesis is confirmed by the
260 statistical analysis in figure 6b where explants treated by EN-ASCs express 6% more procollagen III
261 than negative control. Thus, ASCs treatment and especially, EN-ASCs treatment increase procollagen
262 III dermal synthesis.

NaHS-hydrogel and encapsulated Adipose-derived stem cells evaluation on an ex-vivo second degree burn model

12 of 22



263



264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

Figure 6. Second degree burn model ex-vivo after treatment with ASCs from 6 donors were analyzed by procollagen III. Immunostaining of procollagen III was performed on ASCs-treated second degree burn model harvested at different time points post burn (days 5, 10, and 15). Encapsulated ASCs (EN) and monolayer ASCs (MO) were intradermal injected. In the negative control (NC) no cell were injected. (a) A decrease intensity of procollagen III staining (area delimited by a red dotted line) was observed at day 5 and still present at day 10 and 15 on the negative control. However, for explants treated with monolayer ASCs (MO), this intensity difference was not clearly visible on day 5 and was absent on day 10 and 15. In the explant treated with EN-ASCs, a decrease intensity of procollagen III staining was observed on day 5 but not on day 10 and 15. White dashed lines delineate the burnt area. Scale bar: 100 μ m. (b) Procollagen III area was measured at the center of the wound (ratio between procollagen III area and total dermis area). On day 15, burns treated with EN-ASCs appeared to express more procollagen III than negative controls. Statistical significance was assessed with the paired *t*-test, ** $p < 0.01$.

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

Collagen III synthesis has also been studied in burn explants. Contrary to procollagen III, we could not highlight an intensity difference in collagen III signal between the three conditions. Nevertheless, we observe on figure S6 a slight density difference at day 15 between explants treated with ASCs in monolayer or encapsulated and the negative control. Interestingly, this difference is translated by the statistical analysis represented in figure 7a which confirm the difference on collagen III rate between second degree burn model treated with encapsulated ASCs (EN) and negative control (NC). ASCs treatment decrease collagen III synthesis in the early phase of the wound healing process of almost 11% (10,9% for MO-ASCs treatment and 10,7% for EN-ASCs) and then, EN-ASCs treatment increase its synthesis of 10,8% at day 15 compared to negative control.

287

288

289

290

291

292

293

294

Then we analysed collagen I synthesis at the center of the wound in the three conditions described above at different time point (days 5, 10 and 15). Here again, we could not highlight a difference in the intensity of collagen I signal and we nether observed a visual difference of density at day 10 between second degree burn model treated and not treated (figure S7). However, the rate of collagen I in the dermis appears more important at day 10 in the explant treated with ASCs in monolayer and encapsulated (respectively 13,9% and 11,2% more) than in the negative control (Figure 7b). This finding coupled with previous outcomes seems to suggest that ASCs improve wound healing process by accelerating the kinetics of collagen I appearance

295

296

297

298

Both intradermal injection of human ASCs grown as monolayer or encapsulated improve wound healing by accelerating reepithelialisation and collagen I synthesis but only intradermal injection of human encapsulated ASCs accelerates keratinocytes migration and increase the rate of procollagen III and collagen III in a second degree burn model.

299

300

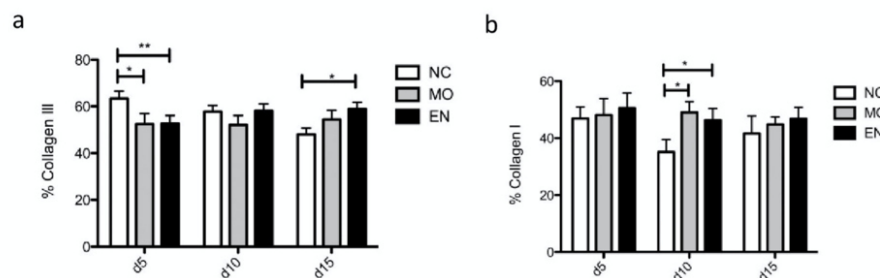
301

The two tested treatments showed opposite effects on procollagen III synthesis which has its synthesis inhibited by NaHS and stimulated by ASCs. Only ASCs treatment has an impact on collagen I and III.

302

303

304



305

Figure 7. Kinetics of collagen III and I dermal expression in ASCs-treated second degree burn model (a) Collagen III area was measured at the center of the wound (ratio between collagen III area and total dermis area). On day 5, it appears that there was more collagen III in negative control (NC) than in burns treated with ASCs in monolayer (MO) and encapsulated (EN) and this trend reverse on day 15 with an increase of 10% of collagen III surface in explants treated with EN-ASCs compared to negative control. (b) Collagen I area was measured at the center of the wound (ratio between collagen I area and total dermis area). On day 10, an increase of collagen I surface was observed in ASCs-treated second degree burn model (MO and EN) compared to NC. Results obtained for each condition are representative of 6 series of experiments performed on skin explants derived from 6 donors. Statistical significance was assessed with the paired t-test. * p < 0.05.

3. Discussion

We were able to observe the impact of two different target treatments in improving skin healing. It is interesting to note that we encountered results decreasing skin repair with the application of poloxamer hydrogel containing NaHS and on the other side a stimulation of healing with the injection of ASCs.

The effect of NaHS led to a delay in re-epithelialization, with a decrease in the number of proliferating cells at 0.5mM NaHS and a decrease in the synthesis of procollagen III at the burn site. NaHS then causes a delay in procollagen III synthesis, either by acting directly on the fibroblasts of the dermis or it is an impact resulting from the delay/blockage of re-epithelialization, the keratinocytes do not send, or in lesser numbers, the signals enabling procollagen III synthesis.

As mentioned above, the role of H₂S is still poorly understood and both pro-inflammatory and anti-inflammatory effects are associated with it (34–40). However, these results are in line with our findings showing that NaHS leads to a decrease in the proliferation of primary human keratinocytes. In addition, an increase in the secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-8, CXCL2, IL-18, IL-1β) was observed (33). This increase could lead to an increase in inflammatory cells in the wound and explains the increase in HLA marker after the addition of NaHS.

Concerning, the NaHS impact on keratinocyte proliferation, these results are consistent with our previous results on primary keratinocytes *in vitro* (33), indicating a inhibiting dose-dependent impact of NaHS on keratinocyte proliferation. However, the impact of 0.5 mM of NaHS leading to the regression of keratinocyte advancement could be due to another process of NaHS which remains to be investigated. Although these results do not explain the benefits of sulfurous thermal waters in the treatment of chronic ulcer repair, they may shed some light on its impact on psoriasis. Indeed, patients with psoriasis develop plaques caused by hyperproliferation of keratinocytes (41,42). H₂S

338 could then improve this symptom by decreasing keratinocyte proliferation and thus improve
339 patients' quality of life. It would then be interesting to develop at least one skin culture model of a
340 psoriasis patient, as has been done for different types of scars (keloid, hypertrophic scar) that have
341 been studied in *ex vivo* culture after sampling from human patients (43).

342 Concerning the ASCs, the aims were to assess their impact on wound healing in a second degree
343 burn model and evaluate if encapsulation improved this action. Cellular microencapsulation was
344 developed both to reduce premature death of cells following injection and to limit their migratory
345 capacity (44,45). In this study, adipose stem cells were reproducibly encapsulated as previously
346 described (46), using a prilling vibration method, in microparticles of alginate, a biocompatible and
347 biodegradable polysaccharide (47,48).

348 According to the literature, ASCs have a real interest in wound healing due to anti-inflammatory and
349 immunomodulatory effect (49,50) and thought their secretion which promote angiogenesis, and
350 keratinocytes proliferation and migration (51). In our study, results obtained after HPS staining
351 support these findings. Indeed, both monolayer ASCs (MO) and encapsulated ASCs (EN) improved
352 wound closure kinetics with an acceleration of re-epithelialization. After 5 days post burn the
353 reepithelialisation was extensive in the explants treated with MO and EN ASCs whereas the negative
354 control has not started. Besides, in some donors, re-epithelialization has started before day 5 in MO
355 and EN conditions. Another interesting fact is that the epidermis formed in explants treated with
356 MO-ASCs appears thicker than which obtained with EN-ASCs on the images at day 10 and 15 and
357 on statistical analysis. If we admit that encapsulation increase and enrich ASCs secretion as we have
358 shown in a previous study (46), this could be the reason why scar obtained with EN-ASCs is of better
359 quality. EN-ASCs would be able to better regulate keratinocytes proliferation and matrix formation.
360 However, we need to further assess encapsulated ASCs action on the epidermis and dermis to
361 understand this thickness difference.

362 Furthermore, in our second degree burn model, keratinocytes have migrated faster from the
363 edges to the center of the burn in explant treated with encapsulated ASCs than negative control.
364 According to the pictures, this action on keratinocytes migration starts since day 5 and occurred in
365 MO and EN conditions but it was not found in statistical analysis maybe due to the limited number
366 of donors studied. However, as described in literature (28,52), ASCs have demonstrated their homing
367 property on keratinocytes in our second degree burn model which was improved by encapsulation.

368 Otherwise, the impact of ASCs treatment on dermis protein has also been studied. Negative
369 control has shown a clear decrease of procollagen III in the burn area at day 5, 10 and 15 which was
370 not as important as in explant treated with ASCs. Indeed, the low intensity correlate with a lack of
371 procollagen III was only visible at day 5 in explants treated with ASCs. Besides, statistical analysis
372 highlighted this difference at day 15 between negative control and skins treated with EN-ASCs. These
373 results suggest that ASCs and especially EN-ASCs were involved in procollagen III synthesis and
374 increase the dermal rate of procollagen III. However, the collagen III synthesis was surprisingly
375 decreased at day 5 in MO and EN conditions compared to negative control. This phenomenon could
376 be caused by the injection process which degrade the dermis particularly with EN-ASCs. Indeed, the
377 needle although quite thin (0.80 mm), causes dermis damages and the microparticles which are
378 around 500 µm of diameter create hole in dermis. Nevertheless, the level of collagen III returns to
379 normal at day 10 and even increase at day 15 for explants treated with EN-ASCs. In addition, ASCs
380 treatment accelerate kinetics of appearance of collagen I with a pic at day 10 but not its final rate.
381 ASCs have an antifibrotic effect which may explain the difference observed in collagens levels
382 between negative control and treated skins (53,54). This property allows ASCs to regulate collagens
383 production and prevent hypertrophic scar formation (55,56).

384 Thus, we demonstrated the impact of ASCs treatment on collagens but we do not get any results
385 concerning myofibroblasts. Theoretically, ASCs should promote fibroblasts conversion in

386 myofibroblasts following TGF- β 1 secretion (57) and through their angiogenic potential but we did
387 not observe such increase in myofibroblast population. One of the hypothesis is that the burn model
388 does not produce enough tension to mimic human skin in physiological condition and thus allowing
389 to observe change in myofibroblast rate.

390 To conclude, both intradermal injection of human ASCs grown as monolayer or encapsulated
391 improve wound healing by accelerating reepithelialisation and collagen I synthesis but only
392 intradermal injection of human encapsulated ASCs accelerates keratinocytes migration and increase
393 procollagen III and collagen III dermal rate in a second degree burn model.

394 This second-degree burn model on a human skin provided results on the target treatments tested
395 (hydrogel containing NaHS and ASCs injection). This model allows to test treatments in conditions
396 similar to a clinical application: either a topical application of a cream/gel/dressing or a dermal
397 injection. This makes it easier to project oneself into a concrete clinical application of the treatment.
398 We have been able to obtain very encouraging results in the use of encapsulated ASCs in the
399 treatment of second-degree burns.

400 4. Materials and Methods

401 4.1. Ethical Statement

402 Skin samples were anonymized and informed consents were obtained in accordance with the
403 ethical guidelines from Lyon University Hospital (Hospices Civils de Lyon) and the principles of the
404 Declaration of Helsinki. All the samples used in this study belong to a collection of human skin
405 samples declared to the French research ministry (Declaration no. DC-2008-162 delivered to the Bank
406 of Tissues and Cells of the Hospices Civils de Lyon).

407 4.2. Skin Explant : Burn Procedure and culture

408 All skin explants were obtained from residual tissues generated during elective
409 abdominoplasties. Burn management were carried out as previously explained (14). Briefly, the skin
410 explant is degreased, quickly rinsed with 70% ethanol and washed in phosphate buffer solution (PBS)
411 for 30 min. After obtaining a skin with a hexagonal shape of 2.5 cm on each side, it is sutured at each
412 corner on a metal grid in order to produce mechanical tension. Burns are carried out with a 10s
413 application of a metal rod immersed in water heated to 100°C. Several burns can be performed on an
414 explant in order to compare different treatments. Debridement of the burn is performed 12 hours
415 post-burn using a sterile compress.

416 Culture medium composed of DMEM supplemented with 10% FCS and antibiotics (20 mg/ml
417 gentamicin (Phanpharma), 100IU/ml penicillin (Phanpharma), and 1 mg/ml amphotericin B
418 (Phanpharma)) is added to place the skin at the air/liquid interface and replaced every other day.

419 4.3. NaHS Hydrogel Treatment

420 A poloxamer hydrogel was used as a vehicle for testing the impact of NaHS on our burn model.
421 The hydrogel generously provided by Dr. Salmon (EA4169 "Fundamental, Clinical and Therapeutic
422 Aspects of Skin Barrier Function", University of Lyon 1, Lyon, France) was composed of 25% p407
423 and p188 (5:1) poloxamers diluted in PBS1X. With this composition of poloxamers, the generated
424 hydrogel is liquid at temperatures <30°C and acquire the physical features of a gel at temperatures >
425 30°C. Since skin explants are cultured at a temperature of 37°C, the applied hydrogen is maintained
426 on the site of tested skin area.

427 For each experiment, a fresh solution of 0.25M NaHS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)
428 dissolved in PBS was prepared then add to a poloxamer hydrogel to obtain the working concentration
429 (0.25mM - 0.5mM).

430 The poloxamer hydrogel with or without NaHS is applied immediately after preparation on the
431 burn. The poloxamer hydrogel is the negative control. The hydrogel is applied daily to the burn and
432 removed after 6 hours on 3 skin donors

433 4.4. Origin, Isolation, and Culture of ASCs

434 ASCs were obtained from 3 patients (women aged 43,3 years old (range: 35–56), with a BMI of
435 22.5 kg/m² (range: 22–23,4)) undergoing liposuction of abdominal subcutaneous adipose tissue under
436 general anesthesia in the department of plastic and reconstructive surgery at Lyon university
437 hospital. Liposuction was performed with a PAL[®] LipoSculptor[™] (MicroAire Aesthetics,
438 Charlottesville, VA, USA) using a 3-mm Coleman cannula. The volume of adipose tissue obtained
439 was greater than 500 mL. Surgical residue was collected in line with French regulations, and our
440 activity was declared to French ministry for research (DC n°2008-162).

441 Stromal-vascular fraction (SVF) was isolated as previously described (32). Freshly isolated ASCs
442 were seeded at a density of 40,000 cells/cm² (passage 0, P0) in proliferation medium—DMEM
443 Glutamax (Gibco), 10% of FCS (HyClone), 10 ng/mL GMP-grade fibroblastic growth factor (FGF-2
444 GMP-grade, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), 100 U/mL penicillin (Panpharma,
445 Fougères, France), 100 µg/mL gentamicin (Panpharma), 5 µg/mL fungizone (Panpharma)—at 37 °C,
446 under humidified 5% CO₂. The medium was replaced after cells had adhered for one hour, and
447 subsequently 3 times per week. Sub-confluent cell layers (90–95%) were detached using trypsin-
448 EDTA (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), centrifuged, resuspended in complete
449 medium at 4000 cells/cm², and amplified until the number of cells was sufficient for encapsulation.

450 4.5. Encapsulation of ASCs in Alginate

451 ASCs were encapsulated as previously explained (32) to obtain microparticles of calcium
452 alginate around 500 µm of diameter. Briefly, sodium alginate (Buchi, France) was dissolved in an
453 aqueous 4% (w/v) glucose solution to produce sodium alginate solution at 2%. ASCs from each donor
454 were dispersed in 20 mL of this 2% alginate solution, at 4×10⁶ cells/mL. Then, cells were encapsulated
455 by the prilling vibration technique using the B-390 Encapsulator (Buchi, France) fitted with a 150-µm
456 nozzle. The droplets of sodium alginate containing encapsulated cells then encountered the aqueous
457 jellification solution, containing 76 mM calcium chloride (Calbiochem, France), 85 mM glucose
458 (Macopharma, France), and 6 mM HEPES (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) at physiological pH
459 and osmolarity, where the alginate microparticles were formed. Microparticles were rinsed with
460 lactated Ringer's solution (Macopharma, France) and stored in ASC culture medium.

461 4.6. ASCs Treatment

462 Encapsulated and monolayer ASCs were used for assessing their impact on wound healing on
463 our burn model. The day after the burn, burnt epidermis was removed and ASCs were intradermal
464 injected at a rate of 400 µL per burn area corresponding approximately to 350 000 monolayer cells
465 and 175 000 encapsulated cells on 6 skin donors.

466 4.7. Histological and immunohistological analysis of skin explants treated with NaHS and ASCs

467 The skin explants are harvested and analyzed as explained previously at day 5, day 10 and day
468 15 of the culture (14). Briefly, the lesioned area is excised and cut in the two pieces which were either
469 embedded in OCT and stored at -20°C until use or is immediately fixed with 4% formaldehyde before
470 being embedded in paraffin.

471 For histological analysis, paraffin-embedded formalin-fixed samples (5µm), after dewaxing and
472 rehydration, were stained with hematoxylin phloxine saffron (HPS staining : cell nuclei were stained
473 blue with hematoxylin, the cytoplasm was stained pink with phloxine, and the extracellular matrix
474 of connective tissue was stained orange/yellow with saffron).

475 For immunohistochemistry, sections were incubated with HLA- DR/DP/DQ/DX primary
476 antibody (dilution 1:1500, clone CR3/43, sc-53302, Santa Cruz Biotechnology).

477 For immunofluorescence, slides were incubated overnight at 4°C with the following primary
478 antibodies: Ki67 (dilution 1:50, clone MIB-1, GA626, DakoCytomation, Glostrup, Denmark),
479 procollagen III (dilution 1:500, clone M-58, Merck, Darmstadt, Germany), α -SMA (dilution 1:200,
480 NCL-L-SMA, Novocastra Laboratories) collagen I (dilution 1:500, Novocastra Laboratories) and
481 collagen III (dilution 1:250, Novocastra Laboratories).

