



HAL
open science

La polarisation du macrophage en tant que levier thérapeutique pour la régulation de l'axe inflammation-fibroblaste-fibrose dans la maladie chéloïde

Zélie Dirand

► **To cite this version:**

Zélie Dirand. La polarisation du macrophage en tant que levier thérapeutique pour la régulation de l'axe inflammation-fibroblaste-fibrose dans la maladie chéloïde. Dermatologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2023. Français. NNT : 2023UBFCE019 . tel-04556341

HAL Id: tel-04556341

<https://theses.hal.science/tel-04556341>

Submitted on 23 Apr 2024

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

PREPAREE A L'UMR RIGHT, INSERM

Ecole doctorale n°554
Environnement Santé

Doctorat de Sciences de la vie

Par

Mme Zélie Dirand

La polarisation du macrophage en tant que levier
thérapeutique pour la régulation de l'axe
inflammation-fibroblaste-fibrose dans la maladie chéloïde

Thèse présentée et soutenue à Besançon, le 13 décembre 2023

Composition du jury :

Dr Laurence Michel	Inserm U976, Paris	Rapporteur, présidente du jury
Pr Florent Ginhoux	Institut Gustave Roussy, Paris	Rapporteur
Pr Alexis Desmoulière	Université de Limoges	Examineur
Dr Irène Gallais-Sérézal	Université de Franche-Comté	Examineur
Dr Gwenaël Rolin	Université de Franche-Comté	Co-directeur de thèse
Dr Céline Viennet	Université de Franche-Comté	Co-directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Cette thèse est la concrétisation d'un travail de 3 années, mené en collaboration avec de nombreux chercheurs, ingénieurs, étudiants et techniciens, que je souhaite aujourd'hui citer dans ce manuscrit.

Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Un immense merci aux docteurs Florent Ginhoux et Laurence Michel, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci pour le temps consacré à la lecture du manuscrit et à son évaluation, malgré la charge de travail qui vous incombe. Je remercie également les professeurs Alexis Desmoulière et Irène Gallais-Sérézal, examinateurs, pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse. Votre présence au sein du jury permettra d'apporter un point de vue clinique indispensable à toute recherche, et je vous remercie grandement pour cela. Enfin, merci au professeur Brice Chatelain pour avoir accepté de siéger à ce jury, et pour avoir permis la mise en place du projet Scar Wars.

Un immense merci aux docteurs Gwenaël Rolin et Céline Viennet, co-encadrants de ma thèse, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire. Gwen, merci de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse et de m'avoir fait confiance durant ces 3 années. Merci pour tes précieux conseils lors de l'avancement du projet, pour toutes tes suggestions et pour ton expertise. Cette thèse n'aurait pas été la même sans toi, scientifiquement et humainement parlant. Céline, merci pour ta présence au quotidien au labo, ta douceur, ta gentillesse, ton écoute et tes conseils toujours pertinents. Surtout, merci pour ta bienveillance et pour m'avoir rappelé de ne pas m'oublier durant ces 3 années de science.

Je tiens également à remercier le professeur Jean-Luc Prétet et le docteur Dorothy Supp, pour avoir participé au bon déroulement et à l'avancée du projet via mon comité de suivi de thèse.

Merci aux professeurs Brice Chatelain et Christophe Meyer du service de chirurgie maxillo-faciale du CHU de Besançon, pour leur implication dans le projet Scar Wars. Merci également à toutes les infirmières du service que j'ai eu l'opportunité de croiser, pour m'avoir toujours reçu avec le sourire.

Un grand merci à Franck Monnier et à l'ensemble de l'équipe d'anatomopathologie du CHU de Besançon, pour la réalisation des immunomarquages.

Je remercie chaleureusement le docteur Wilfrid Boireau pour la collaboration nous ayant permis de caractériser la population de vésicules extracellulaires dans nos surnageants de macrophages. Merci de m'avoir initié aux EVs qui étaient encore un mystère pour moi il y a peu, et pour votre implication dans ce projet. Clara, Syrine, merci à vous pour la réalisation des manips.

Enfin, pour le côté plus administratif et l'école doctorale : un immense merci à Martine Gautheron, qui a toujours réponse à toutes nos questions, et ce avec une gentillesse à toute épreuve.

Aux membres de l'UMR Right,

Un merci tout particulier au docteur Sylvain Perruche pour ses précieux conseils qui auront largement contribué à l'évolution de mon projet lors des réunions d'équipe. Merci au docteur Francis Bonnefoy, pour sa disponibilité, son aide technique apportée en cytométrie et ses conseils lors des réunions ATI. Merci aussi à tous les doctorants, actuels ou devenus docteurs depuis : Cécile, Audrey, Blandine, et surtout Mathieu et Mélissa. Mélissa, merci infiniment pour m'avoir légué tes connaissances et ton expertise sur les macros, et ce toujours avec bonne humeur. Merci à toi Mathieu, pour ton aide en cytométrie et pour nous avoir rendu visite régulièrement dans notre bâtiment qui prend l'eau.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes m'ayant formé à des techniques diverses et variées lors de mon arrivée à l'UMR. Gwen, Marion, merci pour m'avoir enseigné les bases de la culture cell, indispensables à tous mes travaux. Un grand merci à Anne Duperrier pour la formation qPCR, et à Mélanie Couturier pour son aide à la prise en main du Sony. Mélanie, merci de m'avoir accueilli lors de mon stage de M1 et de m'avoir transmis la passion de la recherche.

Enfin, merci à l'équipe de l'administration : Sarah, Justine, Anne-Sophie, Morgane et Andréa. Votre gentillesse et votre réactivité ont toujours été au rendez-vous pour chaque demande que j'ai eu envers vous toutes ; je vous remercie grandement pour cela.

A ceux passés dans l'équipe de façon plus ponctuelle : merci à tous les stagiaires avec qui j'ai travaillé durant ces 3 années : Marine, Clara, Lisa, et les médecins Stéphane et Gaëlle.

Stéphane, merci pour ces 6 mois passés avec moi dans ce bureau, merci pour ta bonne humeur et tes blagues au quotidien. Tu as été un modèle de photomontage parfait.

Gaëlle, ah ma Gaga. Merci de m'avoir fait autant rire et d'en même temps avoir montré tant d'implication dans ton projet. Merci pour les soirées au cytomètre, pour la chanson des macros, pour avoir bitché avec moi durant des heures, et pour ton côté nature peinture. Même si tu resteras toujours ma (MA) stagiaire, merci d'être aujourd'hui également devenue mon amie.

Merci à l'équipe du midi, ceux restés pendant 3 ans (et bien plus), et ceux de passage : Pacou, Aurélien, Mymy, David, Alex, Vlad, Eva, Yasmin, Christophe, Marion et Gwen.

Merci à toi Christophe, le roi de l'histo, pour tes conseils au labo. Merci aussi pour ta bonne humeur, pour ton écoute, et ton indulgence sans égale. Mais surtout, merci de m'avoir fait autant rire avec tes blagues parfois douteuses (mes préférées) ...

Gwen (encore toi), merci d'avoir été le genre de directeur de thèse qui me lance des « Une blonde en cache toujours une autre ». Merci de m'avoir appris l'art des bombes « gants + carbo », d'avoir embarqué Gaga à crier des « Zézéééé » beaucoup trop régulièrement depuis l'autre bout du couloir, et bien d'autres choses encore.

Yasmin, merci pour nos discussions en tout genre dans le bureau, et merci de prendre le relai de ce beau sujet.

Et enfin, merci à toi Marion, la 2^{ème} blonde du labo (je sais, c'est moi la 2^{ème} ...). Merci d'avoir toujours été là pour m'aider dans mes manips, et pour avoir toujours tout trouvé lorsque j'avais besoin de je ne sais quel produit caché au fond du labo ... Mais surtout, merci pour ton soutien au quotidien, dans les moments hauts comme dans les moments bas. Merci pour les photomontages, les sculptures sur paraffine et les vidéos d'animaux mignons. Merci d'avoir été ma copine du labo durant 3 ans, et pendant j'espère encore très longtemps.

A mes amis,

A mi-chemin entre le labo et la vie perso, merci à tous les copains du FJC pour cette expérience de vie. Moi qui pensais juste donner un petit coup de main dans l'organisation de cet événement, j'ai finalement rencontré des doctorants tous plus drôles et adorables les uns que les autres. Susie, Clara, Célian, Eline, Jeanne, Charles, Chloé, Sophie, et surtout Bernard et Célestin ; merci pour ces soirées que je ne suis pas prête d'oublier.

A mes amies les plus fidèles, merci à vous toutes d'avoir été là pour me soutenir durant ces 3 années : ma Ju, toujours là depuis tant d'années ; Susie, Anaïs et Julie, merci pour ces pétages de plombs durant les révisions et pour votre soutien durant la thèse, hein Susie...!) ; Jess, Erika, Célia et Chacha, merci de m'avoir laissé me faire ma place dans votre cercle déjà bien solide et de m'accompagner au quotidien depuis ; Margaux, Cloclo, mes sœurs, merci d'être vous. Merci pour vos bêtises et votre gentillesse sans égale. Vous avez toujours été là pour moi, je ne vous remercierai jamais assez pour ça.

A ma famille,

Papa, maman, merci pour toutes ces belles valeurs que vous m'avez transmises et pour votre soutien à chaque instant. Merci de m'avoir donné envie d'être passionnée par mon travail autant que vous l'avez été. J'espère que vous êtes aussi fiers de moi que je suis fière de vous avoir comme parents.

Camille, ma grande sœur, merci d'avoir été présente durant ces 3 années et bien avant. Tu as été un exemple de sérieux (et pas que), et je ne te remercierai jamais assez pour ça. Merci aussi à toi Jéré, pour avoir égayé mes soirées de tes captures d'écrans toutes plus beaux les unes que les autres.

Viviane, mamie et mamie, les Dirand et Perrein, merci pour tous les bons moments passés avec vous durant ces 3 années et bien avant.

Alexandre, mon pilier, merci pour ta présence au quotidien et ton soutien inégalable. Tu m'as supporté pendant cette dernière année de thèse ; je crois que maintenant on peut tout surmonter ...

A vous, mes grands-pères, j'espère que vous êtes fiers.

PRESENTATIONS EN CONGRES

Communications orales

❖ **Keloid Resolution through Fibrotic Fibroblast and Macrophages Interaction Study**

Présenté au NAPA 2022 (*11th International Conference on Nutrition and Physical Activity in Ageing, Obesity and Cancer*) en décembre 2022 (Chiang Mai, Thaïlande)

Prix de la meilleure présentation (Annexe 1)

❖ **Keloid Resolution through Macrophages subset Modulation**

Présenté au *4th International Keloid Symposium* en octobre 2022 (Montpellier, France)

Posters

❖ **Macrophage phenotype is determinant for fibrosis development in keloid disease**

Z.Dirand, M.Maroux, M.Tissot, D.Supp, C.Viennet, S.Perruche, G.Rolin

Présenté aux *Innovative Therapies Days* en octobre 2023 (Besançon, France)

❖ **2D and 3D models to address fibrosis resolution through keloid fibroblasts and macrophages interaction study**

Z.Dirand, M.Tissot, C.Viennet, S.Perruche, G.Rolin

Présenté au *Keystone Symposia on Tissue Fibrosis and Repair* en juin 2022 (Keystone, USA)

❖ **Les sphéroïdes : un modèle 3D innovant pour étudier la contribution des fibroblastes et des cellules immunitaires au processus de fibrose**

Z.Dirand, M.Tissot, C.Viennet, G.Rolin

Présenté au *Forum des Jeunes Chercheurs 2021* en juin 2021 (Besançon, France)

PUBLICATIONS

❖ **Macrophage phenotype is determinant for fibrosis development in keloid disease**

Z.Dirand, M.Maroux, M.Tissot, D.Supp, S.Perruche, C.Viennet, G.Rolin

Matrix Biology – accepté pour publication le 06 mars 2024.

<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2024.03.001>

❖ **Is spheroid a relevant model to address fibrogenesis in keloid research?**

Z.Dirand, M.Tissot, C.Viennet, G.Rolin

Biomedicines – Publié en août 2023

DOI : 10.3390/biomedicines11092350

❖ **Beneficial effects of a blended fibroin/aloe gel extract film on the biomolecular mechanism(s) via the MAPK/ERK pathway relating to diabetic wound healing**

P.Phimnuan, Z.Dirand, M.Tissot, S.Worasakwutiphong, A.Sittichokechaiwut, F.Grandmottet, J.Viyoch, C.Viennet

ACS Omega – Publié en février 2023

PDMI : 36844531

DOI : 10.1021/acsomega.2c07507

❖ **Halofuginone regulates keloid fibroblast fibrotic response to TGF- β induction**

P.Marty, B.Chatelain, T.Lihoreau, M.Tissot, Z.Dirand, P.Humbert, C.Senez, E.Secomandi, C.Isidoro, G.Rolin

Biomedicine & Pharmacotherapy – Publié en mars 2021

PMID : 33433355

DOI : 10.1016/j.biopha.2020.111182

LISTE DES ABREVIATIONS

- α -SMA: *α -Smooth Muscle Actin* – Actine α du muscle lisse
- CD: *Cluster of Differentiation* – Cluster de différenciation
- CCL: *Chemokine Ligand* – Ligand de chimiokine
- CM : *Conditioned-Medium* – Milieu induit
- CSE: Cellule Souche Embryonnaire
- CTGF: *Connective Tissue Growth Factor* – Facteur de croissance des tissus conjonctifs
- CXCL: *Chemokine (C-X-C motif) Ligand* – Ligand de chimiokine à motif C-X-C
- CXCR: *Chemokine (C-X-C motif) Receptor* – Récepteur de chimiokine à motif C-X-C
- DAMP: *Damage-Associated Molecular Pattern* – Motifs moléculaires associés aux dégâts
- DCs: *Dendritic cells* – Cellules dendritiques
- EGF: *Epidermal Growth Factor* – Facteur de croissance épidermique
- FC: Fibroblastes de Chéloïde
- FDS: Fibroblastes Dermiques Sains
- FGF2: *Fibroblast Growth Factor 2* – Facteur de croissance fibroblastique 2
- GM-CSF: *Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor* – Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et macrophages
- GvHD: *Graft VS Host Disease* – Maladie du greffon contre l'hôte
- GWAS: *Genome-Wide Association Study* – Etude d'association pangénomique
- HIF-1 α : *Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha* – Facteur inductible par l'hypoxie 1
- HLA: *Human Leukocyte Antigen* – Antigène de leucocyte humain
- HTS: *HyperTrophic Scars* – Cicatrices hypertrophiques
- IGF-1: *Insulin-like Growth Factor 1* – Facteur de croissance analogue à l'insuline 1
- IGFBP: *Insulin-like Growth Factor Binding Protein* – Protéine de liaison au facteur de croissance analogue à l'insuline
- IFN γ : Interféron gamma
- IL: Interleukine
- iNOS: *inducible Nitric Oxide Synthase* – Oxyde nitrique synthase inductible
- LPS: LipoPolySaccharide
- MEC: Matrice ExtraCellulaire

MerTK: *Myeloid epithelial reproductive proto-oncogene Tyrosine Kinase* - Tyrosine kinase proto-oncogène reproductrice de l'épithélium myéloïde

MCP-1/CCL2: *Monocyte Chemoattractant Protein 1* – Protéine chimioattractante monocyttaire 1

M-CSF/CSF-1: *Macrophages Colony Stimulating Factor 1* – Facteur 1 de stimulation des colonies de macrophages

MMP: *Matrix Metalloprotease* – Métalloprotéase Matricielle

NK: *Natural Killer* – Tueuse naturelle

PAMP: *Pathogen-Associated Molecular Pattern* – Motifs moléculaires associés aux pathogènes

PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cells* – Cellules mononuclées du sang périphérique

PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor* – Facteur de croissance dérivé des plaquettes

PDGFR: *Platelet-Derived Growth Factor Receptor* – Récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes

SAMacs: *Scar-Associated Macrophages* – Macrophages associés aux cicatrices

SDF-1/CXCL12: *Stromal cell-Derived Factor 1* – Facteur 1 dérivé des cellules stromales

SFRP1: *Secreted frizzled-related protein 1* – Protéine sécrétée apparentée à la protéine frizzled 1

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* – Polymorphisme nucléotidique simple

SSc: *Systemic Sclerosis* – Sclérose systémique

TAM : *Tumor Associated Macrophages* – Macrophages associés aux tumeurs

TEM: Transition Epithélio-Mésenchymateuse

T_{EM}: *Effector Memory T lymphocyte* – Lymphocyte T effecteur mémoire

TGF-β: *Transforming Growth Factor β1* – Facteur de Croissance Transformant β

TGF-βR: *Transforming Growth Factor β1 Receptor* - Récepteur au facteur de Croissance Transformant β

TLR: *Toll-Like Receptor* – Récepteur de type *Toll*

T_{RM}: *Resident Memory T lymphocyte* – Lymphocyte T résident mémoire

TIMP: *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases* – Inhibiteur Tissulaire des Métalloprotéinases Matricielles

Th1: *T helper 1 lymphocyte* – Lymphocyte T auxiliaire 1

Th2: *T helper 2 lymphocyte* – Lymphocyte T auxiliaire 2

Treg: *T regulator lymphocyte* – Lymphocyte T régulateur

TNF: *Tumor Necrosis Factor* – Facteur de nécrose tumorale

VEGF: *Vascular-Endothelial Growth Factor* – Facteur de croissance endothélial vasculaire

FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Maladies fibrotiques ayant des atteintes systémiques ou localisées	15
Figure 2 : Les différentes populations de macrophages classiquement décrites, facteurs d'induction et phénotypes	18
Figure 3 : Cinétique d'intervention des macrophages de type M1 et M2 dans le processus de cicatrisation physiologique	19
Figure 4 : Représentation schématique de la signalisation du TGF- β Smad et non-Smad	24
Figure 5 : Macrophages associés aux cicatrices et à la fibrose : les SAMacs.....	29
Figure 6 : Photographies de chéloïdes massives au niveau de la mâchoire, du torse et du dos.....	31
Figure 7 : Différentes formes de chéloïdes retrouvées selon le site de développement de la cicatrice.....	33
Figure 8 : Le développement multifactoriel des chéloïdes.....	34
Figure 9 : Influence du TGF- β sur les fibroblastes de chéloïdes	46
Figure 10 : Représentation schématique du réseau immunitaire décrit au sein des chéloïdes installées	49
Figure 11 : Effet des macrophages de type M1 et M2 sur les fibroblastes dermiques sains	58
Figure 12 : Représentation schématique des différents modèles <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i> utilisés pour l'étude des chéloïdes	63
Figure 13 : Cartographie des différentes zones décrites au sein des chéloïdes	64
Figure 14 : Photographies illustrant l'évolution du modèle PLGA dans des souris athymiques	69
Figure 15 : Stratégie de gating permettant l'isolation de la lignée monocytes/macrophages et la caractérisation de leurs phénotype au sein du tissu cutané sain ou chéloïdien.....	141
Figure 16 : Analyse des marqueurs exprimés par les macrophages au sein du tissu cutané sain ou des chéloïdes.....	142
Figure 17 : Schéma synoptique des traitements réalisés sur les fibroblastes de chéloïdes afin de d'évaluer les potentiels effets préventifs (A) et thérapeutiques (B) des milieux induits de macrophages sur le développement de la fibrose.....	143
Figure 18 : Etude de l'effet préventif du sécrétome de macrophages sur l'induction du profil fibrotique des fibroblastes de chéloïde.....	144
Figure 19 : Etude de l'effet thérapeutique du sécrétome de macrophages sur l'induction du profil fibrotique des fibroblastes de chéloïde.....	145
Figure 20 : Evaluation des capacités des fibroblastes de chéloïdes à moduler le phénotype des macrophages.....	147
Figure 21 : Evaluation de la reprogrammation des macrophages par leurs sécrétomes	150
Figure 22 : Analyse de la population de vésicules extracellulaires au sein des milieux induits de macrophages.....	152
Figure 23 : Représentation schématique de la boucle d'activation pouvant induire le dépôt constant de MEC au sein des chéloïdes.....	158
Figure 24 : Evaluation de la reprogrammation des macrophages par leurs milieux induits	183

TABLE DES MATIERES

PARTIE I – Etat de l’art.....	13
1. La place des macrophages dans la fibrose tissulaire	14
1.1. La fibrose tissulaire	14
1.2. Les macrophages	16
1.2.1. Histoire et hétérogénéité.....	16
1.2.2. Place des macrophages dans la réparation tissulaire	19
1.3. L’implication des macrophages dans la fibrose tissulaire	20
1.3.1. Rôle général des macrophages dans la fibrose.....	20
1.3.2. Interactions entre macrophages et fibroblastes.....	22
1.3.2.1. <i>Le TGF-β : master régulateur de la fibrose tissulaire.....</i>	<i>22</i>
1.3.2.2. <i>Le PDGF, activateur des fibroblastes</i>	<i>24</i>
1.3.2.3. <i>Rôle de CXCL12/SDF-1</i>	<i>25</i>
1.3.2.4. <i>Rôle du M-CSF/CSF-1</i>	<i>25</i>
1.3.2.5. <i>Rôle de MCP-1/CCL2.....</i>	<i>26</i>
1.3.2.6. <i>Rôle de l’IL-6</i>	<i>26</i>
1.3.2.7. <i>Echappement des fibroblastes à la phagocytose</i>	<i>27</i>
1.4. Un sous type de macrophages associé à la fibrose, les SAMacs.....	27
2. Les chéloïdes	30
2.1. Histoire des chéloïdes.....	30
2.2. Description générale.....	30
2.3. Histopathologie	31
2.4. Hétérogénéité clinique des chéloïdes	32
2.5. Les chéloïdes : une maladie multifactorielle	33
2.5.1. Influence de l’ethnie - épidémiologie	34
2.5.2. Prédispositions et anomalies génétiques	35
2.5.3. Rôle de l’épigénétique	37
2.5.4. Environnement mécanique et topologie	38
2.5.5. Autres facteurs.....	40

2.6.	Pathogénèse d'une maladie fibrotique à composante inflammatoire	40
2.6.1.	Principaux médiateurs de la fibrose : les fibroblastes de chéloïde.....	40
2.6.1.1.	<i>Fibroblastes de chéloïdes VS fibroblastes sains</i>	40
2.6.1.2.	<i>Hétérogénéité intralésionnelle des fibroblastes de chéloïde</i>	43
2.6.2.	Influence du TGF- β dans la pathogénèse des chéloïdes.....	45
2.7.	Les macrophages et le système immunitaire dans la pathogénèse des chéloïdes.....	47
2.7.1.	Les lymphocytes T.....	48
2.7.1.1.	<i>Les Th1</i>	48
2.7.1.2.	<i>IL-13, IL-4 et rôle des Th2</i>	50
2.7.1.3.	<i>Les lymphocytes T régulateurs</i>	50
2.7.1.4.	<i>Les Th17</i>	51
2.7.2.	Les mastocytes.....	51
2.7.3.	Cellules dendritiques	52
2.7.4.	Cellules souches.....	53
2.7.5.	Kératinocytes	53
2.7.6.	L'IL-6 et la voie JAK/Stat.....	54
2.7.7.	Les macrophages	55
2.8.	Traitements	59
2.9.	Modèles d'étude de la maladie chéloïdienne	61
2.9.1.	Modèles in vitro et ex vivo.....	61
2.9.1.1.	<i>Modèles cellulaires in vitro</i>	62
2.9.1.2.	<i>Culture d'explants – modèles ex vivo</i>	65
2.9.2.	Modèles in vivo	66
2.9.2.1.	<i>Modèles basés sur l'utilisation de tissu chéloïdien</i>	66
2.9.2.2.	<i>Modèles d'ingénierie cellulaire et tissulaire</i>	67

PARTIE III – Etudes expérimentales 72

1.	Evaluation de l'effet anti-fibrotique de l'halofuginone sur les fibroblastes de chéloïde.....	73
1.1.	Rationnel de l'étude	73
1.2.	Article.....	75
1.3.	Conclusion de l'étude	91

2.	Les sphéroïdes sont-ils un modèle pertinent pour étudier la fibrogénèse dans les chéloïdes ?	
		92
2.1.	Rationnel de l'étude	92
2.2.	Article.....	93
2.3.	Conclusion de l'étude	110
3.	Le phénotype des macrophages est déterminant au cours du développement de la fibrose dans les chéloïdes	111
3.1.	Rationnel de l'étude	111
3.2.	Article.....	112
3.3.	Conclusion de l'étude	139
4.	Données complémentaires.....	140
4.1.	Caractérisation des sous-types macrophagiques au sein des chéloïdes et de la peau saine	140
		140
4.1.1.	Méthodologie	140
4.1.2.	Résultats	142
4.1.3.	Conclusion.....	142
4.2.	Effet préventif et thérapeutique des sécrétomes de macrophages sur les fibroblastes de chéloïde	143
4.2.1.	Méthodologie	143
4.2.2.	Résultats - Evaluation des effets préventifs des sécrétomes de macrophages sur l'activation myofibroblastique	144
4.2.3.	Résultats - Evaluation des effets thérapeutiques des sécrétomes de macrophages sur l'activation myofibroblastique	144
4.2.4.	Conclusion.....	145
4.3.	Effet du sécrétome de fibroblastes de chéloïde sur la polarisation des macrophages ..	145
4.3.1.	Méthodologie	145
4.3.2.	Résultats	146
4.3.3.	Conclusion.....	148
4.4.	Reprogrammation des macrophages	148
4.4.1.	Méthodologie.....	148
4.4.2.	Résultats	149

4.4.3.	Conclusion.....	149
4.5.	Analyse des vésicules extracellulaires au sein des sécrétomes de macrophages.....	151
4.5.1.	Méthodologie	151
4.5.2.	Résultats	151
4.5.3.	Conclusion.....	152
PARTIE IV – Discussion générale		153
1.	Mise en place du modèle sphéroïde.....	154
2.	Les macrophages : régulateurs clés de la pathogénèse des chéloïdes	156
2.1.	Une boucle d’activation permanente entre fibroblastes et macrophages au sein des chéloïdes.....	158
2.2.	Les macrophages pro-inflammatoires en tant que thérapie pour limiter le développement des chéloïdes	159
2.3.	Vers une possible reprogrammation des macrophages en tant que thérapie contre les chéloïdes.....	160
2.4.	Limites de l’étude	162
3.	Contraintes expérimentales.....	163
3.1.	Variabilité inter-patients	163
3.2.	Phénotype des fibroblastes	163
PARTIE V – Conclusion.....		165
PARTIE VI – Annexes		167
PARTIE VII – Références bibliographiques.....		182

PARTIE I

-

Etat de l'art

1. La place des macrophages dans la fibrose tissulaire

1.1. La fibrose tissulaire

La fibrose est une pathologie tissulaire caractérisée par une accumulation de MEC (Matrice Extra Cellulaire) au niveau du tissu conjonctif d'un organe. Dans les stades fibrotiques les plus avancés, cet excès matriciel entraîne le durcissement du tissu touché et sa défaillance progressive. La fibrose se développe généralement suite à lésion tissulaire persistante, chronique, ou qui impacte très fortement l'intégrité du tissu. En effet, dans le cadre d'une simple blessure légère, l'inflammation qui se met en place est résolue en quelques jours. Elle laisse alors place à un environnement pro-cicatriciel, caractérisé par une activation modérée des fibroblastes et leur dépôt de MEC. Après formation du néo tissu, les cellules immunitaires ayant permis de réguler la cicatrisation sont rapidement éliminées, de même que les myofibroblastes. Le tissu retrouve ainsi son intégrité et ses propriétés biologiques, et ce après seulement quelques semaines¹. Dans le cadre d'une lésion importante ou persistante, la mise en place d'une inflammation chronique est susceptible d'entraîner une perturbation de la régénération tissulaire. L'activation des fibroblastes devient alors permanente, et les composants de la MEC s'accumulent en quantité excessive^{2,3}. On observe en conséquence la formation d'un tissu fibrotique, composé d'un agrégat de matrice, myofibroblastes et cellules immunitaires, qui ensemble entraînent le déclin de l'organe et son dysfonctionnement^{4,5}.