482 Image acquisition was performed using a slide scanner (Axioscan Zeiss) in order to enable a
483 global view of the whole burnt area and of adjacent non-lesioned tissues.

484 4.8. Image analysis

485 Image processing and analysis were performed using the Image J software (Research Service
486 Branch, US National Institute of Health, United States). Ki67-positive epidermal cells were counted
487 and expressed as a percentage relative to the total number of nuclei in the epidermal area analyzed.
488 For α SMA, collagen I, collagen III and HLA, the surfaces covered by staining were measured and
489 expressed as % relative to the total dermal area analyzed. When needed, measurements were
490 performed at both edges of the burnt area as well as at the center of the lesioned area.

491 **Supplementary Materials:** Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/xxx/s1. Figure S1. Kinetics
492 of α -SMA dermal expression in poloxamer hydrogel-treated *ex vivo* cultured human skin explants submitted to
493 10s long experimental burn injury. Figure S2. Kinetics of collagen I dermal expression in poloxamer hydrogel-
494 treated *ex vivo* cultured human skin explants submitted to 10s long experimental burn injury. Figure S3. Kinetics
495 of collagen III dermal expression in poloxamer hydrogel-treated *ex vivo* cultured human skin explants submitted
496 to 10s long experimental burn injury. Figure S4. Kinetics of HLA expression in poloxamer hydrogel-treated *ex*
497 *vivo* cultured human skin explants submitted to 10s long experimental burn injury. Figure S5. Kinetics of α -SMA
498 dermal expression in ASCs-treated *ex vivo* cultured human skin explants submitted to 10s long experimental
499 burn injury. Figure S6. Kinetics of collagen III dermal expression in ASCs-treated second degree burn model.
500 Figure S7. Kinetics of collagen I dermal expression in ASCs-treated second degree burn model.

501 **Author Contributions:** L.C., conceptualization, investigation, visualization, data curation, and data writing
502 (original draft preparation); O.G.-A., conceptualization, investigation, visualization, data curation, and data
503 writing (original draft preparation); M.C., investigation; M-R.R., writing (review and editing); M.G.,
504 investigation; D.S., investigation and conceptualization; A.M., supervision, C.A., conceptualization, data
505 curation, supervision, funding acquisition, and data writing (original draft preparation); S.N., conceptualization,
506 data curation, supervision, funding acquisition, and data writing (original draft preparation).

507 **Funding:** This research was funded by a grant (to S.N. and C.A.) and a doctoral scholarship (to O.G.-A.) from
508 the French association for research on spa waters (AFRETH: "Association Française pour la Recherche
509 Thermale").

510 **Acknowledgments:** This research was also supported by the "Ministère de L'Éducation Nationale,
511 L'Enseignement Supérieur et de la Recherche", by INSERM, Hospices Civils de Lyon, University Claude Bernard
512 Lyon-1.

513 We wish to thanks Bruno Chapuis from the CIQLE (Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est, Faculté de
514 médecine Lyon-Est, 69008, Lyon, France) which has really helped us in image analysis and protein
515 quantification.

516 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

517 Abbreviations

| | |
|--------------|-------------------------------|
| ASCs | Adipose-derived stem cells |
| α SMA | α -smooth muscle actin |
| EN | Encapsulated |
| HLA | human leukocyte antigen |
| MO | Monolayer |

NC Negative control

518 References

- 519 1. Greenhalgh DG. Management of Burns. *The New England Journal of Medicine*. 13 2019;380(24):2349-59.
- 520 2. Finnerty CC, Jeschke MG, Branski LK, Barret JP, Dziewulski P, Herndon DN. Hypertrophic scarring: the
521 greatest unmet challenge following burn injury. *Lancet*. 1 oct 2016;388(10052):1427-36.
- 522 3. Jeschke MG, Shahrokhi S, Finnerty CC, Branski LK, Dibildox M. Wound Coverage Technologies in Burn
523 Care: Established Techniques. *J Burn Care Res*. 2018;39(3):313-8.
- 524 4. Saeidinia A, Keihanian F, Lashkari AP, Lahiji HG, Mobayyen M, Heidarzade A, et al. Partial-thickness
525 burn wounds healing by topical treatment: A randomized controlled comparison between silver
526 sulfadiazine and centiderm. *Medicine*. mars 2017;96(9):e6168.
- 527 5. Wasiak J, Cleland H, Campbell F, Spinks A. Dressings for superficial and partial thickness burns.
528 *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 28 mars 2013 [cité 11 oct 2020];2013(3). Disponible sur:
529 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7065523/>
- 530 6. Auxenfans C, Menet V, Catherine Z, Shipkov H, Lacroix P, Bertin-Maghit M, et al. Cultured autologous
531 keratinocytes in the treatment of large and deep burns: a retrospective study over 15 years. *Burns*. févr
532 2015;41(1):71-9.
- 533 7. Coolen NA, Vlig M, van den Bogaerd AJ, Middelkoop E, Ulrich MMW. Development of an in vitro burn
534 wound model. *Wound Repair Regen*. août 2008;16(4):559-67.
- 535 8. Emanuelsson P, Kratz G. Characterization of a new in vitro burn wound model. *Burns*. 1 févr
536 1997;23(1):32-6.
- 537 9. Qu M, Kruse S, Pitsch H, Pallua N, Nourbakhsh M. Viability of human composite tissue model for
538 experimental study of burns. *Discov Med*. 2016;22(119):19-28.
- 539 10. Holzer J, Tiffner K, Kainz S, Reisenegger P, Bernardelli de Mattos I, Funk M, et al. A novel human ex-
540 vivo burn model and the local cooling effect of a bacterial nanocellulose-based wound dressing. *Burns*
541 [Internet]. 3 juill 2020 [cité 8 oct 2020]; Disponible sur:
542 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305417920304459>
- 543 11. Sivamani R, Pullar C, Manabat-Hidalgo C, Rocke D, Carlsen R, Greenhalgh D, et al. Stress-Mediated
544 Increases in Systemic and Local Epinephrine Impair Skin Wound Healing: Potential New Indication for
545 Beta Blockers. *PLoS medicine*. 13 janv 2009;6:e12.
- 546 12. Balaji S, Moles CM, Bhattacharya SS, LeSaint M, Dhamija Y, Le LD, et al. Comparison of interleukin 10
547 homologs on dermal wound healing using a novel human skin ex vivo organ culture model. *J Surg Res*.
548 juill 2014;190(1):358-66.
- 549 13. Tomic-Canic M, Mamber SW, Stojadinovic O, Lee B, Radoja N, McMichael J. Streptolysin O enhances
550 keratinocyte migration and proliferation and promotes skin organ culture wound healing in vitro.
551 *Wound Repair Regen*. févr 2007;15(1):71-9.
- 552 14. Gross-Amat O, Guillen M, Salmon D, Nataf S, Auxenfans C. Characterization of a Topically Testable
553 Model of Burn Injury on Human Skin Explants. *Int J Mol Sci*. 2020;18.
- 554 15. Huang A, Seité S, Adar T. The use of balneotherapy in dermatology. *Clin Dermatol*. juin 2018;36(3):363-8.
- 555 16. Carbajo JM, Maraver F. Sulphurous Mineral Waters: New Applications for Health. *Evid Based*
556 *Complement Alternat Med* [Internet]. 2017 [cité 29 avr 2020];2017. Disponible sur:
557 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5397653/>

- 558 17. Carubbi C, Gobbi G, Bucci G, Gesi M, Vitale M, Mirandola P. Skin, Inflammation and Sulfurous Waters: What is Known, What is Believed. *Eur J Inflamm.* sept 2013;11(3):591-9.
559
560 18. Gianfaldoni S, Tchernev G, Wollina U, Rocchia MG, Fioranelli M, Gianfaldoni R, et al. History of the Baths and Thermal Medicine. *Open Access Maced J Med Sci.* 23 juill 2017;5(4):566-8.
561
562 19. Parihar A, Parihar MS, Milner S, Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns.* févr 2008;34(1):6-17.
563
564 20. Sahib AS, Al-Jawad FH, Al-Kaisy AA. Burns, Endothelial Dysfunction, and Oxidative Stress: the Role of Antioxidants. *Ann Burns Fire Disasters.* 31 mars 2009;22(1):6-11.
565
566 21. Sahib AS, Al-Jawad FH, Alkaisy AA. Effect of Antioxidants on the Incidence of Wound Infection in Burn Patients. *Ann Burns Fire Disasters.* 31 déc 2010;23(4):199-205.
567
568 22. Roshangar L, Soleimani Rad J, Kheirjou R, Reza Ranjkesh M, Ferdowsi Khosroshahi A. Skin Burns: Review of Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Wounds.* déc 2019;31(12):308-15.
569
570 23. Li P, Guo X. A review: therapeutic potential of adipose-derived stem cells in cutaneous wound healing and regeneration. *Stem Cell Res Ther.* 8 nov 2018;9(1):302.
571
572 24. Salgado AJBOG, Reis RLG, Sousa NJC, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther.* juin 2010;5(2):103-10.
573
574 25. Kachgal S, Putnam AJ. Mesenchymal stem cells from adipose and bone marrow promote angiogenesis via distinct cytokine and protease expression mechanisms. *Angiogenesis.* mars 2011;14(1):47-59.
575
576 26. Bertheuil N, Chaput B, Ménard C, Varin A, Laloze J, Watier E, et al. Adipose mesenchymal stromal cells: Definition, immunomodulatory properties, mechanical isolation and interest for plastic surgery. *Ann Chir Plast Esthet.* févr 2019;64(1):1-10.
577
578 27. Maria ATJ, Toupet K, Maumus M, Fonteneau G, Le Quellec A, Jorgensen C, et al. Human adipose mesenchymal stem cells as potent anti-fibrosis therapy for systemic sclerosis. *J Autoimmun.* 2016;70:31-9.
579
580 28. De Becker A, Riet IV. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World J Stem Cells.* 26 mars 2016;8(3):73-87.
581
582 29. Angoulvant D, Ivanov F, Ferrera R, Matthews PG, Nataf S, Ovize M. Mesenchymal stem cell conditioned media attenuates in vitro and ex vivo myocardial reperfusion injury. *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 1 janv 2011;30(1):95-102.
583
584
585
586 30. Gneccchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 21 nov 2008;103(11):1204-19.
587
588 31. Ma J, Yan X, Lin Y, Tan Q. Hepatocyte growth factor secreted from human adipose-derived stem cells inhibits fibrosis in hypertrophic scar fibroblasts. *Curr Mol Med.* 5 janv 2020;
589
590 32. Capin L, Abbassi N, Lachat M, Calteau M, Barratier C, Mojallal A, et al. Encapsulation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Calcium Alginate Maintains Clonogenicity and Enhances their Secretory Profile. *Int J Mol Sci.* 31 août 2020;21(17).
591
592
593 33. Gross-Amat O, Guillen M, Gimeno J-P, Salzet M, Lebonvallet N, Misery L, et al. Molecular Mapping of Hydrogen Sulfide Targets in Normal Human Keratinocytes. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. juill 2020 [cité 21 sept 2020];21(13). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7369889/>
594
595
596
597 34. Zhi L, Ang AD, Zhang H, Moore PK, Bhatia M. Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via the ERK-NF-kappaB pathway. *J Leukoc Biol.* mai 2007;81(5):1322-32.
598
599

- 600 35. Zhang J, Sio SWS, Mochhala S, Bhatia M. Role of hydrogen sulfide in severe burn injury-induced
601 inflammation in mice. *Mol Med.* oct 2010;16(9-10):417-24.
- 602 36. Li L, Bhatia M, Moore PK. Hydrogen sulphide--a novel mediator of inflammation? *Curr Opin Pharmacol.*
603 avr 2006;6(2):125-9.
- 604 37. Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, et al. Hydrogen sulfide is a novel mediator of
605 lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J.* juill 2005;19(9):1196-8.
- 606 38. Guo L, Peng W, Tao J, Lan Z, Hei H, Tian L, et al. Hydrogen Sulfide Inhibits Transforming Growth Factor-
607 β 1-Induced EMT via Wnt/Catenin Pathway. *PLoS One.* 2016;11(1):e0147018.
- 608 39. Hellmich MR, Szabo C. Hydrogen Sulfide and Cancer. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;230:233-41.
- 609 40. Baskar R, Bian J. Hydrogen sulfide gas has cell growth regulatory role. *Eur J Pharmacol.* 10 avr
610 2011;656(1-3):5-9.
- 611 41. Eberle FC, Brück J, Holstein J, Hirahara K, Ghoreschi K. Recent advances in understanding psoriasis.
612 *F1000Res* [Internet]. 28 avr 2016 [cité 1 oct 2020];5. Disponible sur:
613 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4850872/>
- 614 42. Danilenko DM. An Overview of the Pathogenesis of Immune-mediated Skin Injury. *Toxicol Pathol.*
615 2016;44(4):536-44.
- 616 43. Ud-Din S, Bayat A. Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo,
617 and in vivo models of wounds and scars in human skin. *Wound Repair and Regeneration.*
618 2017;25(2):164-76.
- 619 44. Mojallal A, Lequeux C, Shipkov C, Rifkin L, Rohrich R, Duclos A, et al. Stem cells, mature adipocytes,
620 and extracellular scaffold: what does each contribute to fat graft survival? *Aesthetic Plast Surg.* déc
621 2011;35(6):1061-72.
- 622 45. de Vos P, Lazarjani HA, Poncelet D, Faas MM. Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell
623 perspective. *Adv Drug Deliv Rev.* avr 2014;67-68:15-34.
- 624 46. Capin L, Abbassi N, Lachat M, Calteau M, Barratier C, Mojallal A, et al. Encapsulation of Adipose-
625 Derived Mesenchymal Stem Cells in Calcium Alginate Maintains Clonogenicity and Enhances their
626 Secretory Profile. *Int J Mol Sci.* 31 août 2020;21(17).
- 627 47. Vos P de, Hoogmoed CG, Busscher HJ. Chemistry and biocompatibility of alginate-PLL capsules for
628 immunoprotection of mammalian cells. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2002;60(2):252-9.
- 629 48. Orive G, Ponce S, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M, Pedraz JL. Biocompatibility of microcapsules
630 for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials.* 1 sept
631 2002;23(18):3825-31.
- 632 49. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human
633 adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British
634 Journal of Haematology.* 2005;129(1):118-29.
- 635 50. McIntosh KR. Evaluation of cellular and humoral immune responses to allogeneic adipose-derived
636 stem/stromal cells. *Methods Mol Biol.* 2011;702:133-50.
- 637 51. Hassan WU, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair
638 Regen.* juin 2014;22(3):313-25.
- 639 52. Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Morine Y, et al. Homing effect of adipose-
640 derived stem cells to the injured liver: the shift of stromal cell-derived factor 1 expressions. *J
641 Hepatobiliary Pancreat Sci.* déc 2014;21(12):873-80.

- 642 53. Deng J, Shi Y, Gao Z, Zhang W, Wu X, Cao W, et al. Inhibition of Pathological Phenotype of Hypertrophic
643 Scar Fibroblasts Via Coculture with Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Eng Part A*. 2018;24(5-6):382-93.
- 644 54. Zarei F, Abbaszadeh A. Stem cell and skin rejuvenation. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*. 3 avr
645 2018;20(3):193-7.
- 646 55. Bliley JM, Argenta A, Satish L, McLaughlin MM, Dees A, Tompkins-Rhoades C, et al. Administration of
647 adipose-derived stem cells enhances vascularity, induces collagen deposition, and dermal adipogenesis
648 in burn wounds. *Burns*. sept 2016;42(6):1212-22.
- 649 56. Domergue S, Bony C, Maumus M, Toupet K, Frouin E, Rigau V, et al. Comparison between Stromal
650 Vascular Fraction and Adipose Mesenchymal Stem Cells in Remodeling Hypertrophic Scars. *PLoS ONE*.
651 2016;11(5):e0156161.
- 652 57. Leonov YuI, Shkumat MS, Klymenko PP, Hovorun MYu, Guzyk MM, Kuchmerovska TM, et al. Effect of
653 insulin-like growth factor transgene on wound healing in mice with streptozotocin-induced diabetes.
654 *Cytol Genet*. 1 janv 2015;49(1):19-26.
- 655

656



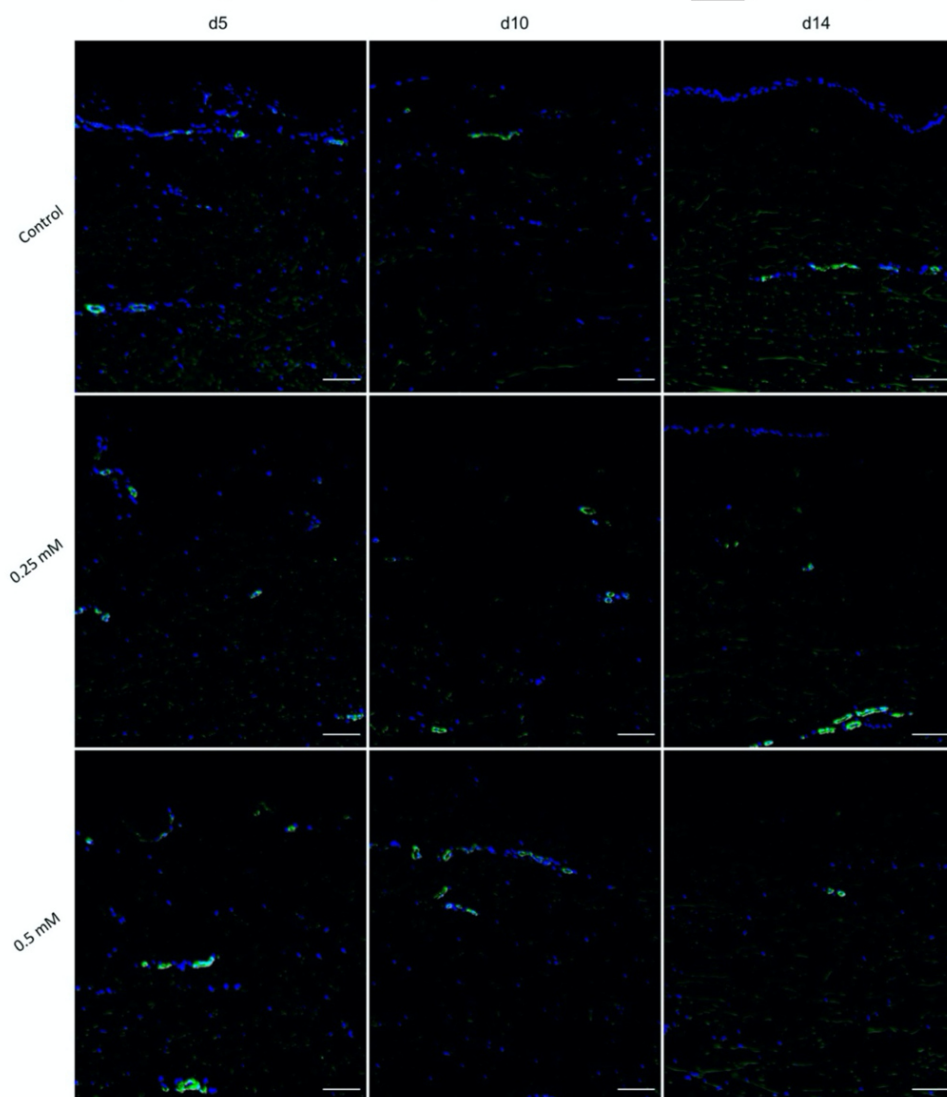
© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