Comme illustré dans la *Figure 1*, les maladies fibrotiques sont susceptibles de toucher de nombreux organes (peau, cœur, rein, poumons, foie ...). On distingue alors les maladies fibrotiques systémiques, qui ont une atteinte généralisée (sclérodermie, sclérose systémique), des maladies plus localisées, touchant un organe précis (fibrose pulmonaire idiopathique, hépatite C, fibrose rénale induite par l'auto-immunité, chéloïdes ...) ^{6,7}. Véritable problème de santé publique, la fibrose serait responsable de plus de 40% des décès dans les pays développés ; un chiffre surpassant celui de la mortalité liée aux cancers et aux maladies cardio vasculaires^{2,4}.

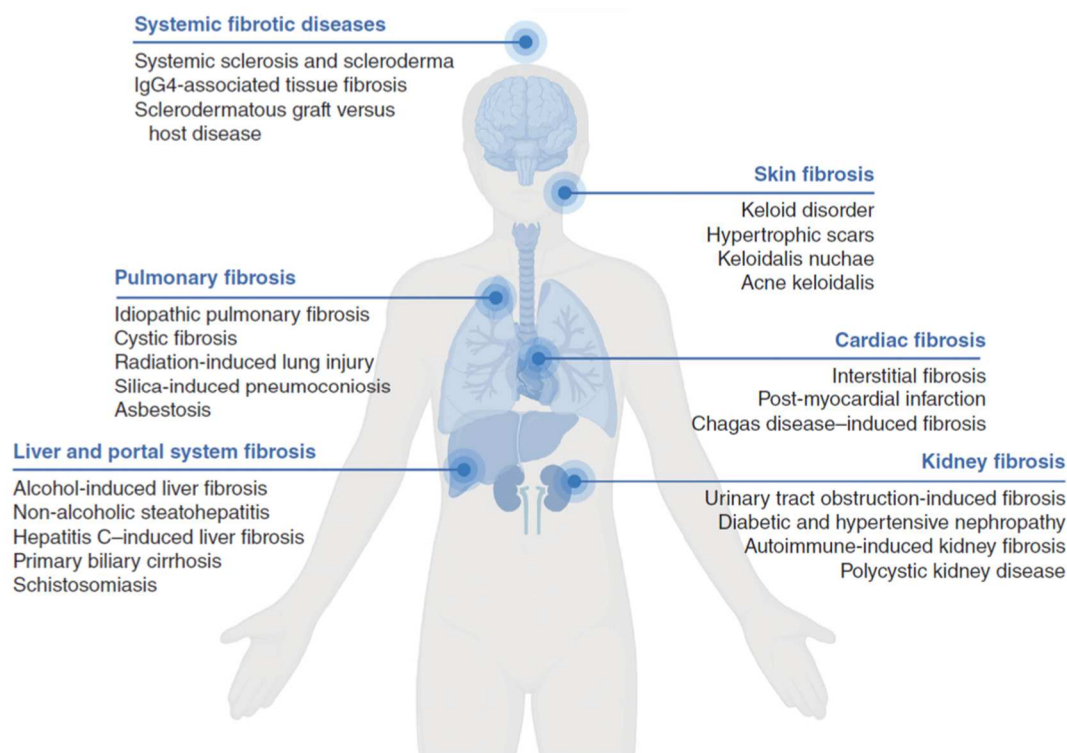


Figure 1 : Maladies fibrotiques ayant des atteintes systémiques ou localisées

D'après Alexa. J. Cohen *et al*, *Keloid Disorder: Genetic basis, Gene Expression Profiles, and Immunological Modulation of the Fibrotic Processes in the Skin*, Cold Spring Harbor perspectives in Biology, 2023.

Les mécanismes conduisant au développement de la fibrose sont maintenant de mieux en mieux décrits, notamment depuis la généralisation de techniques de screening comme les GWAS (*Genome Wide Interaction Study* - Etude des interactions à l'échelle du génome), la protéomique ou encore le *single cell RNA sequencing*. La fibrogénèse a pu ainsi être décrite comme liée à un système complexe, impliquant les fibroblastes, leur environnement immunitaire, inflammatoire et matriciel.

Dans les sections suivantes, nous détaillerons tout d'abord l'état de l'art concernant le rôle des macrophages dans le développement de la fibrose tissulaire. Nous ferons ensuite le focus sur la maladie chéloïdienne, ses caractéristiques cliniques et les différents facteurs influençant son développement. Nous réaliserons une synthèse des connaissances des mécanismes liés à la pathogénèse des chéloïdes, en mettant en lumière le rôle des macrophages dans l'axe « immunité-fibroblastes-fibrose ». Enfin, une dernière partie sera dédiée aux modèles expérimentaux actuellement utilisés pour l'étude des chéloïdes.

1.2. Les macrophages

1.2.1. Histoire et hétérogénéité

Les macrophages ont été décrits pour la première fois dans le cadre de la découverte du processus de phagocytose par Ilya Mechnikov and Paul Ehrlich, détenteurs du prix Nobel de médecine et physiologie 1908⁸. Leur découverte de « *cellules capables d’engloutir et d’éliminer* » une épine de rose préalablement greffée dans des larves d’étoiles de mer a révolutionné la compréhension des mécanismes de défense de l’organisme. Ce phénomène a ensuite été observé par les deux scientifiques dans d’autres espèces, avant d’être proposé comme l’un des mécanismes de défense majeurs du corps humain. Ce processus nommé « phagocytose » est caractérisé par l’implication de cellules appelées « phagocytes », dont font partie les macrophages.

Cellules de l’immunité innée et d’origine myéloïde, les macrophages sont présents dans tous les organes et participent à de nombreux processus immunitaires permettant de maintenir l’homéostasie du corps⁹. Ils peuvent être résidents dans les tissus^{10,11}, ou se différencier à partir des monocytes circulants provenant de la moelle osseuse¹². Comme suggéré par Mechnikov et Erlich, leur principal rôle est l’ingestion et l’élimination de pathogènes et/ou de déchets cellulaires au cours du processus de phagocytose. Suite à cette phagocytose, les macrophages sont capables de présenter des peptides antigéniques aux cellules de l’immunité innée, comme les neutrophiles et cellules lymphoïdes, via des TLR (*Toll Like Receptors* – Récepteurs de type *toll-like*)¹³.

Les macrophages sont caractérisés par leur grande plasticité et par les différents phénotypes qu’ils peuvent adopter. Leur polarisation est modulée par le microenvironnement dans lequel ils évoluent, et également entre les différents tissus (cellules de Kupffer dans le foie¹⁴, cellules de Langerhans dans la peau¹⁵, macrophages alvéolaires dans le poumon¹⁶, cellules microgliales dans le cerveau¹⁷ ...). Cette plasticité leur confère un rôle essentiel dans le maintien de l’homéostasie, et font des macrophages une cellule clé dans l’orchestration et la résolution de l’inflammation⁹.

Eu égard à leur plasticité et leur diversité d’action, les macrophages ont été classés selon plusieurs phénotypes distincts. La première classification a été réalisée dans les années 1990¹⁸, et admettait la présence de deux types de macrophages : ceux permettant la défense

contre les pathogènes, activés par le LPS (*LipoPolySaccharide* - Lipopolysaccharide) et l'IFN γ (*Interferon gamma* – Interféron gamma), et ceux possédant un rôle dans la réparation tissulaire, l'angiogénèse et la prolifération cellulaire, activés par l'IL-4 (« IL » : *Interleukin* – Interleukine)^{18,19}. Ces deux principaux types de macrophages sont encore décrits aujourd'hui, en tant que :

- ❖ Macrophages « classiquement activés », décrits comme pro-inflammatoires et anti-tumoraux, appelés M1.
- ❖ Macrophages « alternativement activés », plutôt anti-inflammatoires et pro-cicatriciels, appelés M2.

Cette classification, bien qu'étant encore celle majoritairement utilisée dans les publications scientifiques, a depuis été précisée, notamment par la distinction de plusieurs sous-types de macrophages M2, nommés M2a, M2b, M2c et M2d^{18,20}.

Aujourd'hui, la complexité et la forte variabilité phénotypique des macrophages dans les différents tissus et pathologies incitent de plus en plus à manipuler avec précaution les termes de « M1 » et de « M2 ». Plusieurs équipes de recherche ont récemment employé d'autres façons de décrire les sous-populations de macrophages, selon leur rôle dans le tissu (« SAMac » *Scar-Associated Macrophages*²¹, « TAM » *Tumor-Associated Macrophages*²² ...), les cytokines induisant leur différenciation^{23–26}, ou même très récemment selon leur profil d'auto-fluorescence²⁷. Afin de s'accorder avec la majorité des articles publiés jusqu'alors, nous employerons dans ce manuscrit la classification classique décrite en détail ci-dessous, et basée sur la distinction entre M1 et M2.

Comme présenté en *Figure 2*, les sous-types de macrophages sont généralement définis par les cytokines permettant leur polarisation, par leur expression de marqueurs d'activation, leur sécrétome, mais également par leur rôle au sein des tissus. Les macrophages de type M1 sont principalement activés par l'IFN γ , le TNF (*Tumor Necrosis Factor* – Facteur de nécrose tumorale) et les DAMP (*Damaged Associated Molecular Pattern* – Motifs moléculaires associés aux dommages), et expriment les marqueurs de co-stimulation CD80 et CD86. Ils synthétisent des cytokines pro-inflammatoires en grande quantité, notamment l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α . Les macrophages de type M2, qui sont anti-inflammatoires, sont classiquement divisés en 4 groupes, nommés M2a, M2b, M2c et M2d. Les macrophages de types M2a,

impliqués dans le remodelage tissulaire et la fibrose, sont principalement induits par l'IL-4 et l'IL-13, et expriment le marqueur membranaire CD206. Ils sécrètent des cytokines pro-fibrotiques et anti-inflammatoires, notamment l'IL-10 et le TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor Beta 1* – Facteur de croissance transformant bêta 1). Les macrophages induits par les complexes immuns et le LPS, nommés M2b, sont impliqués dans la régulation de l'inflammation, et sécrètent plusieurs cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 β et le TNF α , mais également des cytokines pro-résolutives comme l'IL-10. Les M2c possèdent un rôle dans la phagocytose et dans le processus de cicatrisation. Ils sont activés par les glucocorticoïdes et par des cytokines pro-fibrotiques comme l'IL-10 et le TGF- β , et produisent ces mêmes cytokines. Enfin, les M2d sont activés par les agonistes du TLR et produisent de l'IL-10, du TGF- β et du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor* – Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire). Ils possèdent des capacités pro-angiogéniques et pro-tumorales^{18,28,29}.

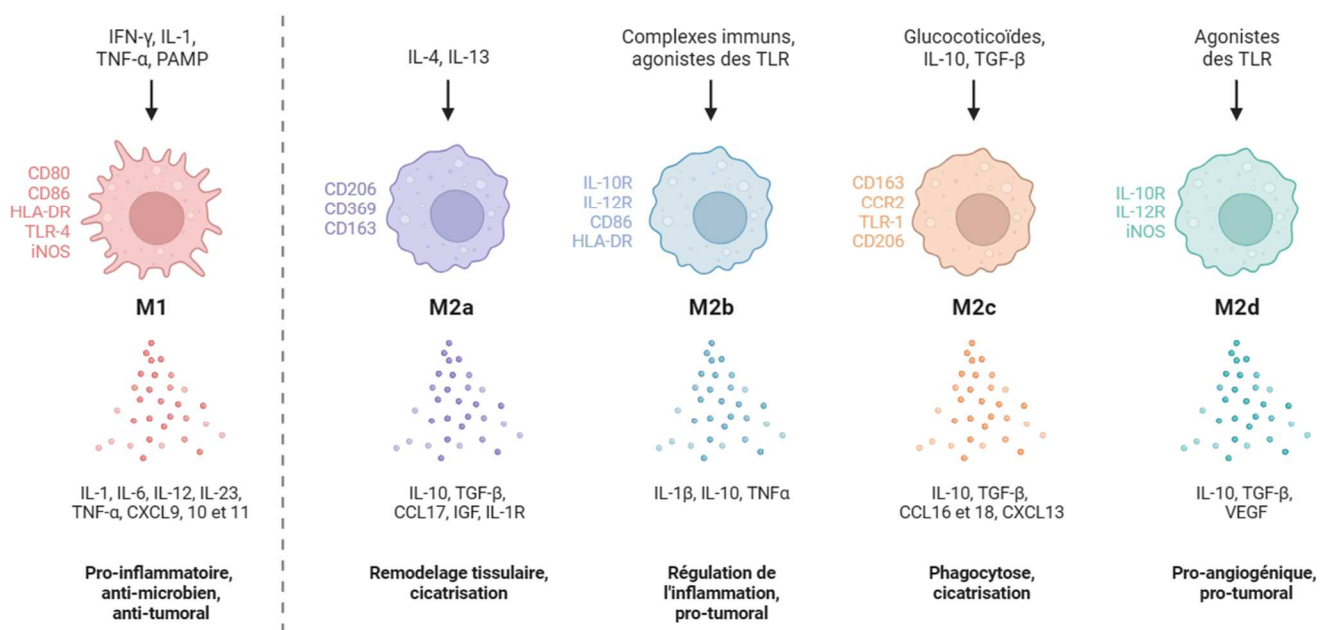


Figure 2 : Les différentes populations de macrophages classiquement décrites, facteurs d'induction et phénotypes

IFN : interféron, IL : interleukine, TNF : facteur de tumeur nécrosant, PAMP : motifs moléculaires associés aux pathogènes, HLA-DR : isotype DR de l'antigène leucocytaire humain, TLR : récepteur de type *Toll-like*, iNOS : oxyde nitrique synthase inductible, CXCL : ligand de chémokine à motif C-X-C, IGF : facteur de croissance dépendant de l'insuline, TGF- β : facteur de croissance transformant bêta, CCL : ligand de chémokine, CCR : récepteur de chimiokine, VEGF : facteur de croissance endothélial vasculaire.

Modifié de Kozo Nakai, *Multiple roles of macrophages in skin*, 2021, Journal of Dermatological Science.

Schéma réalisé avec Biorender®.

1.2.2. Place des macrophages dans la réparation tissulaire

En réponse à une lésion tissulaire, le processus de cicatrisation physiologique se caractérise par une transition orchestrée des macrophages entre le stade inflammatoire à prédominance M1, et le remodelage du néo-tissu caractérisé par la présence importante de M2 (Figure 3)³⁰.

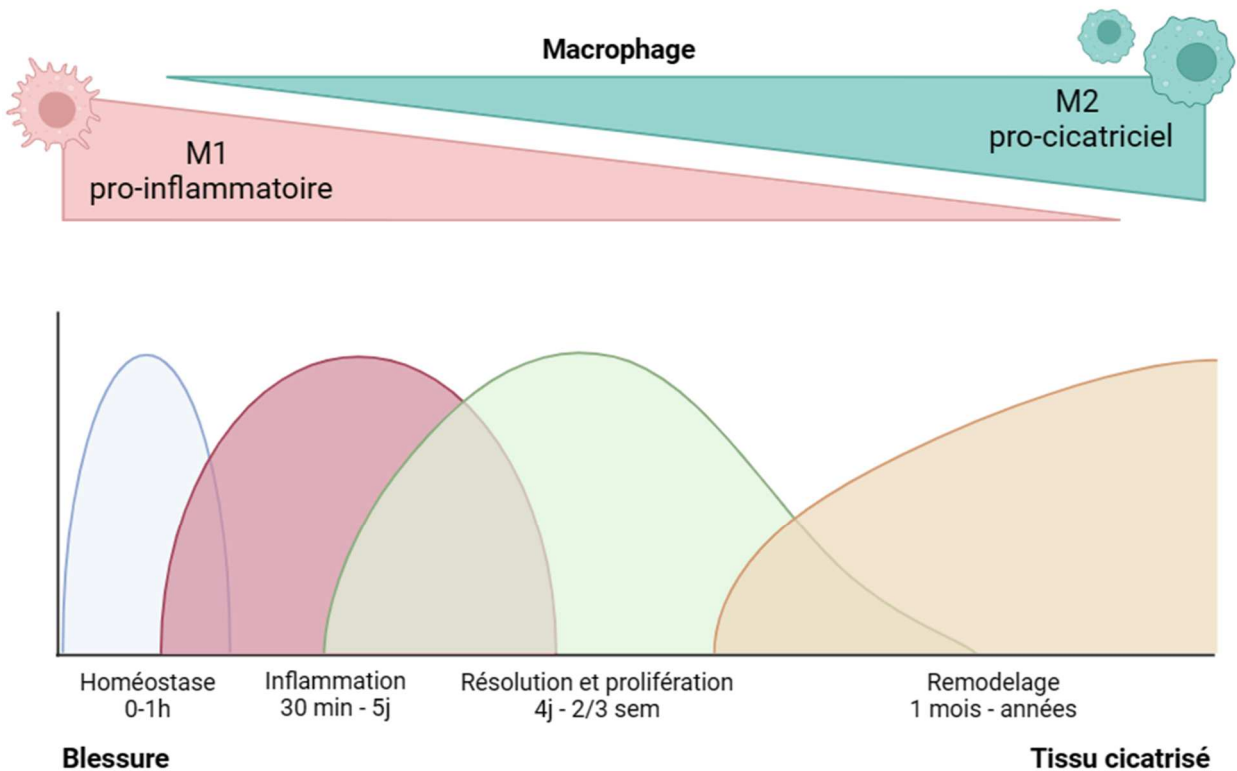


Figure 3 : Cinétique d'intervention des macrophages de type M1 et M2 dans le processus de cicatrisation physiologique

Les macrophages de type M1 pro-inflammatoires sont majoritaires durant les phases précoces (homéostasie et inflammation). Par la suite, lors des phases de résolution et de remodelage, les macrophages de type M2 pro-cicatriciels permettent d'activer les fibroblastes, et contribuent ainsi à la formation d'un nouveau tissu sain.

Modifié de Harris *et al*, Neutrophil-macrophage cooperation and its impact on tissue repair, Immunology and Cell Biology, 2019

Schéma réalisé avec Biorender®.

Durant la phase inflammatoire de la cicatrisation, les macrophages acquièrent un phénotype pro-inflammatoire et anti-microbien (M1) en réponse à l'IFN γ et aux signaux de dangers présents dans leur environnement [DAMP, PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Pattern* – Motifs moléculaires associés aux pathogènes)]. Ils vont alors synthétiser de l'IL-8 qui permettra le recrutement et l'activation des neutrophiles³¹. Les macrophages permettront également de phagocyter les agents pathogènes, puis les neutrophiles, lors de la phase de résolution³². Les macrophages de type M1 jouent également un rôle important de façon

directe sur le remodelage de la MEC provisoire, puisqu'ils synthétisent des MMPs (*Matrix Metalloproteases* - Métalloprotéases matricielles), leur permettant de digérer le thrombus pour faciliter leur migration³³.

Suite à l'intervention des lymphocytes, et notamment des Th2 (*Lymphocyte T helper 2* – Lymphocytes T auxiliaires), producteurs d'IL-4 et d'IL-13, le phénotype des macrophages va être orienté vers un profil M2, favorisant le remodelage et la résolution de l'inflammation³⁴. Durant la phase de remodelage, ces macrophages de type M2 phagocytent les myofibroblastes présents sur le site de la plaie et entrés en apoptose. Ils permettront ainsi de façon indirecte de stopper le dépôt de MEC au sein de la plaie, et de conduire à une cicatrisation physiologique. Les macrophages induits par l'IL-10 (M2c) pourraient également médier la dégradation de la MEC en synthétisant des MMPs durant la phase de remodelage³⁵. Les M2 produisent également du VEGF, qui permet d'induire la vascularisation du néo-tissu³⁶.

La perturbation de cet équilibre entre les différentes phases de la réparation tissulaire peut conduire à une inflammation chronique et non résolue, qui engendre une sur-activation des fibroblastes. Ceux-ci déposent en réponse des quantités abérantes de matrice extracellulaire, qui induisent la formation d'un tissu fibreux pathologique.

1.3. L'implication des macrophages dans la fibrose tissulaire

1.3.1. Rôle général des macrophages dans la fibrose

Le rôle clé des macrophages dans la fibrose a été démontré par de nombreuses équipes de recherche au cours des dernières années. Malgré tout, des interrogations persistent quant à leur effet différentiel dans certaines pathologies fibrotiques. Plusieurs études ont suggéré que ces différences dans le rôle des macrophages pourraient être inhérentes à leur phénotype, à l'organe dans lequel ils évoluent, ou encore à leur cinétique d'implication dans la fibrose.

Plusieurs études *in vivo* ont par exemple montré qu'une déplétion totale des macrophages permettrait de limiter la progression de la fibrose tissulaire au niveau rénal³⁷⁻⁴⁰, pulmonaire^{41,42}, hépatique⁴³ et cutané⁴⁴⁻⁴⁶, suggérant leur potentiel pro-fibrotique. Deux études publiées dans les années 2000 ont complété ces résultats, en investiguant la cinétique d'implication des macrophages dans le développement de la fibrose. Les auteurs ont alors

montré que que la déplétion des macrophages durant l'initiation du processus de cicatrisation limitait son développement^{47,48}, probablement en médiant l'apoptose des fibroblastes au sein du tissu¹. Les macrophages pro-inflammatoires présents en abondance durant la phase précoce seraient en effet requis pour la mise en place des phases terminales du processus de cicatrisation⁴⁷. Une déplétion tardive des macrophages induirait en revanche un état de fibrose prolongé, dans lequel les fibroblastes survivraient et induiraient l'accumulation de MEC au sein du tissu⁴⁸.

Le rôle différentiel des macrophages de type M1 et M2 dans le développement de la fibrose a également largement été rapporté. En effet, plusieurs revues de la littérature ont admis que les macrophages de type M2 présenteraient un profil pro-fibrotique, via la synthèse de nombreux médiateurs pro-cicatriciels comme le TGF- β , le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor* – Facteur de croissance dérivé des plaquettes), le TNF- α , l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1* – Facteur de croissance analogué à l'insuline-1), CCL17 ou l'IL-10. Ensembles, ces cytokines permettraient d'induire la prolifération des fibroblastes et leur synthèse matricielle, induisant le développement d'une fibrose⁴⁹⁻⁵⁴. A l'inverse, les macrophages de type M1 pro-inflammatoires sont quand à eux décrits comme plutôt anti-fibrotiques, via la synthèse de MMPs induisant la dégradation de la MEC⁵⁵⁻⁵⁷.

Cette catégorisation de l'activité distincte entre les M1 et les M2 est à considérer de façon modérée, dans la mesure où leur activité pourrait différer selon les organes et la pathologie étudiée. Plusieurs études ont notamment suggéré un effet anti-fibrotique des macrophages de type M2 au niveau cardiaque, qui serait médié par leurs capacités anti-inflammatoires⁵⁸⁻⁶¹. Certaines équipes ont quant-à elles montré que les M1 posséderaient des capacités pro-fibrotiques, sans pour autant préciser les mécanismes moléculaires impliqués^{61,62}. Lis-Lopez et ses collaborateurs ont même montré que la déplétion des macrophages de type M1 pouvait atténuer la fibrose pulmonaire⁶³. Les auteurs ont alors supposé que la déplétion des M1 diminuerait le stock de macrophages pouvant être polarisés en M2 durant la fin du processus cicatriciel. La faible présence de macrophages pro-fibrotiques au sein du tissu permettrait ainsi de freiner le développement de la fibrose. Le rôle fibro-modulateur des macrophages est donc encore aujourd'hui sujet à de nombreuses interrogations et présente un fort potentiel de recherche.

1.3.2. Interactions entre macrophages et fibroblastes

Grâce aux récentes études mêlant modélisation mathématique et transcriptomique, plusieurs voies de communications et interactions impliquant fibroblastes et macrophages ont été mis en évidence dans les tissus fibrotiques^{1,64}. Une de ces études a notamment suggéré l'existence d'un réseau entre fibroblastes et macrophages dans la fibrose rénale, qui serait caractérisé par trois états s'équilibrant au cours du temps : un état de cicatrisation, et deux états de fibrose¹. L'état de cicatrisation serait caractérisé par une production régulée de MEC, tandis que les états de fibrose seraient associés à sa forte production ainsi qu'à la présence (fibrose dite « chaude ») ou l'absence (fibrose dite « froide ») de macrophages¹. La modélisation réalisée par les auteurs soutenait que la limite entre l'état de guérison et la formation d'une fibrose était fine, et qu'elle pouvait être franchie même dans ce modèle impliquant uniquement fibroblastes et macrophages. L'activation mutuelle des deux types cellulaires suffirait ainsi à l'installation d'une fibrose tissulaire, même si des preuves *in vitro* et *in vivo* doivent encore confirmer cette hypothèse.

A la fin des années 2000, l'interaction entre fibroblastes et macrophages dans les maladies fibrotiques a été suggérée par la proximité physique des deux types cellulaires au sein des tissus⁶⁵. Des études *in vivo* et *in vitro* ont en parallèle permis de mettre en avant les principaux médiateurs de la communication entre macrophages et fibroblastes au sein des tissus fibrotiques. Certains, et notamment le TGF- β , le PDGF, le CSF-1, le SDF-1, le MCP-1 et l'IL-6, possèdent un rôle central dans la communication entre les deux types cellulaires. Nous allons expliciter de façon synthétique le rôle de ces molécules dans les sous-sections suivantes.

1.3.2.1. Le TGF- β : master régulateur de la fibrose tissulaire

Le processus de cicatrisation physiologique est finement régulé par de nombreux facteurs de croissance et cytokines permettant son initiation ou sa régulation. Parmi ces facteurs, le TGF- β initie la réparation tissulaire via son effet inducteur sur la synthèse des composants de la MEC. Sa surproduction peut néanmoins entraîner un dépôt excessif de tissu cicatriciel et mener au développement d'une fibrose, comme c'est le cas dans de nombreuses pathologies⁶⁶, et également dans les chéloïdes⁶⁷.

Le TGF- β est un polypeptide appartenant à une superfamille de plus de 30 protéines dont font partie les 3 isoformes du TGF- β , nommées TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3. Les 3 isoformes ont des rôles distincts dans la cicatrisation : les TGF- β 1 et 2 promeuvent la fibrose et la formation de cicatrices, alors que le TGF- β 3 pourrait être capable d'induire, comme de réduire, la taille des cicatrices⁶⁸. Le TGF- β , et en particulier le TGF- β 1, est un médiateur clé de la fibrose tissulaire dans de nombreux organes, et permet de stimuler la synthèse et la sécrétion du collagène⁶⁸.