657

NaHS-hydrogel and encapsulated Adipose-derived stem cells evaluation on an ex-vivo second degree burn model

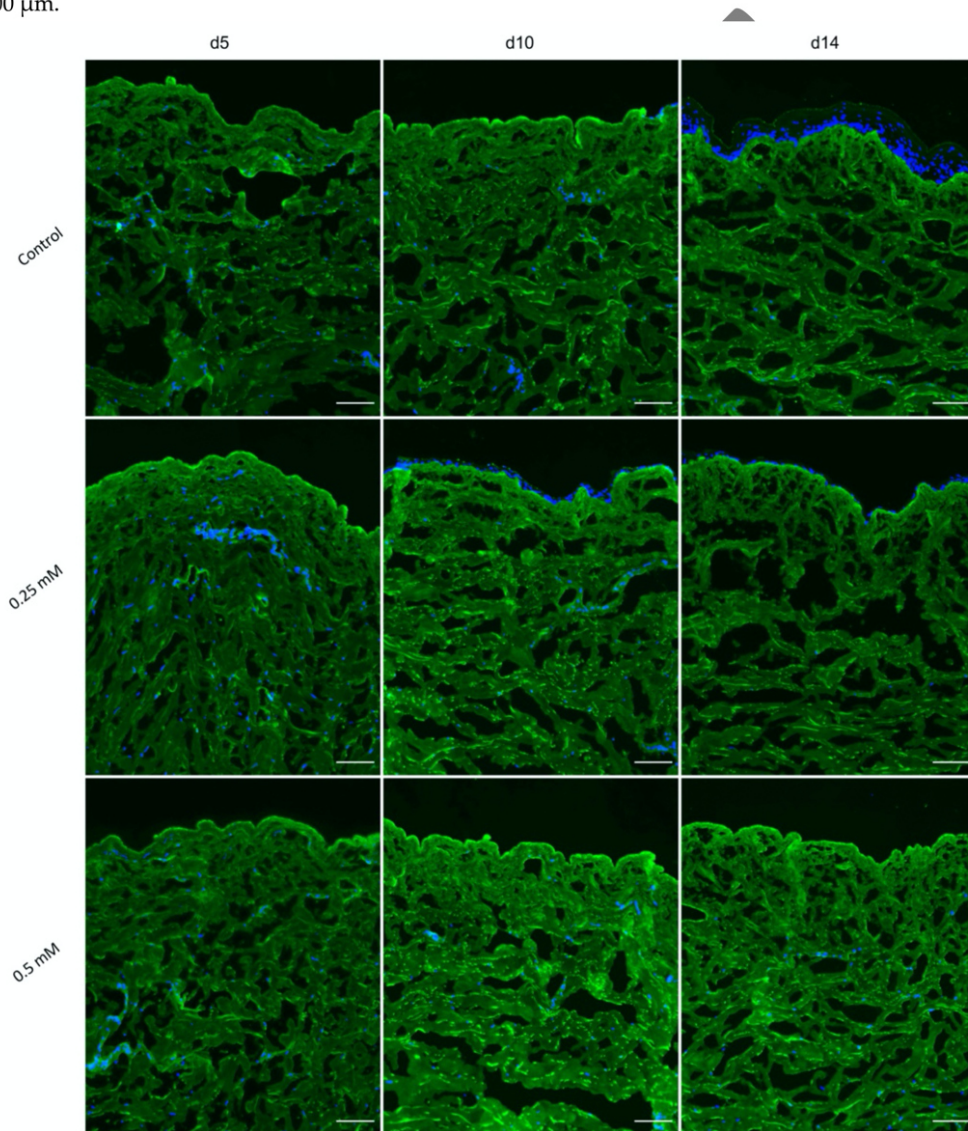
Supplementary Materials

Figure S1. Kinetics of α -SMA dermal expression in poloxamer hydrogel-treated *ex vivo* cultured human skin explants submitted to 10s long experimental burn injury. Immunostainings of α -SMA were performed on human skin explants harvested at different time points post-burn (days 5, 10 and 14). After wound debridement, on day 1, daily treatment with poloxamer p407/p188 hydrogel was applied containing or not NaHS: Control (upper panels), 0.25 mM (middle panels) and 0.5 mM (bottom panels). No significant difference was observed when comparing the different conditions, irrespective of the time point considered following burn injury. Results obtained for each condition are representative of 3 series of experiments performed on skin explants derived from 3 donors. Scale bar: 100 μ m.



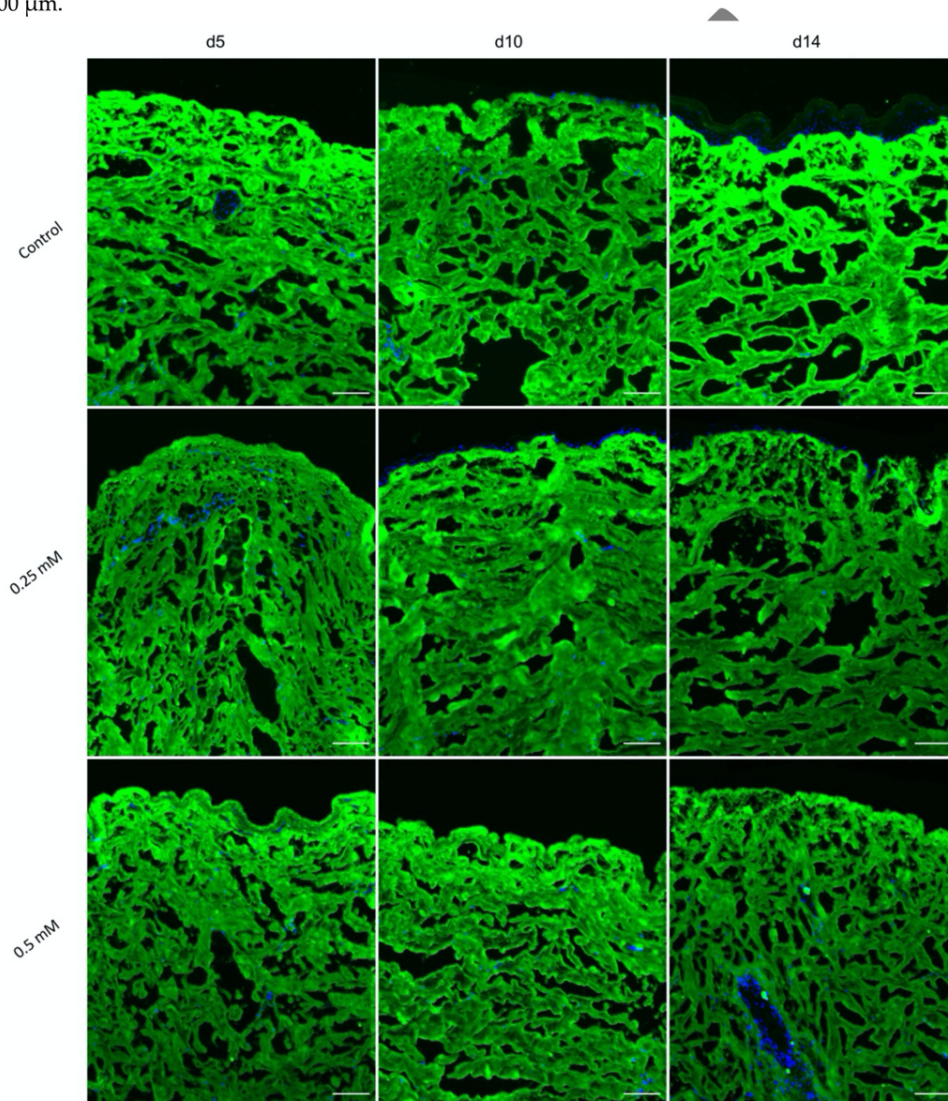
NaHS-hydrogel and encapsulated Adipose-derived stem cells evaluation on an ex-vivo second degree burn model

Figure S2. Kinetics of collagen I dermal expression in poloxamer hydrogel-treated *ex vivo* cultured human skin explants submitted to 10s long experimental burn injury. Immunostainings of collagen I were performed on human skin explants harvested at different time points post-burn (days 5, 10 and 14). After wound debridement, on day 1, daily treatment with poloxamer p407/p188 hydrogel was applied containing or not NaHS: Control (upper panels), 0.25 mM (middle panels) and 0.5 mM (bottom panels). No significant difference was observed when comparing the different conditions, irrespective of the time point considered following burn injury. Results obtained for each condition are representative of 3 series of experiments performed on skin explants derived from 3 donors. Scale bar: 100 μ m.



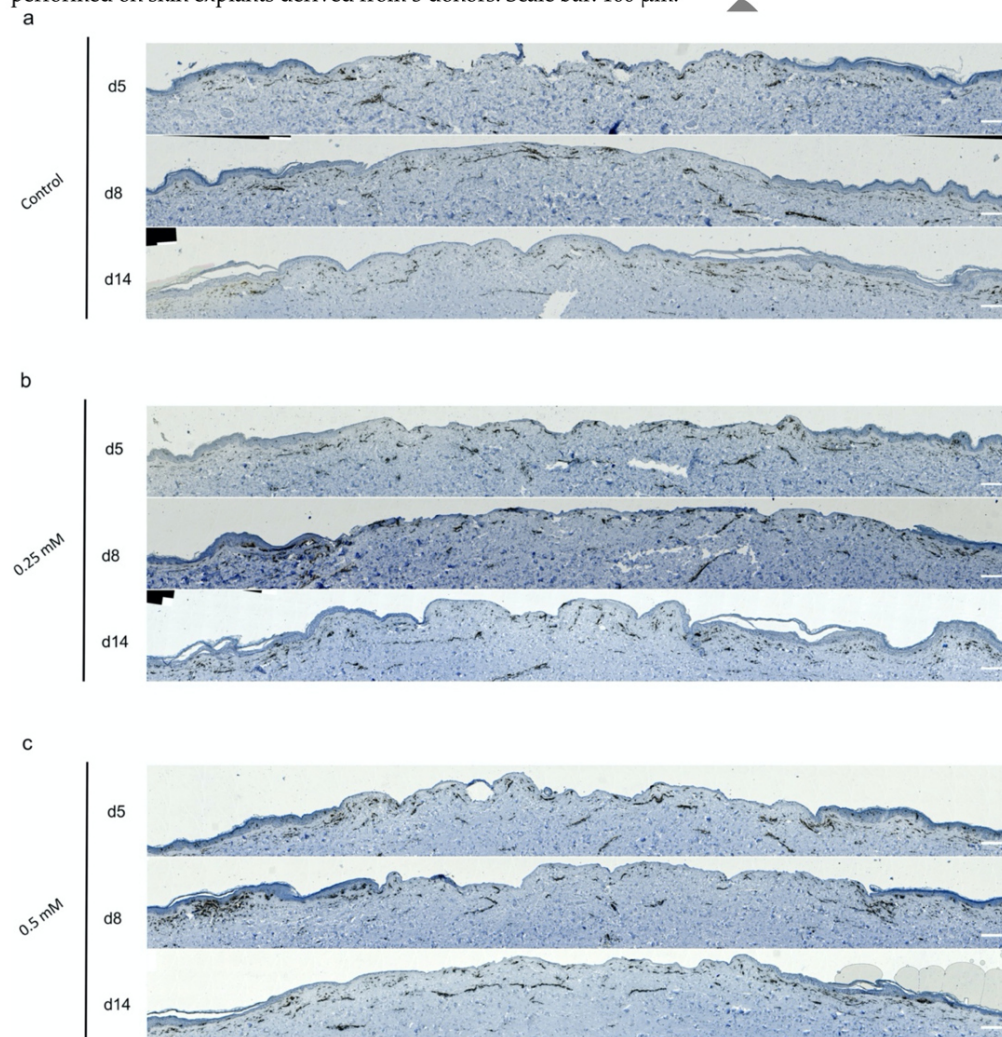
NaHS-hydrogel and encapsulated Adipose-derived stem cells evaluation on an ex-vivo second degree burn model

Figure S3. Kinetics of collagen III dermal expression in poloxamer hydrogel-treated *ex vivo* cultured human skin explants submitted to 10s long experimental burn injury. Immunostainings of collagen III were performed on human skin explants harvested at different time points post-burn (days 5, 10 and 14). After wound debridement, on day 1, daily treatment with poloxamer p407/p188 hydrogel was applied containing or not NaHS: Control (upper panels), 0.25 mM (middle panels) and 0.5 mM (bottom panels). No significant difference was observed when comparing the different conditions, irrespective of the time point considered following burn injury. Results obtained for each condition are representative of 3 series of experiments performed on skin explants derived from 3 donors. Scale bar: 100 μ m.



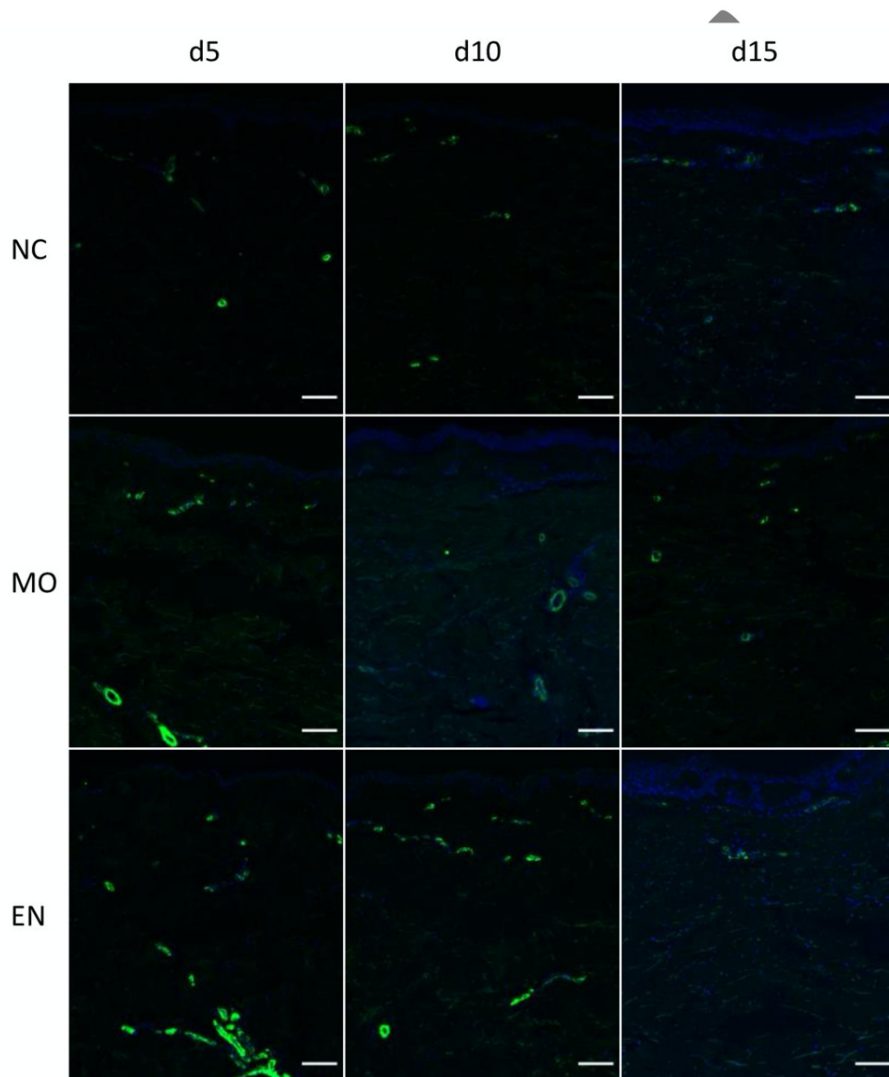
NaHS-hydrogel and encapsulated Adipose-derived stem cells evaluation on an ex-vivo second degree burn model

Figure S4. Kinetics of HLA expression in poloxamer hydrogel-treated *ex vivo* cultured human skin explants submitted to 10s long experimental burn injury. Immunostainings of HLA were performed on human skin explants harvested at different time points post-burn (days 5, 8 and 14). After wound debridement, on day 1, daily treatment with poloxamer p407/p188 hydrogel was applied containing or not NaHS: Control (a), 0.25 mM (b) and 0.5 mM (c). At day 8, an increase of HLA staining is observed for lesion treated with NaHS (0.25 and 0.5 mM)-poloxamer hydrogel compared to lesion treated with only poloxamer hydrogel. At day 14, this increase is no longer present and the staining is comparable to the control. Results obtained for each condition are representative of 3 series of experiments performed on skin explants derived from 3 donors. Scale bar: 100 μ m.



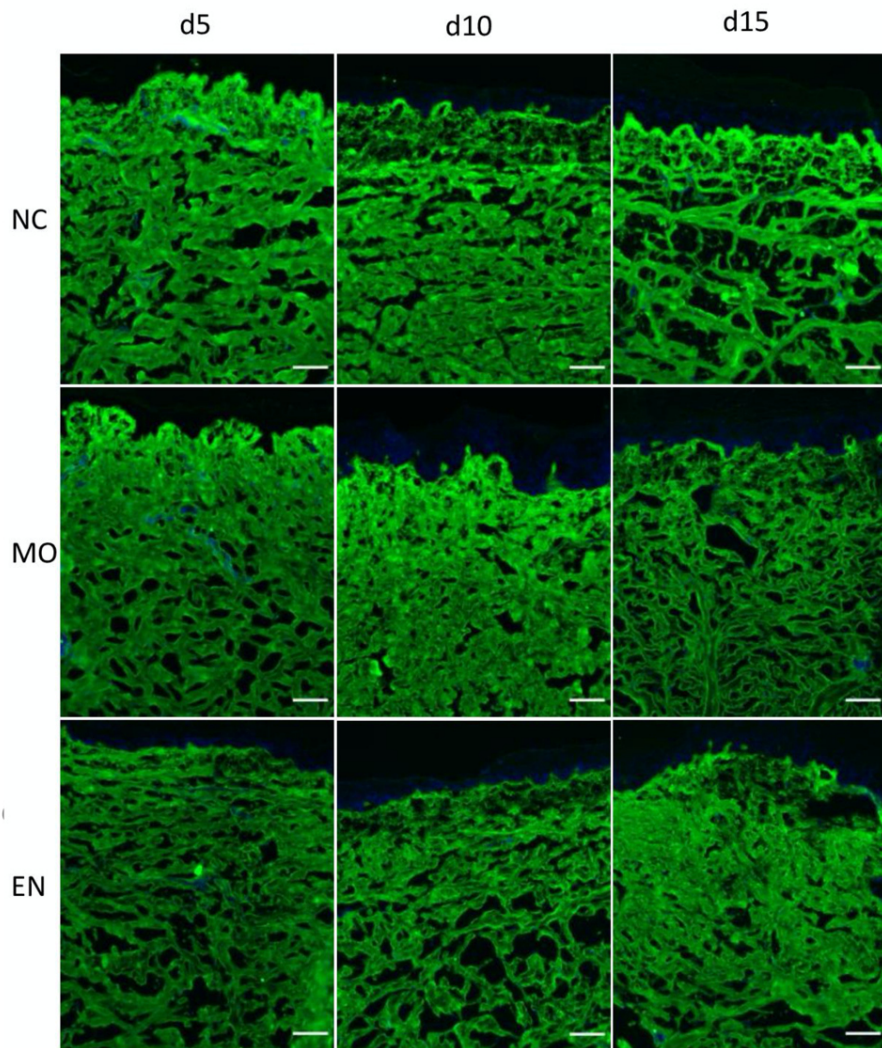
NaHS-hydrogel and encapsulated Adipose-derived stem cells evaluation on an ex-vivo second degree burn model

Figure S5. Kinetics of α -SMA dermal expression in ASCs-treated *ex vivo* cultured human skin explants submitted to 10 s long experimental burn injury. Immunostainings of α -SMA were performed on human skin explants harvested at different time points post-burn (days 5, 10 and 15). After wound debridement, on day 1, monolayer ASCs (MO) (middle panels) and encapsulated ASCs (EN) (bottom panels) were intradermal injected. In the negative control (NC) (upper panels) no cell were injected. No significant difference was observed when comparing the different conditions, irrespective of the time point considered following burn injury. Results obtained for each condition are representative of 6 series of experiments performed on skin explants derived from 6 donors. Scale bar: 100 μ m.



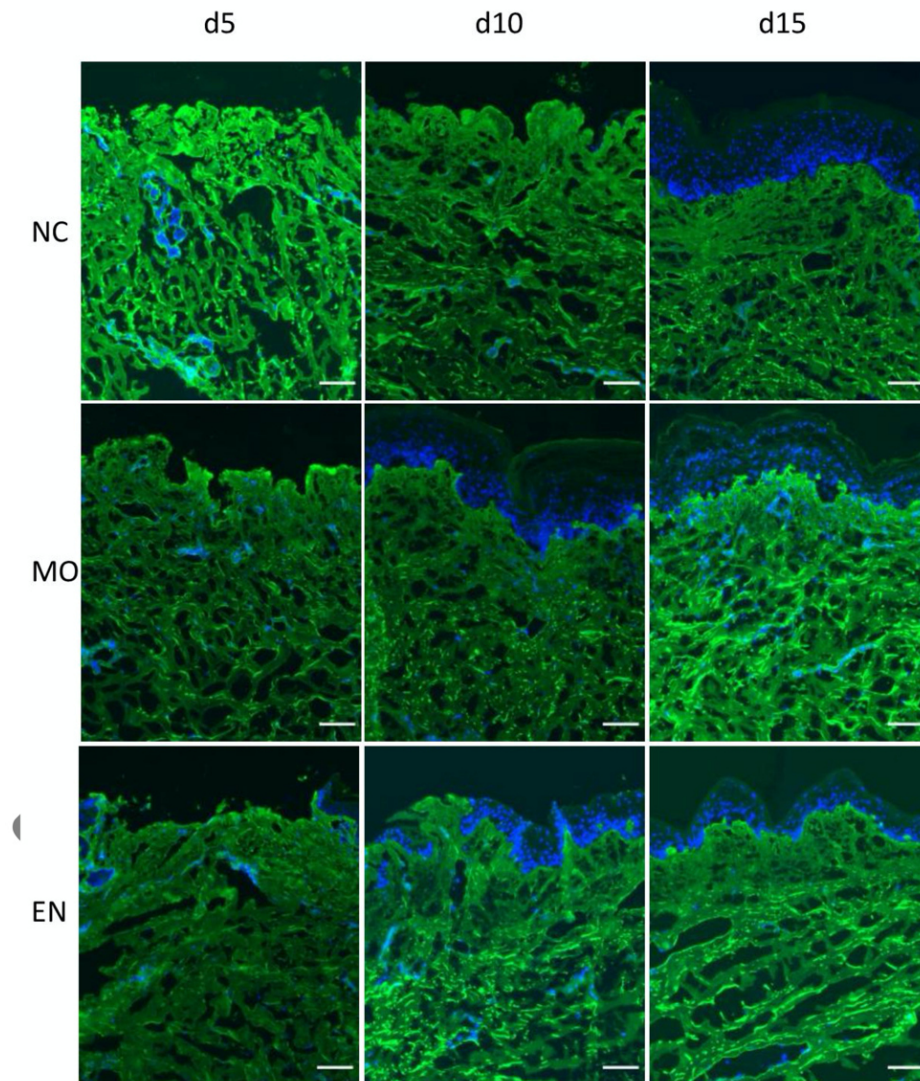
NaHS-hydrogel and encapsulated Adipose-derived stem cells evaluation on an ex-vivo second degree burn model

Figure S6. Kinetics of collagen III dermal expression in ASCs-treated second degree burn model. Immunostainings of collagen III were performed on human skin explants harvested at different time points post-burn (days 5, 10 and 15). After wound debridement, on day 1, monolayer ASCs (MO) (middle panels) and encapsulated ASCs (EN) (bottom panels) were intradermal injected. In the negative control (CN) (upper panels) no cell were injected. Scale bar: 100 μ m.



NaHS-hydrogel and encapsulated Adipose-derived stem cells evaluation on an ex-vivo second degree burn model

Figure S7. Kinetics of collagen I dermal expression in ASCs-treated second degree burn model. Immunostainings of collagen I were performed on human skin explants harvested at different time points post-burn (days 5, 10 and 15). After wound debridement, on day 1, monolayer ASCs (MO) (middle panels) and encapsulated ASCs (EN) (bottom panels) were intradermal injected. In the negative control (CN) (upper panels) no cell were injected. Scale bar: 100 μ m.



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les kératinocytes ont un rôle central dans les interactions cellulaires entre les différents types cellulaires de la peau, notamment les cellules immunitaires mais également les neurones. Le rôle essentiel des kératinocytes dans l'immunité est maintenant admis. Ils vont servir à la fois dans la détection de signaux danger, le recrutement et l'activation du système immunitaire (sécrétion de cytokines et chémokines) et soit le retour à l'homéostasie tissulaire via une étape de réparation, soit le développement d'une la boucle inflammatoire (ex : psoriasis, dermatite atopique).

Nous nous sommes intéressés dans ces travaux à l'impact de l'H₂S sur les fonctions principalement immunitaires, des kératinocytes. Le rôle d'H₂S est encore controversé bien que des effets bénéfiques soient observés lors de cures thermales en eaux sulfurées utilisées notamment pour le traitement de pathologies dermatologiques inflammatoires.

Nous avons pu déterminer différents rôles de l'H₂S sur les kératinocytes : i) rôle pro-inflammatoire, ii) rôle antiprolifératif et iii) un rôle antioxydant. De plus, des travaux réalisés en collaboration avec le Laboratoire Interactions Epitheliums Neurones à l'université de Bretagne Occidentale (Nicolas Lebonvallet, Laurent Misery) nous ont permis d'investiguer les effets potentiels de l'H₂S sur les interactions kératinocytes/neurones. Ces premières expérimentations n'ont pas permis de mettre en évidence un impact de l'H₂S sur l'interaction kératinocyte/neurones. Ces résultats préliminaires sont détaillés en annexes.

Rôle inflammatoire

Dans un modèle de feuillet épidermique, le NaHS a entraîné une stimulation de la sécrétion de différentes cytokines pro-inflammatoires : IL-8, CXCL2, IL-18, IL-1 β . Les résultats obtenus quant aux effets pro-inflammatoire du NaHS sur les kératinocytes *in vitro* sont en contradiction avec les résultats précédemment observés dans des études similaires étudiant l'impact du NaHS sur des lignées de kératinocytes (Mirandola et al., 2011; Yang et al., 2011). Toutefois, l'effet anti-inflammatoire rapporté dans ces études a été observé dans un contexte de stimulation par une molécule pro-inflammatoire telle que l'IL-1 β . A contrario, dans nos conditions expérimentales, le NaHS stimule la synthèse d'IL-8 de façon synergique avec le TNF-alpha. On peut noter que les effets pro-inflammatoire du NaHS ont été largement démontrés dans d'autres types cellulaires et modèles *in vivo*. Contrairement à certaines hypothèses (Whiteman et al., 2010), nous n'avons pas observé d'effet anti-inflammatoire à faible concentration et d'effet pro-

inflammatoire à forte concentration. Nos travaux ont mis en évidence un effet pro-inflammatoire du NaHS dès 0,025 mM.

L'analyse génomique a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de la caspase-1, nous conduisant à investiguer la voie l'inflammasome, en utilisant un inhibiteur de la caspase-1. Nous avons conclu que la sécrétion d'IL-18 induite par le NaHS passe bien par la voie de la caspase-1. En revanche la sécrétion de l'IL-1 β induite par le NaHS ne semble pas passer par la voie de la caspase-1. De plus le NaHS stimule également la production de la pro-IL-1 β (Figure 49).

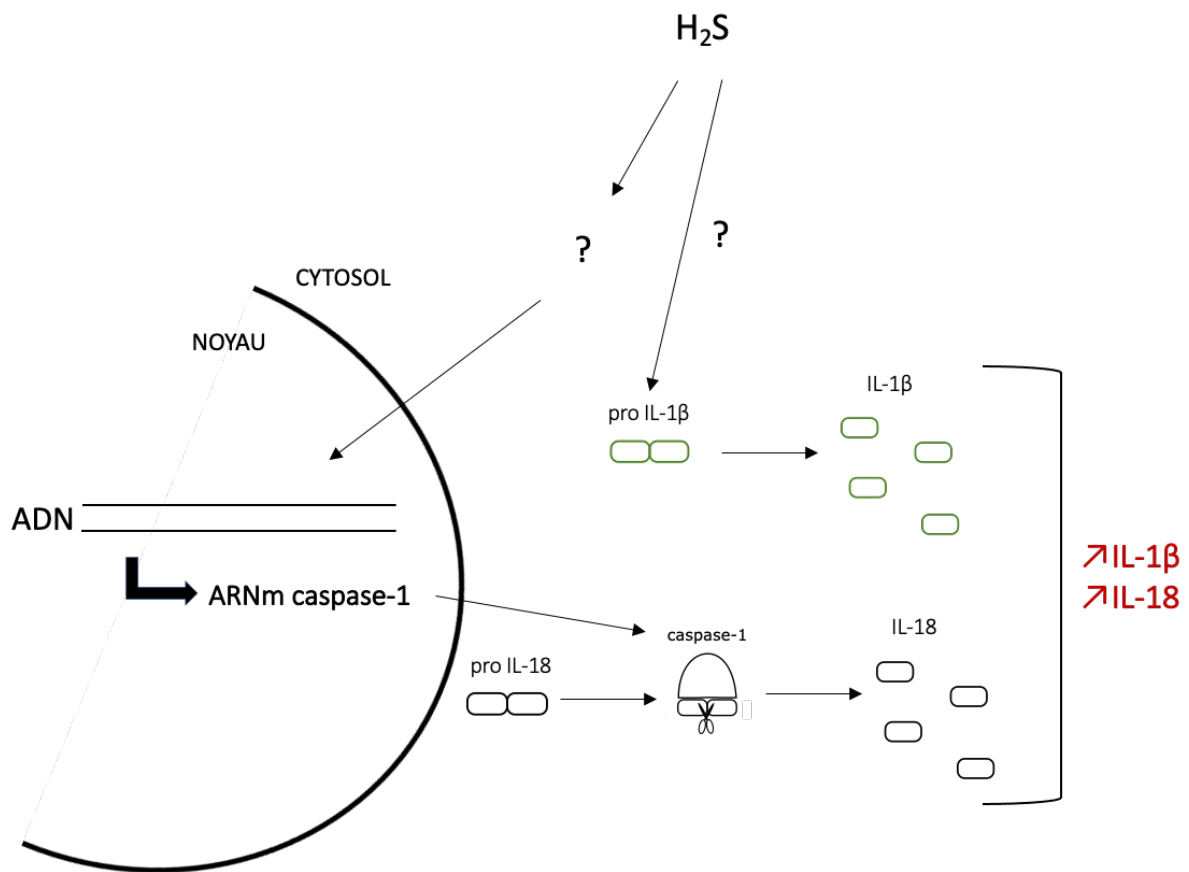


Figure 49. Stimulation d'IL-1 β et IL-18 par H₂S. H₂S stimule la transcription de la caspase-1 qui entraîne via l'inflammasome l'augmentation de la sécrétion d'IL-18. En revanche la voie par laquelle le H₂S augmente la quantité de pro IL-1 β et, même de façon minime, la sécrétion d'IL-1 β reste à identifier.

Des études ont également montré que le NaHS stimulait la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires en activant la voie NF- κ B. L'analyse des termes GO annotant les gènes modulés par le NaHS confirment la stimulation de la voie NF- κ B.

Nous avons également observé une légère augmentation du marquage HLA spécifique de cellules possédant un CMH de classe II (macrophage, cellules dendritiques, monocytes, neutrophiles) lors de l'application topique du NaHS sur la brûlure. Cette augmentation pourrait être expliquée par une sécrétion de cytokines et chémokines des kératinocytes induite par le NaHS. Cette augmentation est localisée en bordure de plaie, au niveau des kératinocytes, ce qui renforce alors l'hypothèse d'un lien entre les kératinocytes et les cellules immunitaires stimulées par le NaHS.

Un rôle anti-inflammatoire est généralement associé au H₂S pour l'amélioration des conditions cutanées inflammatoires. Cependant, les eaux sulfurées entraînent également des rougeurs, un signe triptyque classique de d'inflammation (rougeur, douleur, chaleur). Comme nous avons pu le voir, l'inflammation est une étape essentielle de la cicatrisation d'une plaie, puisqu'elle favorise l'élimination des débris cellulaires par les phagocytes, stimule la migration et la prolifération de cellules souches et progéniteurs kératinocytaires, et induit la néosynthèse de protéines matricielles impliquées dans le remodelage tissulaire du derme. Il est possible que l'inflammation induite par l'H₂S puisse donc stimuler un processus de cicatrisation ou, dans le cas de pathologies inflammatoires chroniques, puisse induire une boucle de rétrocontrôle conduisant in fine à un rétablissement de l'homéostasie tissulaire.

Rôle antioxydant

Nos données montrent que les kératinocytes humains exposés au NaHS engagent une réponse de stress oxydant impliquant SOD2, NQO1 et CUL3. Nous avons également observé que la liste des cibles moléculaires actuellement connues étant modulées par les composés riches en résidus sulfurés est très significativement enrichie en gènes de réponse au stress antioxydant. Comme nous avons pu le voir dans la partie bibliographique (chapitre 3. 5.2.4), dans d'autres modèles et types cellulaires, le NaHS induit une réponse antioxydante par la régulation positive de SOD1, SOD2, CAT (catalase) et/ou GPX (glutathion peroxydase 1). Cette régulation est essentiellement médiée par le facteur de transcription Nrf2 (Liang et al., 2018; Wen et al., 2013; Zhao et al., 2018). Puisque la culline 3 (CUL3), promeut la dégradation de Nrf2, la hausse de l'expression de CUL3 induit par le NaHS dans les kératinocytes humains pourrait être le reflet

d'une boucle de rétrocontrôle négatif visant à mettre fin à la réponse au stress oxydatif. Cette boucle est incluse dans l'activation de la voie Nrf2. Ces résultats nous laissent supposer que le NaHS induit donc une réponse antioxydante dans les kératinocytes humains en passant par la voie Nrf2. Le NaHS entraînerait la dislocation du complexe Nrf2-Keap1-Cul3, conduisant à la translocation au noyau de Nrf2 et la stimulation de la transcription de gènes de réponses au stress oxydant dont SOD2, NQO1 et CUL3 (Figure 50).