Le TGF- β est synthétisé par de nombreux types cellulaires, et est sécrété sous sa forme latente et inactive, nommée L-TGF- β (*Latent-TGF- β* – TGF- β latent)⁶⁷. Le L-TGF- β est alors incapable de se fixer à ses récepteurs, de par sa liaison au peptide associé à la latence (*Latency-Associated Peptide* ou LAP) qui crée un encombrement stérique important. Un clivage protéolytique entre les acides aminés 278 et 279 du L-TGF- β est alors nécessaire pour libérer le TGF- β sous sa forme active⁶⁹ et rendre possible sa liaison aux récepteurs.

Les TGF- β RI et TGF- β RII (*TGF- β Receptors*) sont les plus actifs, et sont directement impliqués dans la transduction du signal médié par le TGF- β . Le TGF- β RIII, aussi appelé bêtaglycane, et l'endogline, qui sont les deux autres récepteurs, permettent de présenter des ligands aux récepteurs I et II, et aident ainsi à la transduction du signal. Durant ce phénomène, le TGF- β se lie au TGF- β RII, qui s'active et phosphoryle le TGF- β RI auquel il est lié. Le TGF- β RI active alors une voie de communication intracellulaire en phosphorylant les protéines Smad dans diverses combinaisons, qui à leur tour stimulent la transcription génique (*Figure 4*). Cette voie de signalisation du TGF- β passant par les Smad peut être inhibée par les protéines Smad 6 et 7, ainsi que par l'ubiquitination de Smad3⁶⁷. Il existe une voie du TGF- β parallèle à celle passant par les protéines Smad, appelée Smad-indépendante ou non-Smad (*Figure 4*). Cette voie fait intervenir de nombreuses protéines intracellulaires appartenant à des voies de signalisation bien décrites, comme ERK/MAPK, NF- κ B, p38, JNK ou encore PI3K/AKT/mTOR⁷⁰.

Cytokine pro-fibrotique par excellence⁷¹, le TGF- β permet d'induire *in vitro* la transition des fibroblastes en myofibroblastes, exprimant l' α -SMA (*α -Smooth Muscle Actin* – Actine α du muscle lisse), le collagène de type I et la fibronectine^{66,70}. Cette cytokine est largement sécrétée par les macrophages de type M2⁷²⁻⁷⁴, et a été montrée comme indispensable dans la mise en place de la fibrose. Dès les années 1980, Khalil et son équipe ont en effet montré

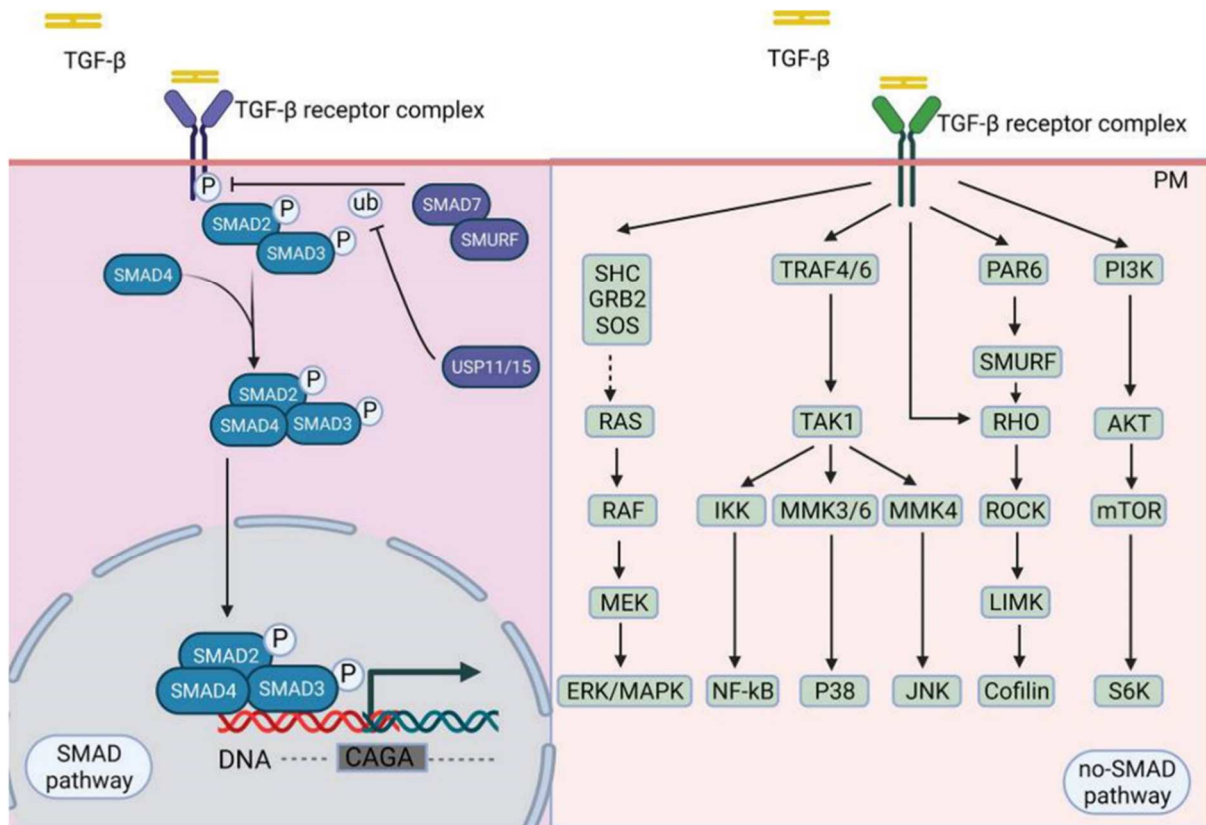


Figure 4 : Représentation schématique de la signalisation du TGF- β Smad et non-Smad

D'après Peng et al, Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy, Molecular Cancer, 2022

que le pic de TGF- β détecté dans le poumon des souris après injection de bléomycine était majoritairement localisé dans les macrophages, et précédait le dépôt de collagène tissulaire⁷⁵. Une vingtaine d'année plus tard, McCormick et son équipe ont montré que l'inhibition du TGF- β par injection systémique d'anticorps bloquant permettait de réduire significativement la fibrose cutanée et pulmonaire dans un modèle de GvHD (*Graft VS Host Disease* – Maladie du greffon contre l'hôte)⁷⁶. Plus récemment, le développement des souris *knockout* a permis de montrer que des souris déficientes en protéines Smad ou en récepteurs au TGF- β étaient protégées contre le développement de la fibrose rénale⁷⁷⁻⁸⁰, pulmonaire⁸¹ et cardiaque⁸². Le TGF- β sécrété par les macrophages participerait également au maintien, au recrutement et à l'activation de ces derniers, formant une boucle d'amplification de la fibrose au sein des tissus^{83,84}.

1.3.2.2. Le PDGF, activateur des fibroblastes

Les macrophages, au-delà de leur synthèse de TGF- β , produisent également un autre facteur pro-fibrosant permettant l'activation des fibroblastes : le PDGF (*Platelet-Derived*

Growth Factor – Facteur de croissance dérivé des plaquettes)⁷²⁻⁷⁴. Ce facteur de croissance est décrit pour induire la prolifération des fibroblastes, leur activité métabolique globale ainsi que leur synthèse matricielle⁸⁵⁻⁸⁷. Le PDGF a été montré comme surexprimé dans la fibrose pulmonaire chez l'Homme⁷⁴ et chez la souris⁸⁸, de façon générale mais également de façon plus spécifique, dans les macrophages⁷³. De plus, il a été montré qu'une mutation du PDGFR (*PDGF Receptor* – Récepteur au PDGF) induirait une fibrose au niveau du tissu adipeux chez la souris, suggérant son rôle important dans le développement de la fibrose⁸⁹. La synthèse de PDGF peut également être assurée par les myofibroblastes dans une boucle autocrine, qui leur permet de survivre et de se développer même en l'absence d'autres facteurs de croissance^{90,91}.

1.3.2.3. Rôle de CXCL12/SDF-1

CXCL12, également appelé SDF-1 (*Stromal cell-Derived Factor 1* – Facteur 1 dérivé des cellules stromales) est un facteur produit par les macrophages et dont le récepteur, nommé CXCR4, est principalement exprimé par les fibroblastes et les cellules endothéliales⁹². Le couple CXCL12/CXCR4 a été largement rapporté comme impliqué dans la fibrose tissulaire⁹³⁻⁹⁶. Il a notamment été montré que CXCR4 était indispensable dans la régulation de la cicatrisation, puisque sa déplétion entraînait le développement d'HTS (*HyperTrophic Scars* – Cicatrices hypertrophiques) dans un modèle murin de cicatrisation cutanée⁹⁷. Ce phénomène était inversé par la ré-implantation de fibroblastes CXCR4⁺ actifs au sein de la plaie⁹⁸. A l'inverse, plusieurs études avaient suggéré l'effet pro-fibrotique des protéines CXCL12⁹⁹ et CXCR4¹⁰⁰, leur déplétion étant capable de protéger contre la fibrose.

Bien que ces études suggèrent le rôle important de l'axe CXCL12/CXCR4 dans la fibrose tissulaire, les mécanismes moléculaires mis en jeu dans son activité n'ont pour l'instant pas été décrits.

1.3.2.4. Rôle du M-CSF/CSF-1

Au sein du réseau fibroblastes/macrophages décrit dans la fibrose, les myofibroblastes sont une source primordiale de M-CSF/CSF-1 (*Macrophage-Colony Stimulating Factor* – Facteur de stimulation des colonies de macrophages ou *Colony Stimulating Factor-1* – Facteur de stimulation des colonies 1), un facteur indispensable à la survie des macrophages^{72,101-103}. Le rôle du M-CSF dans le devenir des macrophages a été mis en évidence dans un modèle

murin en 1990, qui montrait que sa déplétion entraînait une perte de la population macrophagique au sein des souris¹⁰⁴. Le rôle des fibroblastes dans la synthèse de M-CSF avait par la suite été confirmé par le biais de souris présentant des fibroblastes *knockout* pour le M-CSF, qui s'avèrent elles-aussi être dépourvues de macrophages au sein de la rate¹⁰⁵. Dans le cadre de la fibrose, il a été montré que l'inhibition du récepteur au M-CSF protège les souris contre le développement de la fibrose pulmonaire¹⁰⁶ et rénale¹⁰⁷, probablement en réduisant l'infiltration des macrophages de type M2 Ly6C⁺¹⁰⁷.

1.3.2.5. Rôle de MCP-1/CCL2

MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1* – Protéine chimioattractante des monocytes 1), aussi appelé CCL2, est une cytokine ayant un pouvoir chimioattractant sur certains types de cellules immunitaires¹⁰⁸. Son récepteur principal, nommé CCR2, est fortement exprimé sur les macrophages. En médiant la chimioattraction des macrophages, la protéine MCP-1 semble avoir un rôle majeur sur le développement de la fibrose tissulaire. Des souris *knockout* pour CCR2 présentaient en effet des perturbations dans l'ensemble des étapes de cicatrisation. Ce phénomène était associé à un infiltrat de macrophages Ly6C^{high} moins important, et à une diminution des quantités d'IL-1 β et de TNF- α ¹⁰⁹. La greffe de monocytes dans ces souris *knockout* permettait néanmoins de ré-instaurer une cicatrisation normale, suggérant la présence indispensable des macrophages pour la bonne évolution de la cicatrisation. Une autre étude a également montré que chez des souris déficientes en MCP-1, l'injection de bléomycine entraîne le développement d'une fibrose moins profonde que dans les souris témoins¹¹⁰.

1.3.2.6. Rôle de l'IL-6

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire pouvant être sécrétée par plusieurs types cellulaires, en particulier les macrophages de type M1. Des taux élevés d'IL-6 sont retrouvés dans de nombreuses maladies inflammatoires à caractère fibrotique, et son mode d'action a été suggérée comme passant par l'activation de la voie JAK/Stat¹¹¹.

Le rôle de l'IL-6 dans la communication entre fibroblastes et macrophages dans la fibrose a été largement relevé chez l'Homme comme chez la souris. La synthèse d'IL-6 par les macrophages, de façon autocrine, serait capable d'induire leur activité pro-fibrotique, dans un modèle murin de fibrose induite à la bléomycine¹¹². De plus, dans des fibroblastes de

patients atteints de SSc (*Systemic Sclerosis* - Sclérose systémique), le traitement par Tocilizumab, un anticorps bloquant anti-IL-6R α , entraînait la diminution d'expression de marqueurs pro-fibrotiques comme le collagène de type I, l' α -SMA et le CTGF (*Connective Tissue Growth Factor* – Facteur de croissance du tissu conjonctif)¹¹³.

1.3.2.7. Echappement des fibroblastes à la phagocytose

Enfin, il a récemment été suggéré que dans les maladies fibrotiques, les fibroblastes pourraient échapper à la phagocytose par les macrophages via leur expression d'un « *don't eat me* » signal nommé CD47^{7,114}. En échappant à ce processus, les fibroblastes persistent de façon plus pérenne au sein de la plaie, où ils exercent leur activité pro-fibrotique¹¹⁵. Il a en effet été montré que le blocage de la protéine CD47 entraînait la réversion de la fibrose dans un modèle de sclérodermie, confirmant son rôle dans le maintien de la fibrose cutanée¹¹⁵.

1.4. Un sous type de macrophages associé à la fibrose, les SAMacs

La distinction entre l'effet des M1 et M2 dans la fibrose étant parfois sujette à controverses, plusieurs études ont cherché à distinguer des marqueurs de macrophages permettant d'identifier une population spécifique aux tissus fibrotiques.

En ce sens, une revue publiée par Bhattacharya et Ramachandran dans *Nature Immunology* a très récemment décrit un sous-type de macrophages associées à la fibrose, nommé « SAMacs » (*Scar-Associated Macrophages* – Macrophages associés aux cicatrices), qui seraient présent dans de nombreux organes fibrosés (*Figure 5*). Contrairement aux macrophages résidents, les SAMacs, qui sont issus de la différenciation des monocytes circulants, présentent un profil transcriptomique semblable entre les différents tissus. Les marqueurs TREM2, CD9, SPP1, GPNMB et FABP5, ont ainsi été identifiés comme les 5 marqueurs clés de cette population macrophagique chez l'Homme²¹.