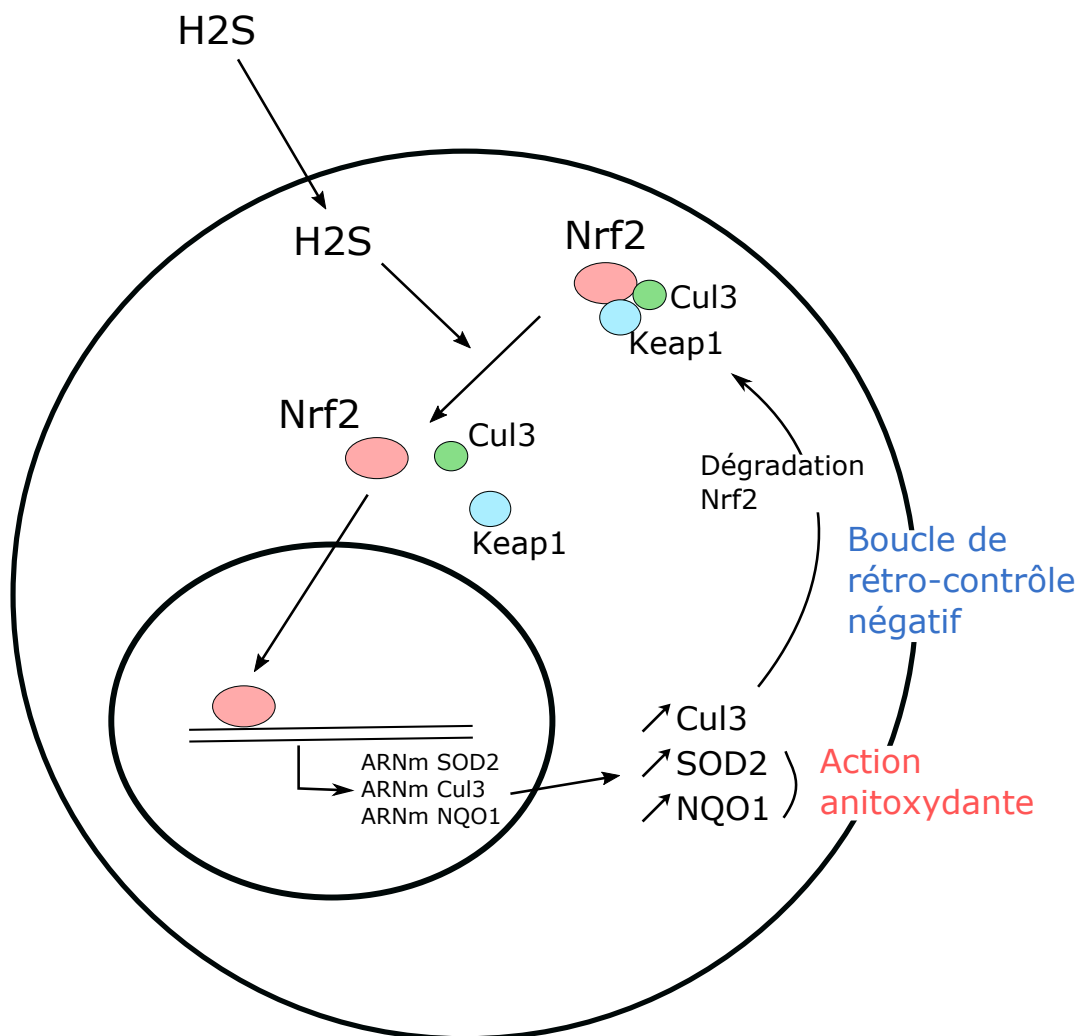


Figure 50. Rôle antioxydant d'H₂S : voie Nrf2. L'H₂S stimule la translocation de Nrf2 dans le noyau qui stimule à son tour la transcription de gènes antioxydants tels que SOD2, NQO1 et également Cul3, ce dernier étant impliqué dans la dégradation de Nrf2 et participant ainsi à la régulation négative du signal.

Rôle antiprolifératif

Trois de nos observations démontrent un effet antiprolifératif dose-dépendant du NaHS sur les kératinocytes : i) la diminution de la taille des colonies lors du test de clonogénicité des cellules souches épidermiques, ii) la diminution du nombre de kératinocytes après stimulation au NaHS en modèle feuillet épidermique, iii) la diminution de la réépithélialisation associée à une diminution du nombre de cellules en prolifération dans l'épiderme lors de la cicatrisation de la brûlure traité à l'hydrogel au NaHS dans le modèle *ex vivo* de brûlure du 2^{ème} degré sur explant de peau humaine.

De la même manière que pour l'inflammation, un effet dose dépendant est observé, avec effet plus important à forte concentration. Il n'a pas été observé de stimulation de la prolifération quelle que soit la concentration testée. Cette diminution de la prolifération des kératinocytes a été rapportée dans le papier de Gobbi *et al* sur la lignée NCTC 2544 (Gobbi et al., 2009), alors que l'étude de Xie *et al* a montré une stimulation de la prolifération par le NaHS sur la lignée HaCaT (Xie et al., 2016). Ainsi, bien que l'impact de l'H₂S sur la prolifération cellulaire restait controversé, nos résultats démontrent un effet antiprolifératif de l'H₂S sur les kératinocytes primaires humains.

Bien que cette propriété de l'H₂S n'explique pas l'amélioration des plaies chroniques par les eaux thermales sulfurées, il permet d'expliquer les bienfaits de l'H₂S dans le contexte du psoriasis. La diminution de la prolifération pourrait en effet permettre de diminuer le développement des plaques psoriasiques dues à une hyperprolifération des kératinocytes.

Il serait intéressant d'investiguer la voie de signalisation de l'H₂S impliquée dans l'inhibition de la prolifération des cellules souches et progéniteurs kératinocytaires. L'analyse génomique nous a montré une augmentation de l'expression du « Growth differentiation factor 15 » (GDF15) suite à la stimulation des feuillets épidermiques par le NaHS. L'accumulation de GDF15 est associée à différents processus cellulaires comme la croissance, la différenciation et l'apoptose (Ichikawa et al., 2008). La diminution de la prolifération induite par le NaHS pourrait être provoquée par une stimulation de la différenciation passant par l'augmentation de

GDF15. Cependant nous n'avons pas pu vérifier cette augmentation de GDF15 au niveau protéique par dosage ELISA.

Certaines études ont montré une induction de l'apoptose par H₂S, notamment via une stimulation de la caspase-3 (Ryazantseva et al., 2011; Yang et al., 2004; Zheng et al., 2016). La diminution de la prolifération observée pourrait être due à une stimulation de l'apoptose des kératinocytes. L'analyse des termes GO annotant les gènes modulés par le NaHS montrent que 3 des termes GO sur 11 statistiquement significatifs sont associés à l'apoptose :

- Voie de signalisation apoptotique extrinsèque (« Extrinsic apoptotic signaling pathway »)
- Processus apoptotique (« Apoptotic process »)
- Régulation négative de la voie de signalisation apoptotique extrinsèque (« Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway »)

Nous n'avons toutefois pas observé d'impact du NaHS sur la viabilité des kératinocytes (test MTT, coloration au bleu de trypan) suggérant donc l'absence d'effets sur l'apoptose.

L'impact antiprolifératif de l'H₂S n'est pas dû à une stimulation de l'apoptose. Il serait alors intéressant à l'avenir d'investiguer par quelle voie de signalisation l'H₂S induit cet effet.

Intérêt du modèle *ex vivo*

Ces travaux nous ont permis de mettre en place, comme nous avons pu le voir, un modèle *ex vivo* de brûlure du 2^{ème} degré sur peau humaine afin d'observer l'impact du NaHS sur la cicatrisation. Ainsi nous avons pu étudier la cicatrisation post-brûlure de la peau en restant dans un modèle humain tout en se rapprochant du modèle *in vivo*. Pour cela, la culture s'est faite à l'interface air/liquide et l'explant a été mis sous tension mécanique.

Nous avons pu montrer que le NaHS entraîne une diminution de la réépithélialisation et une diminution de la synthèse de procollagène III. Nous n'avons pas observé de modulation des marquages du collagène I et III. Cependant le travail de Lucille Capin sur le modèle (article n°3) a montré une augmentation de collagène I et III après injection d'ASCs encapsulés. Le modèle de brûlure *ex vivo* a également été utilisé afin d'évaluer le potentiel thérapeutique d'une

formulation supplémentée en vitamines A, E et C dans le cadre du travail de thèse de pharmacie de Lucille Bourgue (Bourgue, 2018).

Dans notre étude, le NaHS a entraîné un retard dans les différents paramètres liés à la cicatrisation (réépithélialisation, prolifération des kératinocytes, synthèse de procollagène III). Cependant le modèle *ex vivo* de brûlure du 2^{ème} degré a également permis de mettre en évidence, dans les travaux de Lucille Capin, l'amélioration de la cicatrisation de la brûlure après l'injection d'ASCs avec une accélération de la réépithélialisation de la plaie, une augmentation du nombre de kératinocytes en prolifération et une stimulation du remodelage tissulaire (augmentation des protéines du derme : procollagène III, collagène III et collagène I).

Certaines limites sont néanmoins à relever. La peau en culture *ex vivo* ne se renouvelle pas. Nous avons pu observer une diminution du nombre de cellules en prolifération dans la couche basale jusqu'à leur absence au bout de 15 jours de culture environ. Ces résultats correspondent aux conclusions d'autres études utilisant un modèle similaire *ex vivo* (Steinstraesser et al., 2009; Xu et al., 2012). Il est donc difficile d'étudier des phases tardives de la cicatrisation, comme le développement d'une cicatrice hypertrophique par exemple. De plus, nous n'avons pas observé d'activation des myofibroblastes au niveau de la brûlure (absence de modulation du marquage α SMA). Coolen et son équipe ont évoqué que cette absence d'activation des myofibroblastes pourrait être due à une absence de tension ou de facteurs dans le milieu de culture (Coolen et al., 2008), les fibroblastes étant dotés de propriétés mécaniques pouvant détecter des forces physiques. La mise en tension dans notre modèle pourrait ne pas être suffisante pour stimuler les fibroblastes. Un autre défaut du modèle est l'absence de circulation sanguine. Afin d'améliorer le modèle, il conviendrait d'ajouter dans le milieu de culture certains facteurs, particulièrement des facteurs trophiques dérivés du sang tels que le TGF- β 1, l'EGF (epidermal growth factor) et le PDGF (platelet-derived growth factor) afin à la fois de maintenir le renouvellement des kératinocytes et également de stimuler les fibroblastes (Chong et al., 2020; Demidova-Rice et al., 2012; Jeschke et al., 2020; Yamakawa and Hayashida, 2019).

Un autre point à améliorer concerne les biais dû à l'expérimentateur lors de la pose de la tige métallique. Un système automatisé appliquant une force identique entre chaque expérimentation permettrait de générer des brûlures plus homogènes.

Dans notre modèle, une tige métallique de 0,5 mm chauffée à 100°C est appliquée sur la peau. Une cicatrisation spontanée de la brûlure est visible. Ainsi il est possible d'observer, comme

nous avons pu le voir avec l'application de NaHS et l'injection d'ASCs, des effets respectivement délétères et bénéfiques pour la cicatrisation. Cependant, nous ne reproduisons pas les effets induits par une brûlure étendue. De plus, nous nous plaçons dans un environnement stérile, ce qui implique que les effets antibactériens et antifongiques de l'H₂S, pouvant notamment être due à son action antioxydante, ne sont pas observables.

Une perspective intéressante serait d'évaluer dans le milieu de culture l'impact du traitement en analysant par exemple le taux de ROS et la sécrétion de cytokines et chémokines. Il serait également intéressant de pouvoir passer à un modèle où une seule brûlure est réalisée par explant, et par conséquent une seule condition est analysée par explant. Les différents points d'amélioration évoqués sont regroupés **Figure 51**.

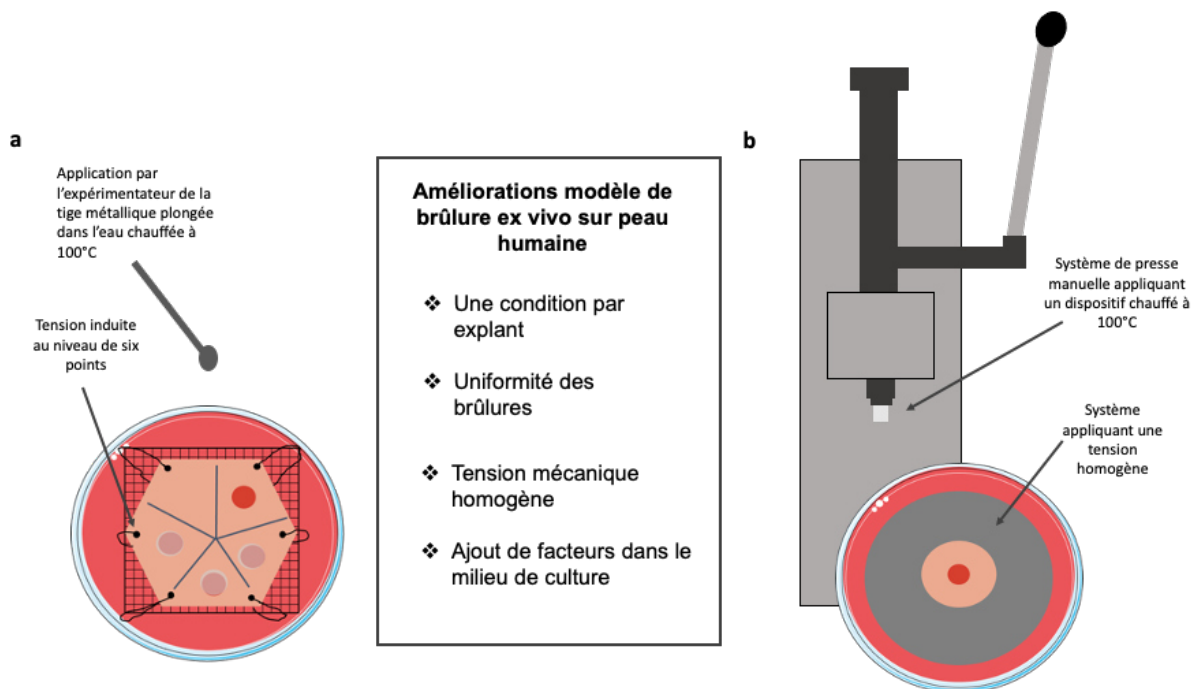


Figure 51. Points d'améliorations du modèle de brûlure ex vivo. (a) Modèle actuel. L'explant est mis en tension au niveau de 6 points par un système de suture. La brûlure est obtenue par l'application d'une tige métallique plongée dans l'eau chauffée à 100°C. Quatre brûlures sont réalisées par explant. (b) Un système de mise en tension de la peau similaire à l'étude de Steinstraesser permettrait une homogénéité de la tension sur tout l'explant (Steinstraesser et al., 2009). Un système automatisé de la brûlure permettrait d'éviter le biais induit par l'expérimentateur lors de la pose de la tige métallique (dispositif inspirée de l'étude de vitro (Hettler et al., 2013)). Une unique condition par explant permettrait d'évaluer dans le milieu de culture l'impact des différents traitements.

Notre modèle ex vivo de brûlure nous a permis de confirmer l'effet antiprolifératif de l'H₂S observé in vitro sur cultures primaires de kératinocytes. Bien que cet effet ne permette

d'expliquer le rôle bénéfique de l'H₂S des eaux thermales dans l'amélioration des plaies chroniques, il peut expliquer le bienfait de l'H₂S dans le traitement du psoriasis.

Puisqu'il a été mis en place un modèle de culture *ex vivo* de peau provenant de lésions psoriasiques (Tiirikainen et al., 2020), il serait intéressant d'étudier les effets de l'application du NaHS sur une plaque psoriasique sur un modèle de culture d'explant de lésions psoriasiques *ex vivo*.

Pour conclure, l'H₂S présente des propriétés antiprolifératives, antioxydantes et pro-inflammatoires lorsqu'il est appliqué à des kératinocytes (**Figure 52**). L'intérêt thérapeutique mais également physiopathologique de ces observations requière de nouvelles explorations et, possiblement, de nouveaux modèles d'études. En particulier, l'augmentation de la sécrétion de cytokines et chémokines pourrait induire un recrutement et une activation des cellules immunitaires de la peau. Un modèle enrichi de peau reconstruite permettrait d'explorer cette thématique dans les meilleures conditions chez l'humain.

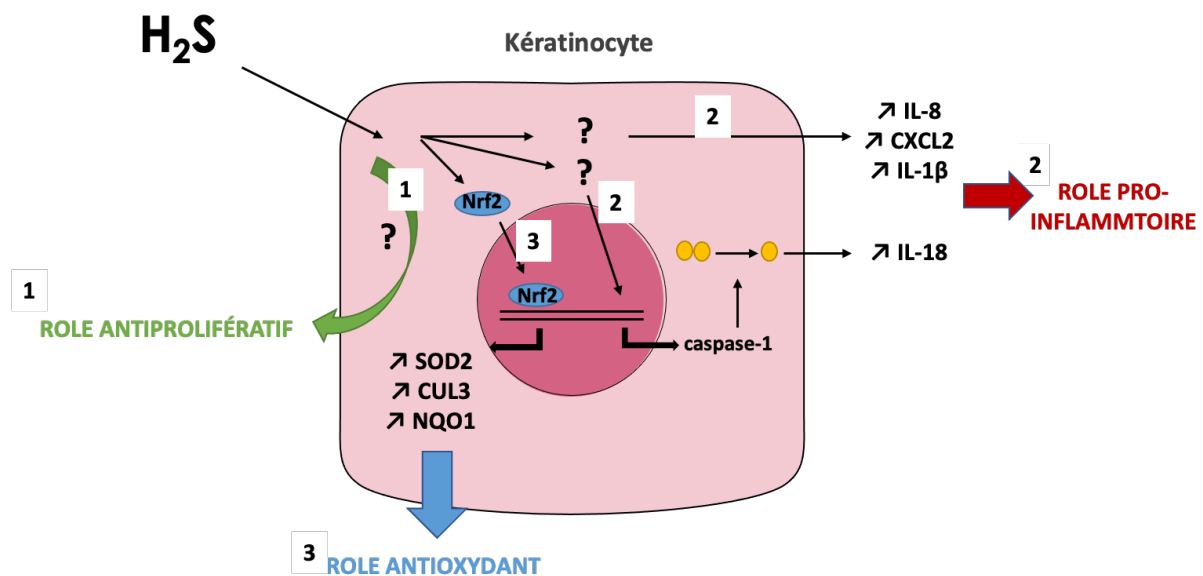


Figure 52. Effets de l'H₂S sur les kératinocytes humains. 1) Rôle antiprolifératif ; 2) Rôle pro-inflammatoire : voie de l'inflammasome (augmentation de l'expression de la caspase-1 et de la sécrétion d'IL-18 et de l'IL-1β ; stimulation de la sécrétion des cytokines et chémokines IL-8 et CXCL2) ; 3) Rôle antioxydant : voie Nrf2 (augmentation de l'expression de SOD2, CUL3 et NQO1).

Au total, nous avons pu explorer des voies d'actions et déterminer les effets de l'H₂S sur les kératinocytes sur modèle physiologique *in vitro* (article 1) et sur un modèle *ex vivo* physiopathologique de brûlure cutanée (article 3). Ce modèle *ex vivo* a été caractérisé et validé

avant de tester l'impact de l'H₂S (article 2). L'ensemble de ce travail offre de nouveaux éclaircissements sur les effets biologiques de l'H₂S et de nouvelles pistes d'études pour une utilisation thérapeutique de l'H₂S.

ANNEXES

Impact de l'H₂S sur l'interaction entre kératinocytes et neurones

Dans le cadre du projet, nous nous sommes également intéressés à l'impact de l'H₂S sur l'interaction entre les kératinocytes et les neurones. Les neurones ont un rôle essentiel dans la peau, notamment dans la transmission d'informations provenant de l'environnement extérieur. Ils sont également impliqués dans des processus pathologiques. Le prurit notamment, symptôme qu'on retrouve dans des pathologies cutanées comme le psoriasis et la dermatite atopique, implique l'activation de fibres nerveuses. Les neurones activés par des récepteurs spécifiques vont libérer des neuromédiateurs comme la substance P, la somatostatine (Misery, 2014), mais les kératinocytes sont également impliqués dans la détection de la molécule déclenchant le prurit (Dong and Dong, 2018). Les neurones sont également impliqués lors de la cicatrisation cutanée, en stimulant notamment la prolifération kératinocytaire et la réépithélialisation ainsi que la réparation des fibres nerveuses (Emmerson, 2017). Des neurotransmetteurs comme la substance P et le NGF (Nerve Growth Factor) ont notamment été montré comme améliorant la cicatrisation en stimulant la réépithélialisation (Blais et al., 2014; Laverdet et al., 2015). L'impact de l'H₂S sur les neurones cutanés a été étudié dans le contexte du prurit, cependant comme pour beaucoup d'effets observés de l'H₂S, des rôles contraires sont retrouvés. Le NaHS a été vu à la fois comme le stimulant le prurit, en activant les canaux calciques de type T (Gadotti et al., 2020; Wang et al., 2015) ou l'atténuant en passant notamment par l'inhibition de récepteurs spécifiques des neurones liés au déclenchement des démangeaisons (PAR-2, type-2 proteinase-activated receptors) (Coavoy-Sánchez et al., 2016). Il a été également observé une augmentation de la quantité de substance P dans des poumons provenant de souris après ajout de NaHS (Ang et al., 2011; Bhatia et al., 2006; Zhang et al., 2007), cette augmentation de substance P est liée à une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-1 β et le TNF- α (Bhatia et al., 2006).

J'ai pu réaliser dans le Laboratoire Interactions Epitheliums Neurones (EA4685) à l'université de Bretagne Occidentale une exploration expérimentale des effets de l'H₂S sur les neurocompétences des kératinocytes. Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact des molécules sécrétées par les kératinocytes après stimulation au NaHS et/ou TNF- α sur la pousse des neurites, c'est-à-dire le prolongement cellulaire, des neurones (lignée PC12). Cependant les kératinocytes stimulés avec du NaHS, en présence ou non de TNF- α , n'ont pas induit de pousse des neurites (**Figure 53**, voir en annexes). Un dosage ELISA du NGF a été réalisé sur le surnageant des kératinocytes stimulés au NaHS, mais aucune modulation du taux protéique n'a été observé.

Enfin un dosage de la substance P a été cette fois réalisé sur des neurones provenant de la racine dorsale de rat (DRG) stimulés au NaHS et/ au TNF- α . Nous n'avons pas pu observer de différences en fonction des conditions (**Figure 54**, voir en annexes).

Les résultats actuels ne nous permettent donc pas d'établir un lien entre l'H₂S et les interactions entre kératinocytes et neurones.

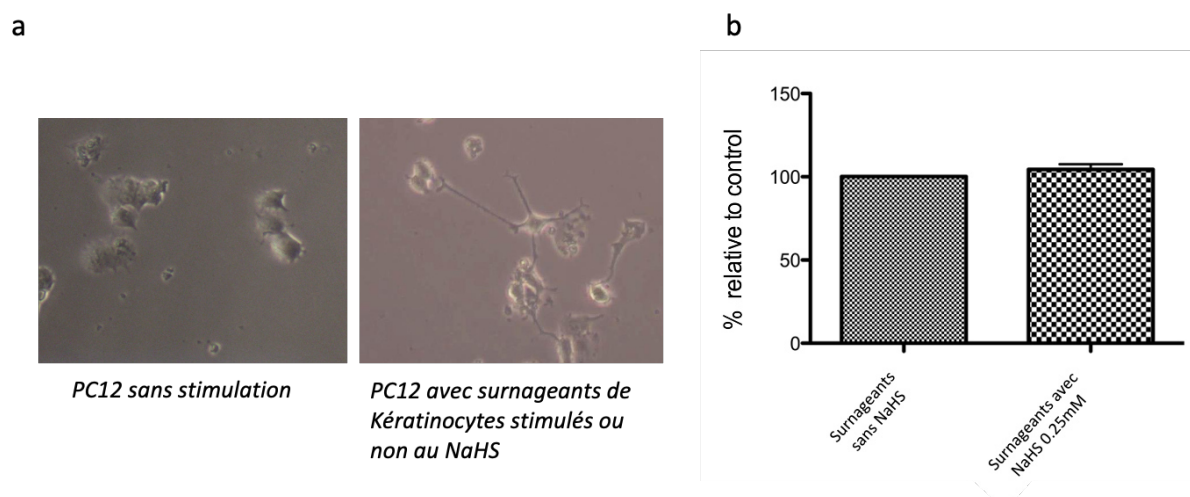


Figure 53. Les kératinocytes stimulés au NaHS n'induisent pas la pousse des neurites de PC12. Les neurones PC12 (une ligné provenant d'une tumeur neuroendocrinienne de rat) ont été cultivé dans du milieu de culture de kératinocytes stimulés pendant 24h au NaHS (0,25mM). (a) Visualisation de la pousse des neurites lorsque l'on ajoute du surnageant de kératinocytes (b) Mesure de la longueur des neurites.

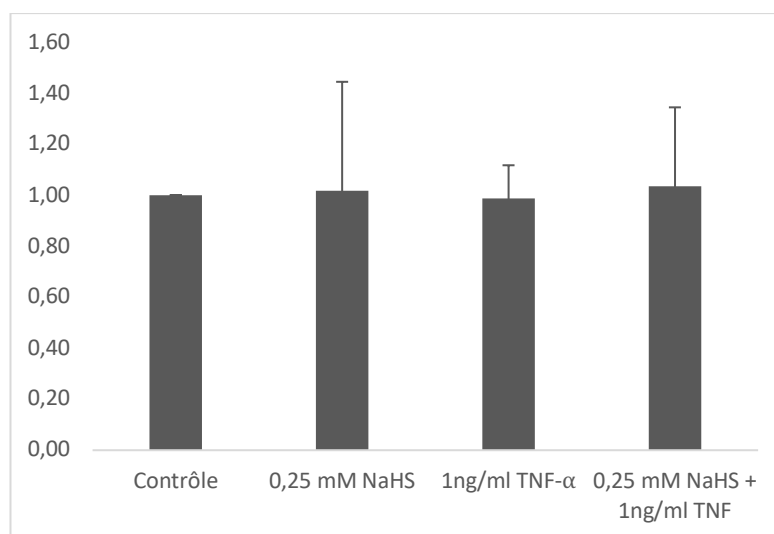


Figure 54. Le NaHS ne stimule pas la sécrétion de la substance P des DRGN (Dorsal Root Ganglion Neurons). Dosage de la sécrétion de la substance P des neurones provenant de la racine dorsale de rat stimulés au NaHS (0,25 mM) et/ou au TNF- α (1ng/ml).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdallah, F., Mijouin, L., and Pichon, C. (2017). Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. *Mediators Inflamm* 2017.
- Akter, F. (2016). The role of hydrogen sulfide in burns. *Burns* 42, 519–525.
- Albanesi, C., Madonna, S., Gisondi, P., and Girolomoni, G. (2018). The Interplay Between Keratinocytes and Immune Cells in the Pathogenesis of Psoriasis. *Front Immunol* 9.
- Alhajj, M., Bansal, P., and Goyal, A. (2020). Physiology, Granulation Tissue. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Alonso, J.-R., Cardellach, F., López, S., Casademont, J., and Miró, O. (2003). Carbon monoxide specifically inhibits cytochrome c oxidase of human mitochondrial respiratory chain. *Pharmacol Toxicol* 93, 142–146.
- Andrade, T.A., Aguiar, A.F., Guedes, F.A., Leite, M.N., Caetano, G.F., Coelho, E.B., Das, P.K., and Frade, M.A. (2015). Ex vivo Model of Human Skin (hOSEC) as Alternative to Animal use for Cosmetic Tests. *Procedia Engineering* 110, 67–73.
- Ang, S.-F., Moochhala, S.M., MacAry, P.A., and Bhatia, M. (2011). Hydrogen Sulfide and Neurogenic Inflammation in Polymicrobial Sepsis: Involvement of Substance P and ERK-NF- κ B Signaling. *PLOS ONE* 6, e24535.
- Ansel, J.C., Tiesman, J.P., Olerud, J.E., Krueger, J.G., Krane, J.F., Tara, D.C., Shipley, G.D., Gilbertson, D., Usui, M.L., and Hart, C.E. (1993). Human keratinocytes are a major source of cutaneous platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* 92, 671–678.
- Avena-Woods, C. (2017). Overview of atopic dermatitis. *Am J Manag Care* 23, S115–S123.
- Barrandon, Y., and Green, H. (1987). Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 2302–2306.
- Bełtowski, J. (2015). Hydrogen sulfide in pharmacology and medicine--An update. *Pharmacol Rep* 67, 647–658.
- Benchoam, D., Cuevasanta, E., Möller, M.N., and Alvarez, B. (2019). Hydrogen Sulfide and Persulfides Oxidation by Biologically Relevant Oxidizing Species. *Antioxidants (Basel)* 8.
- Bhatia, M. (2012). Role of Hydrogen Sulfide in the Pathology of Inflammation. *Scientifica (Cairo)* 2012.
- Bhatia, M., Zhi, L., Zhang, H., Ng, S.-W., and Moore, P.K. (2006). Role of substance P in hydrogen sulfide-induced pulmonary inflammation in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 291, L896–L904.
- Blachier, F., Davila, A.-M., Mimoun, S., Benetti, P.-H., Atanasiu, C., Andriamihaja, M., Benamouzig, R., Bouillaud, F., and Tomé, D. (2010). Luminal sulfide and large intestine mucosa: friend or foe? *Amino Acids* 39, 335–347.
- Blais, M., Mottier, L., Germain, M.-A., Bellenfant, S., Cadau, S., and Berthod, F. (2014). Sensory Neurons Accelerate Skin Reepithelialization via Substance P in an Innervated Tissue-Engineered Wound Healing Model. *Tissue Eng Part A* 20, 2180–2188.
- Blanpain, C., and Fuchs, E. (2006). Epidermal Stem Cells of the Skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 339–373.
- Bode, M. Characterization of type I and type III collagens in human tissues. 76.
- Bourgue, L. (2018). Développement et étude d'efficacité ex-vivo d'une préparation antimicrobienne cicatrisante pour le traitement des brûlures.
- Braverman, I.M. (2000). The cutaneous microcirculation. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 5, 3–9.
- Breitkreutz, D., Mirancea, N., and Nischt, R. (2009). Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? *Histochem. Cell Biol.* 132, 1–10.
- Breitkreutz, D., Koxholt, I., Thiemann, K., and Nischt, R. (2013). Skin Basement Membrane: The Foundation of Epidermal Integrity—BM Functions and Diverse Roles of Bridging Molecules Nidogen and Perlecan. *Biomed Res Int* 2013.
- Brown, T.M., and Krishnamurthy, K. (2020). Histology, Dermis. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL):

- StatPearls Publishing), p.
- Burguera, E.F., Vela-Anero, Á., Magalhães, J., Meijide-Faílde, R., and Blanco, F.J. (2014). Effect of hydrogen sulfide sources on inflammation and catabolic markers on interleukin β -stimulated human articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 22, 1026–1035.
- Cai, W.-J., Wang, M.-J., Moore, P.K., Jin, H.-M., Yao, T., and Zhu, Y.-C. (2007). The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation. *Cardiovasc Res* 76, 29–40.
- Cao, C., Sun, Y., Healey, S., Bi, Z., Hu, G., Wan, S., Kouttab, N., Chu, W., and Wan, Y. (2006). EGFR-mediated expression of aquaporin-3 is involved in human skin fibroblast migration. *Biochem J* 400, 225–234.
- Capes-Davis, A., Theodosopoulos, G., Atkin, I., Drexler, H.G., Kohara, A., MacLeod, R.A.F., Masters, J.R., Nakamura, Y., Reid, Y.A., Reddel, R.R., et al. (2010). Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer* 127, 1–8.
- Capin, L., Abbassi, N., Lachat, M., Calteau, M., Barratier, C., Mojallal, A., Bourgeois, S., and Auxenfans, C. (2020). Encapsulation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Calcium Alginate Maintains Clonogenicity and Enhances their Secretory Profile. *Int J Mol Sci* 21.
- Carbajo, J.M., and Maraver, F. (2017). Sulphurous Mineral Waters: New Applications for Health. *Evid Based Complement Alternat Med* 2017.
- Carubbi, C., Gobbi, G., Bucci, G., Gesi, M., Vitale, M., and Mirandola, P. (2013). Skin, Inflammation and Sulfurous Waters: What is Known, What is Believed. *Eur J Inflamm* 11, 591–599.
- Chen, K.Y., and Morris, J.C. (1972). Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by oxygen. *Environ. Sci. Technol.* 6, 529–537.
- Chen, X., and Liu, X. (2016). Hydrogen sulfide from a NaHS source attenuates dextran sulfate sodium (DSS)-induced inflammation via inhibiting nuclear factor- κ B. *J Zhejiang Univ Sci B* 17, 209–217.
- Chen, C., Xin, H., and Zhu, Y. (2007). Hydrogen sulfide: third gaseous transmitter, but with great pharmacological potential. *Acta Pharmacol Sin* 28, 1709–1716.
- Chiang, R.S., Borovikova, A.A., King, K., Banyard, D.A., Lalezari, S., Toranto, J.D., Paydar, K.Z., Wirth, G.A., Evans, G.R.D., and Widgerow, A.D. (2016). Current concepts related to hypertrophic scarring in burn injuries. *Wound Repair Regen* 24, 466–477.
- Chong, D.L.W., Trinder, S., Labelle, M., Rodriguez-Justo, M., Hughes, S., Holmes, A.M., Scotton, C.J., and Porter, J.C. (2020). Platelet-derived transforming growth factor- β 1 promotes keratinocyte proliferation in cutaneous wound healing. *J Tissue Eng Regen Med* 14, 645–649.
- Clayton, E., Doupé, D.P., Klein, A.M., Winton, D.J., Simons, B.D., and Jones, P.H. (2007). A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature* 446, 185–189.
- Coavoy-Sánchez, S.A., Rodrigues, L., Teixeira, S.A., Soares, A.G., Torregrossa, R., Wood, M.E., Whiteman, M., Costa, S.K.P., and Muscará, M.N. (2016). Hydrogen sulfide donors alleviate itch secondary to the activation of type-2 protease activated receptors (PAR-2) in mice. *Pharmacological Research* 113, 686–694.
- Coolen, N.A., Vlig, M., van den Bogaerdt, A.J., Middelkoop, E., and Ulrich, M.M.W. (2008). Development of an in vitro burn wound model. *Wound Repair Regen* 16, 559–567.
- Corsello, T., Komaravelli, N., and Casola, A. (2018). Role of Hydrogen Sulfide in NRF2- and Sirtuin-Dependent Maintenance of Cellular Redox Balance. *Antioxidants (Basel)* 7.
- Cuylen, S., Blaukopf, C., Politi, A.Z., Müller-Reichert, T., Neumann, B., Poser, I., Ellenberg, J., Hyman, A.A., and Gerlich, D.W. (2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature* 535, 308–312.

- Dahl, M.V. (2012). Stem cells and the skin. *J Cosmet Dermatol* 11, 297–306.
- Daldal, H., Beder, B., Serin, S., and Sungurtekin, H. (2010). Hydrogen sulfide toxicity in a thermal spring: a fatal outcome. *Clinical Toxicology* 48, 755–756.
- Danilenko, D.M. (2016). An Overview of the Pathogenesis of Immune-mediated Skin Injury. *Toxicol Pathol* 44, 536–544.
- Daryabeigi, R., Heidari, M., Hosseini, S.A., and Omranifar, M. (2010). Comparison of healing time of the 2nd degree burn wounds with two dressing methods of fundermol herbal ointment and 1% silver sulfadiazine cream. *Iran J Nurs Midwifery Res* 15, 97–101.
- Davinelli, S., Bassetto, F., Vitale, M., and Scapagnini, G. (2019). Chapter 10 - Thermal Waters and the Hormetic Effects of Hydrogen Sulfide on Inflammatory Arthritis and Wound Healing. In *The Science of Hormesis in Health and Longevity*, S.I.S. Rattan, and M. Kyriazis, eds. (Academic Press), pp. 121–126.
- Debeer, S., Le Luduec, J.-B., Kaiserlian, D., Laurent, P., Nicolas, J.-F., Dubois, B., and Kanitakis, J. (2013). Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin. *Eur J Dermatol* 23, 456–466.
- Demidova-Rice, T.N., Hamblin, M.R., and Herman, I.M. (2012). Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 2: Role of Growth Factors in Normal and Pathological Wound Healing: Therapeutic Potential and Methods of Delivery. *Adv Skin Wound Care* 25, 349–370.
- Dong, X., and Dong, X. (2018). Peripheral and Central Mechanisms of Itch. *Neuron* 98, 482–494.
- Dong, J., Sulik, K.K., and Chen, S.-Y. (2008). Nrf2-mediated transcriptional induction of antioxidant response in mouse embryos exposed to ethanol in vivo: implications for the prevention of fetal alcohol spectrum disorders. *Antioxid Redox Signal* 10, 2023–2033.
- Dorman, D.C., Moulin, F.J.-M., McManus, B.E., Mahle, K.C., James, R.A., and Struve, M.F. (2002). Cytochrome Oxidase Inhibition Induced by Acute Hydrogen Sulfide Inhalation: Correlation with Tissue Sulfide Concentrations in the Rat Brain, Liver, Lung, and Nasal Epithelium. *Toxicol Sci* 65, 18–25.
- Eberle, F.C., Brück, J., Holstein, J., Hirahara, K., and Ghoreschi, K. (2016). Recent advances in understanding psoriasis. *F1000Res* 5.
- Emanuelsson, P., and Kratz, G. (1997). Characterization of a new in vitro burn wound model. *Burns* 23, 32–36.
- Eming, S.A., Martin, P., and Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med* 6, 265sr6.
- Emmerson, E. (2017). Efficient Healing Takes Some Nerve: Electrical Stimulation Enhances Innervation in Cutaneous Human Wounds. *Journal of Investigative Dermatology* 137, 543–545.
- Fan, H.-N., Wang, H.-J., Yang-Dan, C.-R., Ren, L., Wang, C., Li, Y.-F., and Deng, Y. (2013). Protective effects of hydrogen sulfide on oxidative stress and fibrosis in hepatic stellate cells. *Molecular Medicine Reports* 7, 247–253.
- Feliciani, C., Gupta, A.K., and Saucier, D.N. (1996). Keratinocytes and Cytokine/Growth Factors. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 7, 300–318.
- Fernandes, A.C.M., França, J.P. de, Gaiba, S., Aloise, A.C., Oliveira, A.F. de, Moraes, A.A. de F.S., França, L.P. de, Ferreira, L.M., Fernandes, A.C.M., França, J.P. de, et al. (2014). Development of experimental in vitro burn model. *Acta Cirurgica Brasileira* 29, 15–20.
- Filipovic, M.R., Zivanovic, J., Alvarez, B., and Banerjee, R. (2018). Chemical Biology of H₂S Signaling through Persulfidation. *Chem Rev* 118, 1253–1337.
- Furue, M., Ulzii, D., Vu, Y.H., Tsuji, G., Kido-Nakahara, M., and Nakahara, T. (2019). Pathogenesis of Atopic Dermatitis: Current Paradigm. *Iran J Immunol* 16, 97–107.