- ❖ TREM2 (*Triggering receptor expressed on myeloid cells 2* - Récepteur de déclenchement exprimé sur les cellules myéloïdes-2), une protéine impliquée dans la différenciation ostéoblastique, est un récepteur de DAMPs¹¹⁶.
- ❖ CD9, un marqueur de la lignée hématopoïétique, est une protéine membranaire pouvant être associée à de nombreuses intégrines comme CD19, et permettrait de réguler la prolifération et la motilité des cellules¹¹⁷.

- ❖ SPP1 (*Secreted Phosphoprotein 1* – Phosphoprotéine sécrétée-1), le gène codant l'ostéopontine, est un marqueur de macrophage associé à leur infiltration, et principalement associé au phénotype M2¹¹⁸.
- ❖ GPNMB (*Glycoprotein Non-metastatic Melanoma protein B* - Glycoprotéine de la protéine B du mélanome non métastatique) est une protéine transmembranaire associée aux macrophages de type M2¹¹⁹, impliquée dans l'adhésion cellulaire, la migration et la prolifération¹²⁰.
- ❖ FABP5 (*Fatty-Acid Binding Protein 5* – Protéine de liaison aux acides gras 5) est un transporteur d'acides gras associé à la fibrose dans plusieurs organes^{121,122}, membre de la voie de signalisation PPAR.

Ces SAMacs ont été décrits comme activés par le GM-CSF (*Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor* – Facteur stimulant des colonies de granulocytes et de macrophages), le TGF- β 1 et l'IL-17A, et ce *in vitro* et *in vivo*¹²³. De nombreuses études ont montré que les SAMacs étaient localisés à proximité des fibroblastes producteurs de MEC^{88,123-125}, au sein de « niches fibrotiques »²¹. Les interactions entre SAMacs et fibroblastes seraient alors médiées par des facteurs produits par les macrophages, comme SPP1, l'IL-1 β , le PDGF ou AREG (*Amphiregulin* – Amphiréguline). En se fixant sur leurs récepteurs au niveau des fibroblastes, ces médiateurs joueraient ainsi sur la régulation des fonctions cellulaires des fibroblastes, et induiraient une sur-production pathologique de collagène^{21,126}. Les fibroblastes activés développeraient alors une boucle d'activation autocrine, via leur synthèse de PDGF. Leur production de MCP-1/CCL2 permettrait d'induire la chimioattraction des monocytes, médiant la persistance des SAMacs au sein du tissu²¹.

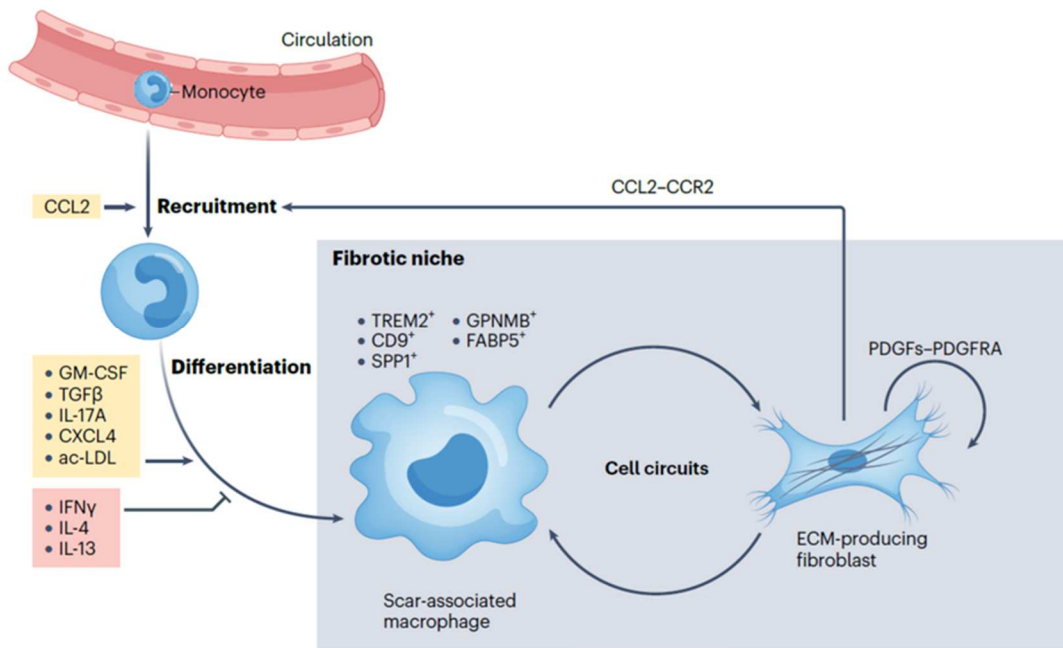


Figure 5 : Macrophages associés aux cicatrices et à la fibrose : les SAMacs

Les SAMacs (*Scar-Associated Macrophages*) sont généralement retrouvés au sein de niches fibrotiques, où ils permettent d'activer la synthèse de MEC par les fibroblastes. Ils sont caractérisés par l'expression des marqueurs TREM2, CD9, SPP1, GPNMB et FABP5. Les SAMacs sont dérivés des monocytes circulants, et sont activés en réponse à la présence de GM-CSF, TGF-β, IL-17A, CXCL4 et ac-LDL.

D'après Bhattacharya et Ramachandran, *Immunology of human fibrosis*, Nature Immunology, 2023

2. Les chéloïdes

2.1. Histoire des chéloïdes

Dès environ 3000 av. J.-C., les chéloïdes ont été décrites comme un « *gonflement sur la poitrine, gros, étalé et dur* » dans le papyrus Edwin Smith, le premier document décrivant la pratique médicale égyptienne ancienne¹²⁷. Les chéloïdes ne sont décrites pour la première fois dans la littérature moderne qu'en 1790, et sont alors considérées comme des tumeurs touchant le tissu adipeux sous-cutané, désignées par le nom de « darts graisseuses »¹²⁸. Par la suite, Jean-Louis Alibert, dermatologiste français, décrit des structures similaires qu'il appela d'abord « cancroïdes » puis « chéloïde », dérivant du grec *khēlē*, « pince d'animal, griffe, serre », et du suffixe *-oïde* « en forme de »¹²⁹. Durant le XIX^{ème} siècle, médecins et scientifiques s'interrogèrent sur l'étiologie de ces amas fibreux cutanés : étaient-ils tumoraux, cicatriciels, ou simplement la manifestation cutanée d'une infection ou d'une pathologie plus profonde ? Au fil du temps, l'hypothèse quant à l'origine cicatricielle des chéloïdes est devenue prédominante, suggérant que ces « cicatrices » apparaissent suite à une anomalie de cicatrisation. Deux écoles étaient néanmoins bien distinctes, soutenant l'existence de chéloïdes « vraies », apparaissant de façon spontanée au niveau de la peau, ou de chéloïdes « fausses », se développant suite à la formation d'une lésion. Il est aujourd'hui admis qu'il n'existe pas de chéloïdes spontanées, et qu'elles seraient toujours liées à la présence d'une plaie passée plus ou moins inaperçue¹³⁰.

2.2. Description générale

La maladie chéloïdienne est aujourd'hui décrite par la Fondation de Recherche contre les Chéloïdes (*Keloid Research Foundation*, New York, USA) comme une « maladie génétique cutanée qui résulte en la formation et la croissance excessive de zones pseudo-tumorales au niveau de la peau »¹³¹. Les chéloïdes sont formées d'une accumulation de matrice extracellulaire (MEC) au niveau dermique, engendrée par une dérégulation du processus cicatriciel. Contrairement aux cicatrices classiques et hypertrophiques, elles possèdent la particularité de se développer au-delà des berges de la plaie initiale, et ne présentent pas de régression spontanée¹³².



Figure 6 : Photographies de chéloïdes massives au niveau de la mâchoire, du torse et du dos

D'après Macarak et al, *Keloid disorder: Fibroblast differentiation and gene expression profile in fibrotic skin diseases*, Experimental Dermatology, 2020

Bien que bénignes, les chéloïdes peuvent profondément altérer la qualité de vie des patients et causer de grandes détresses mentales chez les personnes touchées¹³³. Le préjudice esthétique qu'elles engendrent peut être très important, en particulier si elles sont volumineuses et situées sur des zones facilement visibles telles que le visage (lobe d'oreille), le cou ou la poitrine (Figure 6). Dès les premières descriptions des chéloïdes, prurit et douleurs ont été rapportés comme les désagréments les plus importants, même si leur intensité et leur fréquence est très variable d'un patient à un autre¹³⁴.

2.3. Histopathologie

De nombreuses études histologiques ont révélé que les chéloïdes présentaient une structure très éloignée de la peau saine et d'une cicatrice dite « normale ». Le derme chéloïdien est en effet décrit comme épaissi^{135,136}, fibreux et peu vascularisé¹³⁷. Il est formé d'un réseau de MEC très dense, majoritairement formé de collagène de type I, XIV et XVI¹³⁸, et est caractérisé par un ratio élevé entre collagène de type I et collagène de type III (~17 :1 dans les chéloïdes, contre ~6 :1 dans la peau saine)¹³⁹. La présence d'épaisses fibres de collagène orientées de façon anarchique au sein de nodules a été rapporté comme une des caractéristiques histologiques principales des chéloïdes¹⁴⁰. Au-delà du collagène, le tissu chéloïdien est enrichi en élastine¹⁴¹, fibronectine^{142,143} et périostine¹⁴⁴. Certaines protéines de la matrice associées au cartilage ont également été montrées comme surreprésentées dans les chéloïdes, comme l'asporine, la dermatopontine ou la fibromoduline¹³⁸.

Au niveau cellulaire, plusieurs études ont montré que les fibroblastes^{145,146} et fibrocytes^{147,148} étaient présents en plus grand nombre dans les chéloïdes comparativement à la peau saine. La présence de myofibroblastes, caractérisés par l'expression d' α -SMA, est quant à elle de plus en plus discutée. En effet, même si de nombreuses études antérieures ont montré la présence de myofibroblastes α -SMA⁺ dans les chéloïdes^{147,148}, une étude américaine a récemment remis en cause leur implication dans la maladie¹⁴⁹. Au-delà de la présence importante de fibroblastes, les chéloïdes sont caractérisées par une forte infiltration de cellules immunitaires^{150,151}, en particulier de macrophages et de lymphocytes T^{151,152}.

Une étude approfondie réalisée en 2015 par Jumper *et al.*¹³² sur l'histopathologie des cicatrices chéloïdes a confirmé la plupart des résultats mentionnés ci-dessus, et souligne en outre les caractéristiques suivantes comme étant les plus fréquentes des chéloïdes : un épiderme épaissi et aplati ; un bord « avancé en forme de langue » dans le derme ; des faisceaux de collagène épais et présentant une orientation aléatoire ; une perte de la limite visuelle entre derme papillaire et réticulaire ; une expression variable d' α -SMA ; et une augmentation de la cellularité dermique, avec la forte présence de signaux d'inflammation¹³².

2.4. Hétérogénéité clinique des chéloïdes

Les chéloïdes, de part leur localisation, mais également leur forme et leur apparence générale, peuvent être très hétérogènes. Il existe plusieurs sites de prédilection au développement des chéloïdes, qui possèdent *in fine* une influence sur la forme des cicatrices. En effet, les chéloïdes se développant au niveau des lobes d'oreilles sont généralement sphériques et présentent des reliefs importants (*Figure 7A*). Au niveau de la poitrine, du dos et des épaules, le papillon, la pince de crabe ou l'haltère (*Figure 7B-7D*) ont été décrites comme des formes typiques, dont la formation est principalement déterminée par des facteurs mécaniques locaux¹⁵³⁻¹⁵⁵.

Au-delà des zones anatomique de développement des chéloïdes, Conway *et al* ont observé que certaines chéloïdes pouvaient être « nodulaires et surélevées » et d'autres « plates », souvent observées au niveau du sternum¹⁵⁶. Une autre étude a classifié les chéloïdes en fonction de leurs formes régulières ou irrégulières¹⁵³.

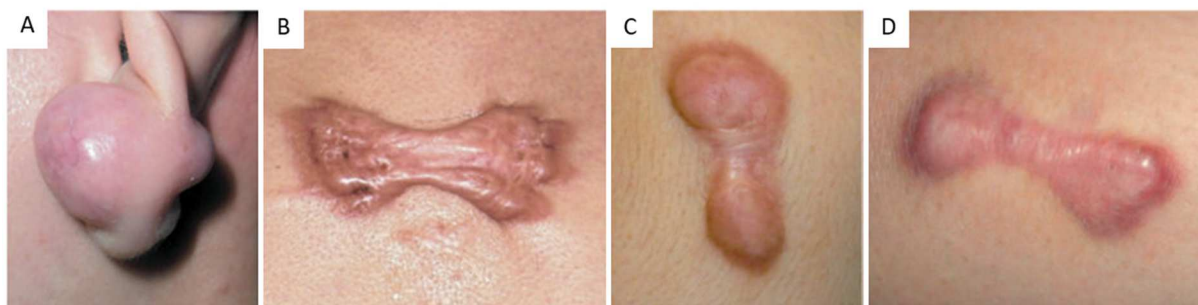


Figure 7 : Différentes formes de chéloïdes retrouvées selon le site de développement de la cicatricatrice

L'étirement exercé au quotidien sur la peau d'un individu entraîne des tensions localisées favorisant certaines formes de cicatrices. Les principales sont la forme sphérique (A), la pince de crabe/le papillon (B) et l'haltère (C, D).