- Gadalla, M.M., and Snyder, S.H. (2010). Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *J Neurochem* 113, 14–26.
- Gadotti, V.M., Kreitinger, J.M., Wageling, N.B., Budke, D., Diaz, P., and Zamponi, G.W. (2020). Cav3.2 T-type calcium channels control acute itch in mice. *Molecular Brain* 13, 119.
- Gartler, S.M. (1968). Apparent HeLa cell contamination of human heteroploid cell lines. *Nature* 217, 750–751.
- Gelse, K., Pöschl, E., and Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 1531–1546.
- Gianfaldoni, S., Tchernev, G., Wollina, U., Rocchia, M.G., Fioranelli, M., Gianfaldoni, R., and Lotti, T. (2017). History of the Baths and Thermal Medicine. *Open Access Maced J Med Sci* 5, 566–568.
- Glory, A., and Averill-Bates, D.A. (2016). The antioxidant transcription factor Nrf2 contributes to the protective effect of mild thermotolerance (40°C) against heat shock-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* 99, 485–497.
- Gobbi, G., Ricci, F., Malinverno, C., Carubbi, C., Pambianco, M., Panfilis, G. de, Vitale, M., and Mirandola, P. (2009). Hydrogen sulfide impairs keratinocyte cell growth and adhesion inhibiting mitogen-activated protein kinase signaling. *Lab Invest* 89, 994–1006.
- Gonzales, K.A.U., and Fuchs, E. (2017). Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche. *Developmental Cell* 43, 387–401.
- Gonzalez, A.C. de O., Costa, T.F., Andrade, Z. de A., and Medrado, A.R.A.P. (2016). Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol* 91, 614–620.
- Greiner, R., Pálinkás, Z., Bäsell, K., Becher, D., Antelmann, H., Nagy, P., and Dick, T.P. (2013). Polysulfides Link H₂S to Protein Thiol Oxidation. *Antioxid Redox Signal* 19, 1749–1765.
- Guan, R., Wang, J., Li, D., Li, Z., Liu, H., Ding, M., Cai, Z., Liang, X., Yang, Q., Long, Z., et al. (2020). Hydrogen sulfide inhibits cigarette smoke-induced inflammation and injury in alveolar epithelial cells by suppressing PHD2/HIF-1 α /MAPK signaling pathway. *International Immunopharmacology* 81, 105979.
- Gudjonsson, J.E., Johnston, A., Dyson, M., Valdimarsson, H., and Elder, J.T. (2007). Mouse Models of Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 127, 1292–1308.
- Guo, L., Peng, W., Tao, J., Lan, Z., Hei, H., Tian, L., Pan, W., Wang, L., and Zhang, X. (2016). Hydrogen Sulfide Inhibits Transforming Growth Factor- β 1-Induced EMT via Wnt/Catenin Pathway. *PLoS One* 11, e0147018.
- Haase, I., Evans, R., Pofahl, R., and Watt, F.M. (2003). Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways. *J. Cell. Sci.* 116, 3227–3238.
- Hall, C., Hardin, C., Corkins, C.J., Jiwani, A.Z., Fletcher, J., Carlsson, A., and Chan, R. (2017). Pathophysiologic Mechanisms and Current Treatments for Cutaneous Sequelae of Burn Wounds. *Compr Physiol* 8, 371–405.
- Hartle, M., and Pluth, M. (2016). A practical guide to working with H₂S at the interface of chemistry and biology. *Chemical Society Reviews* 45.
- Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2013). The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nature Immunology* 14, 978–985.
- Hellmich, M.R., and Szabo, C. (2015). Hydrogen Sulfide and Cancer. *Handb Exp Pharmacol* 230, 233–241.
- Hettiaratchy, S., and Dziewulski, P. (2004). Pathophysiology and types of burns. *BMJ* 328, 1427–1429.
- Hettler, A., Werner, S., Eick, S., Laufer, S., and Weise, F. (2013). A New In Vitro Model to Study Cellular Responses after Thermomechanical Damage in Monolayer Cultures. *PLoS One* 8.

- Ho, A.W., and Kupper, T.S. (2019). T cells and the skin: from protective immunity to inflammatory skin disorders. *Nature Reviews Immunology* 19, 490–502.
- Huang, A., Seité, S., and Adar, T. (2018). The use of balneotherapy in dermatology. *Clin Dermatol* 36, 363–368.
- Ichikawa, T., Suenaga, Y., Koda, T., Ozaki, T., and Nakagawara, A. (2008). TAp63-dependent induction of growth differentiation factor 15 (GDF15) plays a critical role in the regulation of keratinocyte differentiation. *Oncogene* 27, 409–420.
- Iorio, V., Troughton, L.D., and Hamill, K.J. (2015). Laminins: Roles and Utility in Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 4, 250–263.
- Ishigami, M., Hiraki, K., Umemura, K., Ogasawara, Y., Ishii, K., and Kimura, H. (2009). A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 205–214.
- Jeschke, M.G., Shahrokhi, S., Finnerty, C.C., Branski, L.K., and Dibildox, M. (2018). Wound Coverage Technologies in Burn Care: Established Techniques. *J Burn Care Res* 39, 313–318.
- Jeschke, M.G., van Baar, M.E., Choudhry, M.A., Chung, K.K., Gibran, N.S., and Logsetty, S. (2020). Burn injury. *Nat Rev Dis Primers* 6, 11.
- Jin, Z., Chan, H., Ning, J., Lu, K., and Ma, D. (2015). The role of hydrogen sulfide in pathologies of the vital organs and its clinical application. *J. Physiol. Pharmacol.* 66, 169–179.
- Johnson, K.E., and Wilgus, T.A. (2014). Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 3, 647–661.
- Kabil, O., and Banerjee, R. (2014). Enzymology of H₂S Biogenesis, Decay and Signaling. *Antioxid Redox Signal* 20, 770–782.
- Kanda, N., Hau, C.S., Tada, Y., Tatsuta, A., Sato, S., and Watanabe, S. (2011). Visfatin Enhances CXCL8, CXCL10, and CCL20 Production in Human Keratinocytes. *Endocrinology* 152, 3155–3164.
- Kandola, K., Bowman, A., and Birch-Machin, M.A. (2015). Oxidative stress - a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. *Int J Cosmet Sci* 37, 1–8.
- Kaspar, J.W., and Jaiswal, A.K. (2010). An autoregulatory loop between Nrf2 and Cul3-Rbx1 controls their cellular abundance. *J Biol Chem* 285, 21349–21358.
- Kasuya, A., and Tokura, Y. (2014). Attempts to accelerate wound healing. *J Dermatol Sci* 76, 169–172.
- Kimura, H. (2011). Hydrogen sulfide: its production, release and functions. *Amino Acids* 41, 113–121.
- Kimura, H. (2015). Hydrogen sulfide and polysulfides as signaling molecules. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 91, 131–159.
- Klicznik, M.M., Szenes-Nagy, A.B., Campbell, D.J., and Gratz, I.K. (2018). Taking the lead – how keratinocytes orchestrate skin T cell immunity. *Immunol Lett* 200, 43–51.
- Koh, T.J., and DiPietro, L.A. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med* 13, e23.
- Kolanek, B. Présentée et soutenue publiquement dans le cadre du troisième cycle d'Anesthésie-réanimation. 100.
- Kolluru, G.K., Shen, X., Bir, S.C., and Kevil, C.G. (2013). Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide* 35, 5–20.
- Kratz, G. (1998). Modeling of wound healing processes in human skin using tissue culture. *Microsc. Res. Tech.* 42, 345–350.
- Kunz, S., Wolk, K., Witte, E., Witte, K., Doecke, W.-D., Volk, H.-D., Sterry, W., Asadullah, K., and Sabat, R. (2006). Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs. *Exp Dermatol* 15, 991–1004.
- Lafourcade, D. Prise en charge de la brûlure cutanée thermique: parcours-type du centre de traitement des brûlés jusqu'à celui de rééducation. 123.

- Lalouette, A. Le pharmacien et les brûlures: traitements et conseils à l'officine. 108.
- Langton, A.K., Graham, H.K., McConnell, J.C., Sherratt, M.J., Griffiths, C.E.M., and Watson, R.E.B. (2017). Organization of the dermal matrix impacts the biomechanical properties of skin. *Br. J. Dermatol.* *177*, 818–827.
- Lavappa, K.S. (1978). Survey of ATCC stocks of human cell lines for HeLa contamination. *In Vitro* *14*, 469–475.
- Laverdet, B., Danigo, A., Girard, D., Magy, L., Demiot, C., and Desmoulière, A. (2015). Skin innervation: important roles during normal and pathological cutaneous repair. *Histol. Histopathol.* *30*, 875–892.
- Lebre, M.C., van der Aar, A.M.G., van Baarsen, L., van Capel, T.M.M., Schuitemaker, J.H.N., Kapsenberg, M.L., and de Jong, E.C. (2007). Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol* *127*, 331–341.
- Legrand, M., Barraud, D., Constant, I., Devauchelle, P., Donat, N., Fontaine, M., Goffinet, L., Hoffmann, C., Jeanne, M., Jonquieres, J., et al. (2020). Management of severe thermal burns in the acute phase in adults and children. *Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine* *39*, 253–267.
- Li, L., Bhatia, M., Zhu, Y.Z., Zhu, Y.C., Ramnath, R.D., Wang, Z.J., Anuar, F.B.M., Whiteman, M., Salto-Tellez, M., and Moore, P.K. (2005). Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J* *19*, 1196–1198.
- Li, L., Bhatia, M., and Moore, P.K. (2006). Hydrogen sulphide--a novel mediator of inflammation? *Curr Opin Pharmacol* *6*, 125–129.
- Li, R., Jia, Z., and Zhu, H. (2019). Regulation of Nrf2 Signaling. *React Oxyg Species (Apex)* *8*, 312–322.
- Li, S., Kang, P., Zhang, W., Jian, Z., Zhang, Q., Yi, X., Guo, S., Guo, W., Shi, Q., Li, B., et al. (2020). Activated NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome in keratinocytes promotes cutaneous T-cell response in patients with vitiligo. *J Allergy Clin Immunol* *145*, 632–645.
- Liang, C.-C., Park, A.Y., and Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* *2*, 329–333.
- Liang, Y., Zheng, P., Li, S., Li, K., and Xu, H. (2018). Nitrate reductase-dependent NO production is involved in H₂S-induced nitrate stress tolerance in tomato via activation of antioxidant enzymes. *Scientia Horticulturae* *229*, 207–214.
- Luo, Z.-L., Ren, J.-D., Huang, Z., Wang, T., Xiang, K., Cheng, L., and Tang, L.-J. (2017). The Role of Exogenous Hydrogen Sulfide in Free Fatty Acids Induced Inflammation in Macrophages. *Cell Physiol Biochem* *42*, 1635–1644.
- Malone Rubright, S.L., Pearce, L.L., and Peterson, J. (2017). Environmental Toxicology of Hydrogen Sulfide. *Nitric Oxide* *71*, 1–13.
- Mathai, J.C., Missner, A., Kügler, P., Saporov, S.M., Zeidel, M.L., Lee, J.K., and Pohl, P. (2009). No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 16633–16638.
- Matz, H., Orion, E., and Wolf, R. (2003). Balneotherapy in dermatology. *Dermatol Ther* *16*, 132–140.
- Mendoza-Garcia, J., Sebastian, A., Alonso-Rasgado, T., and Bayat, A. (2015). Optimization of an ex vivo wound healing model in the adult human skin: Functional evaluation using photodynamic therapy. *Wound Repair Regen* *23*, 685–702.
- Meng, W., Pei, Z., Feng, Y., Zhao, J., Chen, Y., Shi, W., Xu, Q., Lin, F., Sun, M., and Xiao, K. (2017). Neglected role of hydrogen sulfide in sulfur mustard poisoning: Keap1 S-sulfhydration and subsequent Nrf2 pathway activation. *Sci Rep* *7*, 9433.
- Merighi, S., Gessi, S., Varani, K., Fazzi, D., and Borea, P.A. (2012). Hydrogen sulfide modulates the

- release of nitric oxide and VEGF in human keratinocytes. *Pharmacol Res* 66, 428–436.
- Mirandola, P., Gobbi, G., Micheloni, C., Vaccarezza, M., Di Marcantonio, D., Ruscitti, F., De Panfilis, G., and Vitale, M. (2011). Hydrogen sulfide inhibits IL-8 expression in human keratinocytes via MAP kinase signaling. *Laboratory Investigation* 91, 1188–1194.
- Misery, L. (2014). Le prurit : des avancées physiopathologiques considérables. *Med Sci (Paris)* 30, 1123–1128.
- Nasca, M.R., O’Toole, E.A., Palicharla, P., West, D.P., and Woodley, D.T. (1999). Thalidomide increases human keratinocyte migration and proliferation. *J. Invest. Dermatol.* 113, 720–724.
- Nelson-Rees, W.A., and Flandermeyer, R.R. (1976). HeLa cultures defined. *Science* 191, 96–98.
- Ni, X., and Lai, Y. (2020). Keratinocyte: A trigger or an executor of psoriasis? *J. Leukoc. Biol.* 108, 485–491.
- Nicholls, P., and Kim, J.K. (1982). Sulphide as an inhibitor and electron donor for the cytochrome c oxidase system. *Can. J. Biochem.* 60, 613–623.
- Nielson, C.B., Duethman, N.C., Howard, J.M., Moncure, M., and Wood, J.G. (2017). Burns: Pathophysiology of Systemic Complications and Current Management. *J Burn Care Res* 38, e469–e481.
- Olas, B. (2015). Hydrogen sulfide in signaling pathways. *Clin Chim Acta* 439, 212–218.
- Olson, K.R. (2009). Is hydrogen sulfide a circulating “gasotransmitter” in vertebrate blood? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787, 856–863.
- Olson, K.R., Gao, Y., Arif, F., Arora, K., Patel, S., DeLeon, E.R., Sutton, T.R., Feelisch, M., Cortese-Krott, M.M., and Straub, K.D. (2018). Metabolism of hydrogen sulfide (H₂S) and Production of Reactive Sulfur Species (RSS) by superoxide dismutase. *Redox Biol* 15, 74–85.
- O’Toole, E.A. (2001). Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clin Exp Dermatol* 26, 525–530.
- Parihar, A., Parihar, M.S., Milner, S., and Bhat, S. (2008). Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns* 34, 6–17.
- Parisi, R., Iskandar, I.Y.K., Kontopantelis, E., Augustin, M., Griffiths, C.E.M., and Ashcroft, D.M. (2020). National, regional, and worldwide epidemiology of psoriasis: systematic analysis and modelling study. *BMJ* 369.
- Paul, B.D., and Snyder, S.H. (2015). H₂S: A Novel Gasotransmitter that Signals by Sulfhydration. *Trends Biochem Sci* 40, 687–700.
- Pence, B.D., and Woods, J.A. (2014). Exercise, Obesity, and Cutaneous Wound Healing: Evidence from Rodent and Human Studies. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 3, 71–79.
- Peng, H., Chen, W., Cheng, Y., Hakuna, L., Strongin, R., and Wang, B. (2012). Thiol Reactive Probes and Chemosensors. *Sensors (Basel)* 12, 15907–15946.
- Perry, M.M., Hui, C.K., Whiteman, M., Wood, M.E., Adcock, I., Kirkham, P., Michaeloudes, C., and Chung, K.F. (2011). Hydrogen Sulfide Inhibits Proliferation and Release of IL-8 from Human Airway Smooth Muscle Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45, 746–752.
- Piccerelle, P.P. DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE. 163.
- Pivarsci, A., Bodai, L., Réthi, B., Kenderessy-Szabó, A., Koreck, A., Széll, M., Beer, Z., Bata-Csörgő, Z., Magócsi, M., Rajnavölgyi, É., et al. (2003). Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol* 15, 721–730.
- Powell, C.R., Dillon, K.M., and Matson, J.B. (2018). A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochem. Pharmacol.* 149, 110–123.
- Proksch, E., Brandner, J.M., and Jensen, J.-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* 17, 1063–1072.
- Proksch, E., Fölster-Holst, R., Bräutigam, M., Sepehrmanesh, M., Pfeiffer, S., and Jensen, J.-M. (2009). Role of the epidermal barrier in atopic dermatitis. *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 7, 899–910.