D'après Huang et al, *Keloidal pathophysiology: Current notions*, Scars, Burn and healing, 2021

L'hétérogénéité des chéloïdes est également décrite au niveau intra lésionnel. La distinction la plus souvent évoquée est celle d'une marge périphérique rouge et surélevée qui envahit la peau environnante, tandis que le centre des chéloïdes est de couleur plus claire, et montre une régression clinique^{157,158}. C'est dans la périphérie des chéloïdes que les symptômes de fortes démangeaisons sont les plus importants^{153,158}, mais également qu'ont été décrits une hyper-cellularité^{159,160}, une infiltration accrue de cellules immunitaires^{161,162}, une apoptose réduite¹⁵⁸ et une prolifération augmentée¹⁶³. Au contraire, les fibroblastes dérivés de la région centrale montrent des signes d'inactivité *in vitro*, notamment avec une prolifération réduite¹⁶⁴, une augmentation de l'apoptose¹⁵⁷, et une expression accrue de gènes conduisant à la dégradation de la MEC¹⁵⁷. Dans l'ensemble, la majorité des études soutiennent l'idée d'une périphérie active et en développement, et d'une région centrale en dormance.

2.5. Les chéloïdes : une maladie multifactorielle

Malgré le nombre croissant d'études visant à améliorer la compréhension des chéloïdes, les mécanismes précis conduisant à leur pathogénèse sont encore mal connus. L'apparition et le développement des chéloïdes seraient modulés par de nombreux facteurs, qu'ils soient environnementaux (blessure, inflammation), relatifs au patient (origine ethnique, âge, génétique) ou à la topographie de la zone touchée (tension, élasticité)^{165,166}. Comme décrit en *Figure 8*, l'ensemble de ces facteurs entrainerait une réponse cellulaire anormale généralisée, conduisant finalement au développement d'une chéloïde.

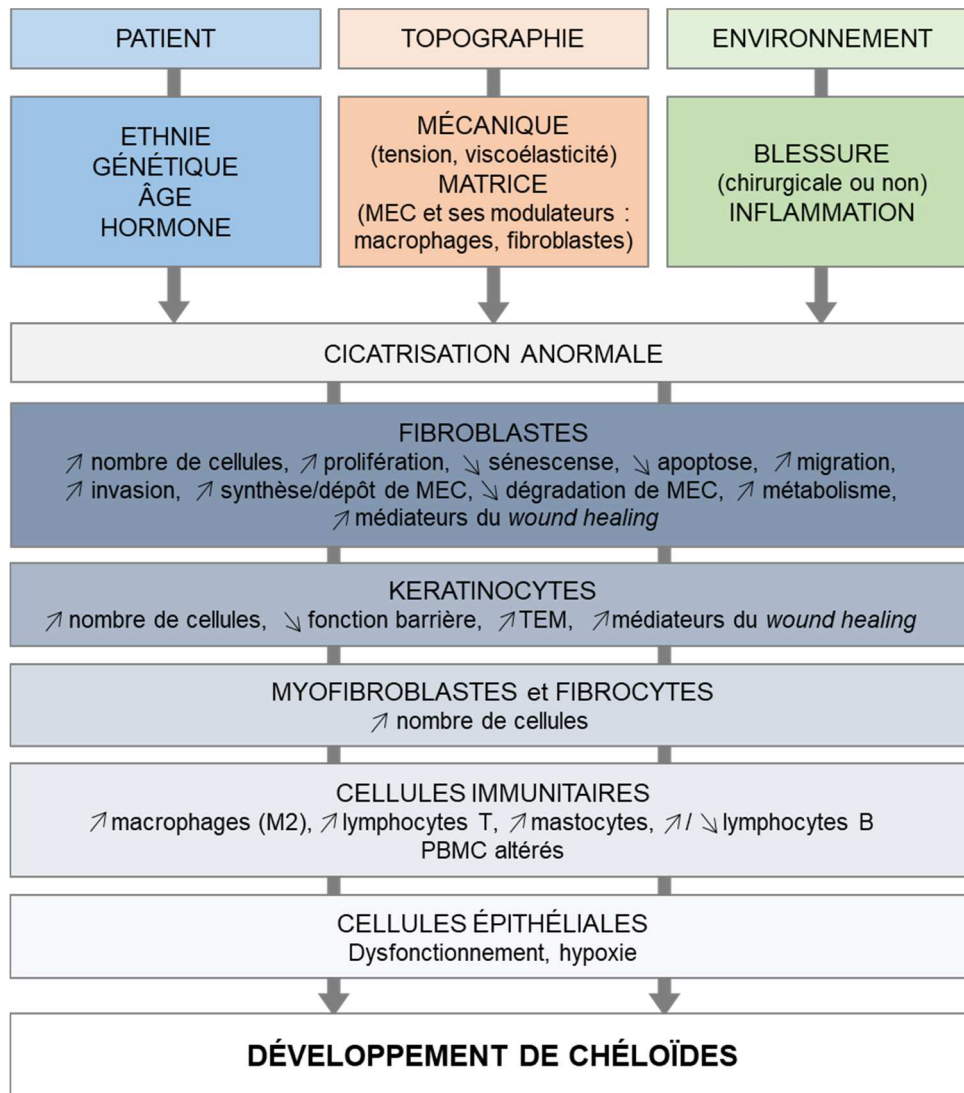


Figure 8 : Le développement multifactoriel des chéloïdes

Le développement des chéloïdes est modulé par différents facteurs relatifs au patient, à son environnement, et à la topographie de la zone touchée. L'ensemble de ces facteurs perturbent le phénomène de cicatrisation physiologique, en modulant le phénotype et l'activité des fibroblastes, kératinocytes, cellules immunitaires et épithéliales. Finalement, la combinaison de ces différents acteurs conduit au développement des chéloïdes.

Modifié de Limandjaja et al, *The Keloid Disorder: Heterogeneity, Histopathology, Mechanisms and Models*, Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020

2.5.1. Influence de l'ethnie - épidémiologie

L'incidence des chéloïdes varie très fortement d'un pays à l'autre et est connue pour être largement influencée par l'origine ethnique et le phototype du patient. Les études épidémiologiques révèlent que la prévalence est particulièrement élevée dans les populations à phototypes élevés (IV à VI – peau noire), touchant entre 2,4 et 16% de la population¹⁶⁷⁻¹⁷⁰. Bien que les chéloïdes soient moins répandues dans les populations asiatiques (1,1%), leur prévalence reste tout de même plus importante que dans les populations caucasiennes

(0,4%)^{167,171}. De façon intéressante, chez les Africains atteints d'albinisme, la prévalence de 7,5% n'est pas statistiquement plus faible que la prévalence de 8,5% observée dans la population africaine présentant une peau normalement pigmentée¹⁷². Le rôle du phototype seul dans la genèse des chéloïdes a ainsi pu être écarté par cette étude, qui suggère l'absence d'implication des mélanocytes dans la génèse des chéloïdes¹⁷².

2.5.2. Prédispositions et anomalies génétiques

Au regard des données épidémiologiques, il semble que les facteurs génétiques jouent un rôle clé dans la formation des chéloïdes. En effet, entre 2017 et 2019, deux études réalisées sur des populations japonaises et camerounaises ont montré que les personnes ayant des antécédents familiaux de chéloïde étaient plus à même d'en développer que celles dépourvues d'antécédents^{172,173}.

Dès les années 1950, Bloom et ses collaborateurs ont suggéré une hérédité autosomique dominante des chéloïdes, tandis que Omo-dare et son équipe décrivaient une hérédité récessive^{174,175}. Goemmine a quant à lui suggéré une hérédité sexuelle, liée au chromosome X, à la fin des années 60¹⁷⁶. L'hérédité autosomique dominante avec une pénétration incomplète et une expression variable a finalement été admise en 2001 dans une étude américaine. Ces deux dernières caractéristiques permettent ainsi d'expliquer pourquoi les porteurs des mutations ne développent pas toujours de chéloïdes, et pourquoi un traumatisme n'entraîne pas systématiquement un développement de chéloïde chez les patients déjà touchés¹⁷⁷. Malgré ces nombreuses études sur l'hérédité familiale de la pathologie, des travaux restent à réaliser afin d'affiner la cartographie génétique des chéloïdes, et de pouvoir réellement affirmer qu'une ou des mutation(s) sont la cause de leur développement.

Malgré tout, de nombreux gènes et *loci* associés à la pathogénèse des chéloïdes ont été identifiés durant les dernières années^{6,178-182}. Plusieurs études d'association pangénomiques (ou GWAS « *genome-wide association study* ») japonaises et chinoises ont décrites certains SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* - Polymorphismes nucléotidiques simples) potentiellement associés au développement des chéloïdes^{183,184}.

Deux loci impliqués dans la signalisation du TGF- β ont notamment été décrits comme associés à la maladie dans le *Chinese Journal of Plastic Surgery*, nommés D18S460 et D18S467

(18q21, *SMAD*). Ces loci sont liés au gène *smad*, codant les protéines du même nom, qui sont des médiateurs de la voie du TGF- β impliqués dans le développement et la persistance des chéloïdes^{67,185}. En revanche, aucun polymorphisme du TGF- β en lui-même n'a été décrit, malgré les nombreuses recherches mises en œuvre^{179,186,187}.

Une étude sur deux familles japonaises et africaines réalisée au début des années 2000 a permis de mettre en avant 2 *loci* susceptibles d'être impliqués dans la genèse des chéloïdes, sur les chromosomes 2q23 et 7p11¹⁸⁸. Le locus D2D1399 (2q23) contient des gènes impliqués dans la régulation de la réponse cicatricielle, comme celui codant pour TNFAIP6 (*TNF α Inhibitory Protein-6* - Protéine inhibitrice 6 du TNF- α). Cette protéine a elle-même été décrite comme étant surexprimée dans le tissu chéloïdien¹⁸⁹. Le locus D7S499 du chromosome 7p11 est quant à lui associé au gène codant le récepteur à l'EGF (*Endothelial Growth Factor – Facteur de croissance endothélial*)¹⁸⁸. Les fibroblastes de chéloïde surexpriment le récepteur à l'EGF comparativement aux FDS, suggérant la possible implication de cette protéine dans la genèse des chéloïdes¹⁹⁰.

Le gène codant l'IL-6 comporte un SNP surexprimé chez les patients porteurs de chéloïdes, nommé rs1800796 (7p21, *IL6*, mutation 572G/C). Ce variant est également associé à la gravité de la maladie, puisque d'avantage retrouvé chez les patients présentant 3 chéloïdes ou plus que chez ceux en présentant entre 1 et 3^{191–193}.

Le récepteur à la leptine, préalablement décrit comme étant impliqué dans la cicatrisation cutanée^{194,195}, a été étudié dans une récente étude chinoise, publiée en 2021. Ces travaux ont révélé la présence de 3 SNP associés au développement des chéloïdes dans la séquence codant le récepteur à la leptine, nommés rs1137101, rs1938496 et rs7555955 (1p31.3, *LEPR*)¹⁹⁶.

Enfin, la dernière étude génétique en date publiée dans le *British Journal of Dermatology* en janvier 2023 a démontré l'implication du locus rs1348270 dans la genèse des chéloïdes. Ce locus induit la diminution d'expression de l'ARN non codant DEIK (*Down Expressed In Keloid – Sous exprimé dans les chéloïdes*), ce qui aboutit à la synthèse excessive de protéines matricielles comme le collagène et la périostine¹⁹⁷.

De nombreux autres gènes ont été décrits comme mutés chez les patients présentant des chéloïdes, notamment des gènes comme *NEDD4*, *MYO1E*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DQ-BRD1* ou *ADAM33*, qui sont principalement impliqués dans le processus d'inflammation, dans la synthèse et le remodelage de la matrice^{181,198-201}. Les gènes *FOXL2*, *SIRT3*, *MYH8* et *HUS1B*, dont les protéines associés modulent la biosynthèse du collagène, la contraction des cicatrices et le cycle cellulaire²⁰²⁻²⁰⁴, ont également été décrits comme mutés chez des patients atteints par les chéloïdes²⁰⁵⁻²⁰⁷.

Ainsi, les hypothèses génétiques expliquant le développement des chéloïdes sont nombreuses. Elles impacteraient principalement le dépôt de protéines matricielles, la contraction des plaies, mais également le caractère inflammatoire de la cicatrice. Cependant, aucune de ces mutations n'a pour l'instant été démontrée comme étant capable d'induire le développement des chéloïdes à elle seule.

2.5.3. Rôle de l'épigénétique

L'épigénétique regroupe un ensemble de mécanismes qui entraînent la modification de l'expression génique, sans pour autant modifier la séquence de l'ADN¹⁸⁰.

Plusieurs études ont mis en évidence des différences dans la cartographie de méthylation de l'ADN entre les chéloïdes et la peau saine. Jones et ses collaborateurs ont mené plusieurs analyses génomiques du profil de méthylation dans les chéloïdes^{208,209}, et ont en effet montré la présence de 190 sites CpG différenciellement méthylés dans les chéloïdes comparément à la peau saine. Ces sites étaient associés à 152 gènes différents, dont l'expression serait potentiellement modulée dans les chéloïdes. Les DNMT (*DNA Methyl Transferase* - Méthyltransférases de l'ADN) sont les enzymes responsables de l'ajout des groupements méthyles au niveau de l'ADN. Une étude conduite en 2014 a montré que l'enzyme DNMT1 était exprimé dans 100% des FC étudiés, contre seulement 8% dans les FDS (Fibroblastes Dermiques Sains)²¹⁰. L'inhibition de ces DNMT, et donc de la méthylation de l'ADN, par le 5-aza-dC (*5-aza-2-deoxycytidine*), a montré des capacités à moduler l'expression du TGF- β 1 dans les chéloïdes. En effet, l'expression du TGF- β 1, de phospho-Smad2 et de phospho-Smad3, qui sont normalement surexprimés dans les FC, était diminuée en présence de 5-aza-dC. Ce composé possédait également des capacités anti-prolifératives sur les FC^{210,211}.