- Qiao, Z., Zhang, H., Wang, K., and Zhang, Y. (2019). A highly sensitive and responsive fluorescent probe based on 6-azide-chroman dye for detection and imaging of hydrogen sulfide in cells. *Talanta* 195, 850–856.
- Qu, M., and Nourbakhsh, M. (2017). Current experimental models of burns. *Discov Med* 23, 95–103.
- Qu, M., Kruse, S., Pitsch, H., Pallua, N., and Nourbakhsh, M. (2016). Viability of human composite tissue model for experimental study of burns. *Discov Med* 22, 19–28.
- Quaresma, J.A.S. (2019). Organization of the Skin Immune System and Compartmentalized Immune Responses in Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev* 32.
- Rakita, A., Nikolić, N., Mildner, M., Matiassek, J., and Elbe-Bürger, A. (2020). Re-epithelialization and immune cell behaviour in an ex vivo human skin model. *Sci Rep* 10, 1–11.
- Rani, M., Nicholson, S.E., Zhang, Q., and Schwacha, M.G. (2017). Damage-associated molecular patterns (DAMPs) released after burn are associated with inflammation and monocyte activation. *Burns* 43, 297–303.
- Renò, F., Traina, V., and Cannas, M. (2009). Mechanical stretching modulates growth direction and MMP-9 release in human keratinocyte monolayer. *Cell Adh Migr* 3, 239–242.
- Richard, M.-A., Corgibet, F., Beylot-Barry, M., Barbaud, A., Bodemer, C., Chaussade, V., D’Incan, M., Joly, P., Leccia, M.T., Meurant, J.M., et al. (2018). Sex- and age-adjusted prevalence estimates of five chronic inflammatory skin diseases in France: results of the « OBJECTIFS PEAU » study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 32, 1967–1971.
- Richmond, J.M., and Harris, J.E. (2014). Immunology and Skin in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4.
- Rippa, A.L., Kalabusheva, E.P., and Vorotelyak, E.A. (2019). Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells* 8.
- Rivers, J.R., Badieli, A., and Bhatia, M. (2012). Hydrogen sulfide as a therapeutic target for inflammation. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 16, 439–449.
- Riyaz, N., and Arakkal, F.R. (2011). Spa therapy in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 77, 128–134.
- Rochat, A., and Barrandon, Y. (2009). Chapter 61 - Regeneration of Epidermis from Adult Keratinocyte Stem Cells. In *Essentials of Stem Cell Biology (Second Edition)*, R. Lanza, J. Gearhart, B. Hogan, D. Melton, R. Pedersen, E.D. Thomas, J. Thomson, and I. Wilmut, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 551–560.
- Roshangar, L., Soleimani Rad, J., Kheirjou, R., Reza Ranjkesh, M., and Ferdowsi Khosroshahi, A. (2019). Skin Burns: Review of Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Wounds* 31, 308–315.
- Rousselle, P., Braye, F., and Dayan, G. (2019). Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews* 146, 344–365.
- Rowan, M.P., Cancio, L.C., Elster, E.A., Burmeister, D.M., Rose, L.F., Natesan, S., Chan, R.K., Christy, R.J., and Chung, K.K. (2015). Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Crit Care* 19.
- Ryazantseva, N.V., Novitsky, V.V., Starikova, E.G., Kleptsova, L.A., Jakushina, V.D., and Kaigorodova, E.V. (2011). Role of Hydrogen Sulfide in the Regulation of Cell Apoptosis. *Bull Exp Biol Med* 151, 702.
- Saeidinia, A., Keihanian, F., Lashkari, A.P., Lahiji, H.G., Mobayyen, M., Heidarzade, A., and Golchai, J. (2017). Partial-thickness burn wounds healing by topical treatment. *Medicine (Baltimore)* 96.
- Sahib, A.S., Al-Jawad, F.H., and Al-Kaisy, A.A. (2009). Burns, Endothelial Dysfunction, and Oxidative Stress: the Role of Antioxidants. *Ann Burns Fire Disasters* 22, 6–11.

- Sahib, A.S., Al-Jawad, F.H., and Alkaisy, A.A. (2010). Effect of Antioxidants on the Incidence of Wound Infection in Burn Patients. *Ann Burns Fire Disasters* 23, 199–205.
- Schaefer, T.J., and Nunez Lopez, O. (2020). Burn Resuscitation And Management. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Schäfer, M., and Werner, S. (2011). The cornified envelope: a first line of defense against reactive oxygen species. *J. Invest. Dermatol.* 131, 1409–1411.
- Serra, M.B., Barroso, W.A., da Silva, N.N., Silva, S. do N., Borges, A.C.R., Abreu, I.C., and Borges, M.O. da R. (2017). From Inflammation to Current and Alternative Therapies Involved in Wound Healing. *Int J Inflamm* 2017, 3406215.
- Sherman, V.R., Yang, W., and Meyers, M.A. (2015). The materials science of collagen. *J Mech Behav Biomed Mater* 52, 22–50.
- Siah, S., Hatimi, E.M., Ihrari, H., and Drissi Kamili, N. (2012). Prise en charge d'un afflux massif de brûlés lors d'une situation de catastrophe par incendie au Maroc. *Ann Burns Fire Disasters* 25, 159–163.
- Simpson, C.L., Patel, D.M., and Green, K.J. (2011). Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 565–580.
- Singha, S., Kim, D., Moon, H., Wang, T., Kim, K.H., Shin, Y.H., Jung, J., Seo, E., Lee, S.-J., and Ahn, K.H. (2015). Toward a selective, sensitive, fast-responsive, and biocompatible two-photon probe for hydrogen sulfide in live cells. *Anal Chem* 87, 1188–1195.
- Sivamani, R., Pullar, C., Manabat-Hidalgo, C., Rocke, D., Carlsen, R., Greenhalgh, D., and Isseroff, R. (2009). Stress-Mediated Increases in Systemic and Local Epinephrine Impair Skin Wound Healing: Potential New Indication for Beta Blockers. *PLoS Medicine* 6, e12.
- Skobe, M., and Detmar, M. (2000). Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 5, 14–19.
- Słoniecka, M., Le Roux, S., Boman, P., Byström, B., Zhou, Q., and Danielson, P. (2015). Expression Profiles of Neuropeptides, Neurotransmitters, and Their Receptors in Human Keratocytes In Vitro and In Situ. *PLoS One* 10.
- Sorg, H., Tilkorn, D.J., Hager, S., Hauser, J., and Mirastschijski, U. (2017). Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur Surg Res* 58, 81–94.
- Stamm, A., Reimers, K., Strauß, S., Vogt, P., Scheper, T., and Pepelanova, I. (2016). In vitro wound healing assays – state of the art. *BioNanoMaterials* 17, 79–87.
- Starace, J. (2017). Prise en charge dermocosmétique de la dermatite atopique: apport des formulations à base d'eau thermale.
- Steinstraesser, L., Rittig, A., Gevers, K., Sorkin, M., Hirsch, T., Kesting, M., Sand, M., Al-Benna, S., Langer, S., Steinau, H.-U., et al. (2009). A human full-skin culture system for interventional studies. *Eplasty* 9, e5.
- Strid, J., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2009). Skin immune surveillance by T cells—A new order? *Seminars in Immunology* 21, 110–120.
- Su, W.-H., Cheng, M.-H., Lee, W.-L., Tsou, T.-S., Chang, W.-H., Chen, C.-S., and Wang, P.-H. (2010). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs for Wounds: Pain Relief or Excessive Scar Formation? *Mediators of Inflammation* 2010, 1–8.
- Sullivan, T.P., Eaglstein, W.H., Davis, S.C., and Mertz, P. (2001). The Pig as a Model for Human Wound Healing. *Wound Repair and Regeneration* 9, 66–76.
- Szabó, C. (2007). Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 6, 917–935.
- Szabo, C. (2017). Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications. *Am J Physiol Cell Physiol* 312, C3–C15.
- Talagas, M., and Misery, L. (2019). Role of Keratinocytes in Sensitive Skin. *Frontiers in Medicine* 6, 108.

- Tay, S.S., Roediger, B., Tong, P.L., Tikoo, S., and Weninger, W. (2014). The Skin-Resident Immune Network. *Curr Dermatol Rep* 3, 13–22.
- Tiirikainen, M.L., Woetmann, A., Norsgaard, H., Santamaria-Babí, L.F., and Lovato, P. (2020). Ex vivo culture of lesional psoriasis skin for pharmacological testing. *Journal of Dermatological Science* 97, 109–116.
- Tiwari, V.K. (2012). Burn wound: How it differs from other wounds? *Indian J Plast Surg* 45, 364–373.
- Tomic-Canic, M., Mamber, S.W., Stojadinovic, O., Lee, B., Radoja, N., and McMichael, J. (2007). Streptolysin O enhances keratinocyte migration and proliferation and promotes skin organ culture wound healing in vitro. *Wound Repair Regen* 15, 71–79.
- Tonnesen, M.G., Feng, X., and Clark, R.A. (2000). Angiogenesis in wound healing. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 5, 40–46.
- Tourkochristou, E., Aggeletopoulou, I., Konstantakis, C., and Triantos, C. (2019). Role of NLRP3 inflammasome in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology* 25, 4796–4804.
- Tracy, L.E., Minasian, R.A., and Caterson, E.J. (2016). Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 5, 119–136.
- Trenam, C.W., Blake, D.R., and Morris, C.J. (1992). Skin Inflammation: Reactive Oxygen Species and the Role of Iron. *Journal of Investigative Dermatology* 99, 675–682.
- Tsepkolenko, A., Tsepkolenko, V., Dash, S., Mishra, A., Bader, A., Melerzanov, A., and Giri, S. (2019). The regenerative potential of skin and the immune system. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 12, 519–532.
- Twarog, C. (2017). Particules Janus pour des applications industrielles : stabilités et incorporation de principes actifs.
- Ud-Din, S., and Bayat, A. (2017). Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. *Wound Repair Regen* 25, 164–176.
- Vandiver, M.S., and Snyder, S.H. (2012). Hydrogen sulfide: a gasotransmitter of clinical relevance. *J Mol Med (Berl)* 90, 255–263.
- Vermeij, W.P., and Backendorf, C. (2014). Reactive oxygen species (ROS) protection via cysteine oxidation in the epidermal cornified cell envelope. *Methods Mol. Biol.* 1195, 157–169.
- Vicente, J.B., Malagrino, F., Arese, M., Forte, E., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2016). Bioenergetic relevance of hydrogen sulfide and the interplay between gasotransmitters at human cystathionine β -synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857, 1127–1138.
- Viegas, J., Esteves, A.F., Cardoso, E.M., Arosa, F.A., Vitale, M., and Taborda-Barata, L. (2019). Biological Effects of Thermal Water-Associated Hydrogen Sulfide on Human Airways and Associated Immune Cells: Implications for Respiratory Diseases. *Front Public Health* 7.
- Wächtershäuser, G. (1992). Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 58, 85–201.
- Walker, N.J., and King, K.C. (2020). Acute and Chronic Thermal Burn Evaluation and Management. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Wallace, J.L., and Wang, R. (2015). Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. *Nat Rev Drug Discov* 14, 329–345.
- Wang, R. (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 16, 1792–1798.
- Wang, R. (2014). Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends Biochem Sci* 39, 227–232.
- Wang, X.-L., Tian, B., Huang, Y., Peng, X.-Y., Chen, L.-H., Li, J.-C., and Liu, T. (2015). Hydrogen sulfide-induced itch requires activation of Cav3.2 T-type calcium channel in mice. *Sci Rep*

- 5.
- Wang, Y.-D., Li, J.-Y., Qin, Y., Liu, Q., Liao, Z.-Z., and Xiao, X.-H. (2020). Exogenous Hydrogen Sulfide Alleviates-Induced Intracellular Inflammation in HepG2 Cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* *128*, 137–143.
- Wardhana, A., Lumbuun, R.F.M., and Kurniasari, D. (2018). How to create burn porcine models: a systematic review. *Ann Burns Fire Disasters* *31*, 65–72.
- Watt, F.M., and Fujiwara, H. (2011). Cell-Extracellular Matrix Interactions in Normal and Diseased Skin. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*.
- Wen, Y.-D., Wang, H., Kho, S., Rinkiko, S., Sheng, X., Shen, H.-M., and yi, Z. (2013). Hydrogen Sulfide Protects HUVECs against Hydrogen Peroxide Induced Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress. *PLoS One* *8*, e53147.
- Werfel, T. (2009). The Role of Leukocytes, Keratinocytes, and Allergen-Specific IgE in the Development of Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* *129*, 1878–1891.
- Whiteman, M., and Winyard, P.G. (2011). Hydrogen sulfide and inflammation: the good, the bad, the ugly and the promising. *Expert Review of Clinical Pharmacology* *4*, 13–32.
- Whiteman, M., Li, L., Rose, P., Tan, C.-H., Parkinson, D.B., and Moore, P.K. (2010). The Effect of Hydrogen Sulfide Donors on Lipopolysaccharide-Induced Formation of Inflammatory Mediators in Macrophages. *Antioxid Redox Signal* *12*, 1147–1154.
- Whitfield, N.L., Kreimier, E.L., Verdial, F.C., Skovgaard, N., and Olson, K.R. (2008). Reappraisal of H₂S/sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular signaling. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* *294*, R1930–R1937.
- Woo, Y.R., Cho, D.H., and Park, H.J. (2017). Molecular Mechanisms and Management of a Cutaneous Inflammatory Disorder: Psoriasis. *Int J Mol Sci* *18*.
- Woodley, D.T., Chen, J.D., Kim, J.P., Sarret, Y., Iwasaki, T., Kim, Y.H., and O’Keefe, E.J. (1993). Re-epithelialization. Human keratinocyte locomotion. *Dermatol Clin* *11*, 641–646.
- Wu, D., Si, W., Wang, M., Lv, S., Ji, A., and Li, Y. (2015). Hydrogen sulfide in cancer: Friend or foe? *Nitric Oxide* *50*, 38–45.
- Wu, X., Yang, L., Zheng, Z., Li, Z., Shi, J., Li, Y., Han, S., Gao, J., Tang, C., Su, L., et al. (2016). Src promotes cutaneous wound healing by regulating MMP-2 through the ERK pathway. *Int. J. Mol. Med.* *37*, 639–648.
- Wulf, H.C., Sandby-Møller, J., Kobayasi, T., and Gniadecki, R. (2004). Skin aging and natural photoprotection. *Micron* *35*, 185–191.
- Xie, X., Dai, H., Zhuang, B., Chai, L., Xie, Y., and Li, Y. (2016a). Exogenous hydrogen sulfide promotes cell proliferation and differentiation by modulating autophagy in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* *472*, 437–443.
- Xie, Z.-Z., Liu, Y., and Bian, J.-S. (2016b). Hydrogen Sulfide and Cellular Redox Homeostasis. *Oxid Med Cell Longev* *2016*, 6043038.
- Xiong, J., Xia, L., Huang, Q., Huang, J., Gu, Y., and Wang, P. (2018). Cyanine-based NIR fluorescent probe for monitoring H₂S and imaging in living cells and in vivo. *Talanta* *184*, 109–114.
- Xu, H., Zheng, Y.-W., Liu, Q., Liu, L.-P., Luo, F.-L., Zhou, H.-C., Isoda, H., Ohkohchi, N., and Li, Y.-M. (2017). Reactive Oxygen Species in Skin Repair, Regeneration, Aging, and Inflammation. *Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells*.
- Xu, W., Jong Hong, S., Jia, S., Zhao, Y., Galiano, R.D., and Mustoe, T.A. (2012). Application of a partial-thickness human ex vivo skin culture model in cutaneous wound healing study. *Lab. Invest.* *92*, 584–599.
- Xue, M., and Jackson, C.J. (2015). Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)* *4*, 119–136.

- Yamakawa, S., and Hayashida, K. (2019). Advances in surgical applications of growth factors for wound healing. *Burns & Trauma* 7, 10.
- Yancey, K.B. (2005). The pathophysiology of autoimmune blistering diseases. *J Clin Invest* 115, 825–828.
- Yang, C., Yang, Z., Zhang, M., Dong, Q., Wang, X., Lan, A., Zeng, F., Chen, P., Wang, C., and Feng, J. (2011). Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced cytotoxicity and inflammation in HaCaT cells through inhibition of ROS/NF- κ B/COX-2 pathway. *PLoS One* 6, e21971.
- Yang, G., Sun, X., and Wang, R. (2004). Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *The FASEB Journal* 18, 1782–1784.
- Yano, S., Komine, M., Fujimoto, M., Okochi, H., and Tamaki, K. (2006). Activation of Akt by mechanical stretching in human epidermal keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 15, 356–361.
- Yoon, D.J., Fregoso, D.R., Nguyen, D., Chen, V., Strbo, N., Fuentes, J.J., Tomic-Canic, M., Crawford, R., Pastar, I., and Isseroff, R.R. (2019). A tractable, simplified ex vivo human skin model of wound infection. *Wound Repair Regen* 27, 421–425.
- Yousef, H., Alhadj, M., and Sharma, S. (2020). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Yuan, S., Shen, X., and Kevil, C.G. (2017). Beyond a Gasotransmitter: Hydrogen Sulfide and Polysulfide in Cardiovascular Health and Immune Response. *Antioxid Redox Signal* 27, 634–653.
- Zhang, D., Du, J., Tang, C., Huang, Y., and Jin, H. (2017). H₂S-Induced Sulfhydration: Biological Function and Detection Methodology. *Front Pharmacol* 8.
- Zhang, H., Hegde, A., Ng, S., Adhikari, S., Moochhala, S., and Bhatia, M. (2007). Hydrogen Sulfide Up-Regulates Substance P in Polymicrobial Sepsis-Associated Lung Injury. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179, 4153–4160.
- Zhang, J., Sio, S.W.S., Moochhala, S., and Bhatia, M. (2010). Role of hydrogen sulfide in severe burn injury-induced inflammation in mice. *Mol Med* 16, 417–424.
- Zhang, L., Zheng, X.E., Zou, F., Shang, Y., Meng, W., Lai, E., Xu, Z., Liu, Y., and Zhao, J. (2016). A highly selective and sensitive near-infrared fluorescent probe for imaging of hydrogen sulphide in living cells and mice. *Sci Rep* 6, 18868.
- Zhao, F., Lei, F., Yan, X., Zhang, S., Wang, W., and Zheng, Y. (2018). Protective Effects of Hydrogen Sulfide Against Cigarette Smoke Exposure-Induced Placental Oxidative Damage by Alleviating Redox Imbalance via Nrf2 Pathway in Rats. *Cell. Physiol. Biochem.* 48, 1815–1828.
- Zhao, R., Liang, H., Clarke, E., Jackson, C., and Xue, M. (2016). Inflammation in Chronic Wounds. *Int J Mol Sci* 17.
- Zhao, Y., Biggs, T.D., and Xian, M. (2014). Hydrogen sulfide (H₂S) releasing agents: chemistry and biological applications. *Chem Commun (Camb)* 50, 11788–11805.
- Zheng, D., Chen, Z., Chen, J., Zhuang, X., Feng, J., and Li, J. (2016). Exogenous hydrogen sulfide exerts proliferation, anti-apoptosis, migration effects and accelerates cell cycle progression in multiple myeloma cells via activating the Akt pathway. *Oncology Reports* 36, 1909–1916.
- Zhi, L., Ang, A.D., Zhang, H., Moore, P.K., and Bhatia, M. (2007). Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via the ERK-NF- κ B pathway. *J Leukoc Biol* 81, 1322–1332.
- Zomer, H.D., and Trentin, A.G. (2018). Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *J. Dermatol. Sci.* 90, 3–12.