La modification des histones désigne l'ajout de groupements carbonés de façon covalente au niveau des histones, les protéines permettant la compaction de l'ADN²¹². Ces modifications, notamment l'acétylation, sont régulés par des acétyltransférases (HATs – *Histone AcetylTransferases*) et par des désactétylases (HDACs – *Histone DesAcetylases*) spécifiques des histones. En comparant les profils d'expression des HDACs dans les chéloïdes comparément à la peau saine, O'Connor *et al.* ont montré une surexpression globale de HDAC2 dans les chéloïdes, suggérant le rôle de l'acétylation des histones dans la pathologie²¹³. Des études *in vitro* ont en effet montré que l'inhibition des HDACs entraînait une diminution de la synthèse de collagène dans les fibroblastes de chéloïde, ainsi que de l'expression de marqueurs de FC comme SFRP1, IGFBP5 ou CTGF^{214,215}.

Les ARN non codants, comme les miRNAs (*micros RNAs* – Micro ARNs) et les lncRNAs (*Long Non-Coding RNAs* - Longs ARNs non codants), sont des importants régulateurs de l'expression génique post-transcriptionnelle. De la même façon que pour la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones, plusieurs études ont décrit des expressions différentielles des ARN non codants dans les chéloïdes comparément à la peau saine. Selon les études, entre 17 et 23 miRNAs, et plus de 2000 lncRNAs sont décrits comme exprimés de façon différentielle dans les chéloïdes et la peau saine²¹⁶⁻²¹⁹. Certains de ces miRNAs ont été associés à la surexpression du collagène de type I²²⁰ et de type III²²¹, ainsi qu'à la modulation de la prolifération cellulaire²²², mais leur rôle précis dans les chéloïdes reste à définir.

2.5.4. Environnement mécanique et topologie

Malgré les évidents facteurs génétiques mis en cause dans la genèse des chéloïdes, ceux-ci ne suffisent pas à expliquer en totalité le développement de la maladie. Parmi les autres facteurs mis en jeu, les forces mécaniques environnant la cicatrice ont été décrites comme jouant un rôle primordial.

En 1861, l'anatomiste Karl Langer a décrit pour la première fois l'existence de lignes de tensions au niveau cutané, appelées lignes de Langer²²³. Ces lignes parallèles à l'orientation des fibres de collagène dermiques sont généralement utilisées par les chirurgiens afin de faciliter la cicatrisation. Une incision réalisée parallèlement aux lignes de Langers permet en effet d'améliorer cette dernière. Ces lignes ont également été utilisées comme bases pour de nombreuses études décrivant les tensions mécaniques appliquées à la peau²²⁴. Dans le cadre

de leur étude sur les chéloïdes, Ogawa et ses collaborateurs ont utilisé un système dérivé des lignes de Langer afin d'associer le développement des chéloïdes aux tensions appliquées à la peau²²⁵. Les auteurs ont alors suggéré que les chéloïdes apparaissent plus fréquemment dans des zones du corps où les tensions exercées lors des mouvements réalisés au quotidien sont particulièrement importantes. En effet, 48,9% des 1500 chéloïdes étudiées étaient localisées sur la poitrine, 26,9% dans la région scapulaire, et 12,1% sur la mâchoire et la partie antérieure du cou. Ces zones ont été décrites comme très sujettes aux étirements, la peau y étant étirée entre 5 et 18%. L'arrière des jambes, qui présente un étirement de moins de 3%, était quant à lui le lieu de seulement 0,5% des chéloïdes étudiées²²⁵. Les auteurs avaient également émis l'hypothèse que ces différences pourraient être dues au microbiote présent sur le site de la cicatrice, à l'exposition à des irritants cosmétiques ou à des ultra-violets²²⁶.

Malgré le lien franc entre zone mécaniquement active et développement de chéloïdes, certaines zones échappent à la règle. C'est notamment le cas de la région supra pubique, présentant 29% d'étirements cutanés pour seulement 1,9% des chéloïdes étudiées. Le lobe de l'oreille, soumis à peu de forces mécaniques, est quant à lui très propice au développement de chéloïdes²²⁷. Contrairement aux autres parties du corps généralement touchées, les chéloïdes se développant sur le lobe de l'oreille ne font pas suite à des traumatismes idiopathique ou à de l'acné, mais sont presque systématiquement dues à la réalisation de piercings. De façon significative, plusieurs patients présentant des chéloïdes du lobe de l'oreille ont évoqué des douleurs et écoulements lors du remplacement des piercings ; signes de l'inflammation présente sur le site²²⁵.

Une étude *in vivo* réalisée en 2011 sur des porcs Duroc a montré qu'un dispositif inversant la tension physiologiquement appliquée sur une plaie cutanée réduisait la taille de la cicatrice, sa vascularisation et son expression d' α -SMA²²⁸. Chez l'Homme, l'importance des tensions mécaniques dans le développement des chéloïdes a été montré dans une étude qui suggérait que chez un même patient, deux plaies similaires localisées à des endroits du corps différents pourraient avoir des évolutions distinctes *in fine*, avec ou sans développement de chéloïde²²⁹.

2.5.5. Autres facteurs

Comme évoqué précédemment, l'ethnie, les prédispositions génétiques, mais également l'âge, le genre et d'autres caractéristiques propres au patient et à son environnement peuvent influencer le risque de développer des chéloïdes¹⁶⁶. Bien que certaines études aient relevé une prévalence des chéloïdes plus importante chez les femmes que chez les hommes^{230,231}, elles n'écartent pas le fait que les femmes seraient généralement plus sensibles à la présence de cicatrices inesthétiques, et seraient donc d'avantage demandeuses d'une prise en charge médicale²³². Concernant l'âge des patients, les chéloïdes peuvent se développer à tout âge, mais la prévalence est plus élevée chez les adolescents et jeunes adultes, entre 12 et 30 ans^{231,233}. Le développement des chéloïdes pourrait également être modulé par l'état hormonal des patients. En effet, des taux de récepteurs aux androgènes très élevés ont été relevés dans des chéloïdes « actives » dans une étude allemande²³⁴. Le développement des chéloïdes a également été montré comme exacerbé durant la grossesse²³⁵ et la puberté¹⁶⁶. Enfin, comme décrit de façon plus tardive dans ce manuscrit, plusieurs voies immunitaires ont été décrites comme induites dans les chéloïdes. Ces mêmes voies sont également induites dans la peau saine des patients atteints de chéloïdes, suggérant que ces patients présenteraient un terrain inflammatoire généralisé qui serait propice au développement de ces cicatrices²³⁶.

2.6. Pathogénèse d'une maladie fibrotique à composante inflammatoire

2.6.1. Principaux médiateurs de la fibrose : les fibroblastes de chéloïde

2.6.1.1. Fibroblastes de chéloïdes VS fibroblastes sains

Les fibroblastes de chéloïdes (FC), en tant que principales cellules sécrétrices de MEC dans les chéloïdes, sont considérés comme les principaux effecteurs de la pathologie. Leur phénotype diffère de celui des fibroblastes dermiques sains (FDS) sur de nombreux critères, qui ensemble induisent une activité fibrotique des fibroblastes de chéloïde *in vivo*²³⁷.

De façon basale, les fibroblastes de chéloïde présentent un profil d'avantage fibrogénique que leurs homologues sains. En effet, ils prolifèrent de façon plus importante, ce qui entraîne leur accumulation dans le tissu²³⁸. Ils expriment également d'avantage

d' α SMA²³⁹, marqueur de la différenciation myofibroblastique, de collagène^{240,241} et de fibronectine²⁴². La protéine p53, un suppresseur de tumeurs connu pour ses propriétés anti-prolifératives et anti-apoptotiques, a été montré comme induite dans les FC²³⁹. De par leur expression accrue des TGF- β RI et TGF- β RII^{67,114–117}, ainsi que du récepteur au PDGF²⁴⁶, les FC sont particulièrement sensibles à leur microenvironnement. De plus, ils synthétisent d'avantage de TGF- β 1 et TGF- β 2 que les FDS. Les FC participent ainsi eux-mêmes à leur activation constante. Cette synthèse de TGF- β par les FC a été associée à l'activation de la voie classique du TGF- β , notamment via l'induction de la phosphorylation de Smad3 dans ces cellules^{68,240,243–245}. En parallèle, les protéines Smad6 et Smad7, qui sont des inhibiteurs de la voie du TGF- β , ont été montrées comme sous exprimées dans les FC comparativement aux FDS. Il a ainsi été suggéré que l'induction de la signalisation du TGF- β dans les FC pourrait être liée à un manque d'inhibition de cette voie de signalisation²⁴⁷. Les FC se sont également révélés présenter des taux importants de régulateurs positifs de la voie du TGF- β , notamment atf3²⁴⁸ ou NLRC5²⁴⁹.

Bien que l' α -SMA, les protéines de la matrice et celles régulant la signalisation du TGF- β aient été au centre des recherches sur les fibroblastes de chéloïdes durant de nombreuses années, de récentes études ont suggéré l'existence de nouveaux marqueurs étant différenciellement exprimés dans les fibroblastes de chéloïde.

La protéine CD26/DPP4 (*DiPeptidyl Peptidase 4* – Dipeptidyl peptidase 4), une exopeptidase membranaire, a été décrite durant les dernières années comme un nouveau marqueur d'activation fibroblastique^{250,251}. Les fibroblastes chéloïdiens CD26⁺ possèderaient un phénotype fibrogénique, associé à la surexpression du TGF- β 1, des collagènes de type I et III, et de la fibronectine^{252,253}. La protéine CD26 pourrait également moduler la mise en place de l'inflammation via son activité peptidase. Elle serait en effet capable de cliver la chémokine CXCL12/SDF-1, diminuant ainsi son activité chimioattractante envers les cellules immunitaires. Au sein des chéloïdes, un article publié en 2021 suggérait que la faible expression de CD26 sur les FC cultivés dans un environnement pro-fibrotique induirait une accumulation de CXCL12 sous sa forme active. Les FC seraient ainsi des médiateurs permettant de façon indirecte d'induire la chimioattraction des cellules immunitaires, notamment des macrophages^{254–256}.

L'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 a été montrée comme induite dans les fibroblastes de chéloïde comparativement aux fibroblastes sains^{257,258}. Le blocage de sa synthèse *in vitro* entrainerait une diminution de la synthèse de collagène dans les cellules, suggérant son implication dans le développement de la fibrose chéloïdienne²⁵⁸. De même, l'IL-1 α , l'IL-1 β et le TNF α ont été décrits comme surexprimés dans les FC²⁵⁹.

En 2021, Li et ses collaborateurs ont analysé les résultats de *micro array* issus de cinq études, comportant au total 29 échantillons de chéloïde et 24 échantillons de peau normale. Ils souhaitaient ainsi définir un profil d'expression génique pour chacune des deux populations de fibroblastes²⁶⁰. 81 gènes ont ainsi été décrits comme sur ou sous exprimés dans les FC comparément aux FDS.

Parmi les plus décrits et étudiés, les gènes codant pour les intégrines α -4 et β -2 ont été montrés comme surexprimés dans les FC²⁶⁰. Ces intégrines sont des récepteurs transmembranaires médiant la liaison entre les cellules et la MEC. Elles jouent un rôle important dans la formation des tissus et dans leur réponse aux stimuli mécaniques, notamment dans le cadre de la cicatrisation²⁶¹. Plusieurs études ont ainsi suggéré que les FC pourraient posséder une grande sensibilité à leur environnement mécanique, via cette surexpression des intégrines²⁶².

Plusieurs métalloprotéases, notamment MMP14 et MMP3, ont été décrites comme downrégulées dans les FC comparativement aux FDS^{240,260}. La protéine MMP14 permettrait d'induire la croissance cellulaire, et aiderait à la migration des kératinocytes, suggérant son rôle dans la cicatrisation²⁶³. Au regard de leurs effets inducteurs sur la dégradation du collagène, la sous-expression de ces deux protéines dans les FC pourrait en partie expliquer l'état fibrotique persistant du tissu.

La protéine HIF-1 α (*Hypoxia-Inducible Factor 1 α*) a été montrée comme surexprimée dans les FC comparément aux FDS²⁶⁴. Ce facteur entraîne l'induction de la synthèse de collagène dans les FC, ce qui suggère le rôle pro-fibrotique de l'hypoxie dans le développement et la persistance des chéloïdes^{264,265}.

Plusieurs voies de signalisation ont été montrées comme modulées dans les fibroblastes de chéloïde comparément aux fibroblastes sains, notamment la voie de

signalisation de l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1* – Facteur de croissance 1 dépendant de l'insuline) et la signalisation Wnt (*Wingless-related integration site* – Site d'intégration relatif à *Wingless*)²⁴⁰.

Dans les fibroblastes de chéloïde, la régulation du transport et de l'absorption d'IGF-1 par ses protéines de liaison (IGFBP, *IGF Binding Protein*) a été montrée comme dérégulée. En effet, de nombreuses IGFBPs ont été décrites comme uprégulés dans les FC comparativement aux FDS^{240,266,267}. Ces protéines semblent jouer un rôle dans la fibrose, puisqu'elles ont également été décrites comme surexprimées dans des fibroblastes de patients atteints de SSC²⁶⁸ et de fibrose pulmonaire idiopathique²⁶⁹. La surexpression des IGFBPs a également été associée *in vitro* à une induction de la synthèse de matrice dans des fibroblastes de poumon²⁶⁹. Le récepteur à l'IGF-1, lui aussi surexprimé dans les FC, a été associé à une augmentation des capacités d'invasion des fibroblastes de chéloïdes, suggérant encore une fois le rôle de la signalisation IGF-1 dans les chéloïdes²⁷⁰.

La famille des protéines Wnt forme une voie de signalisation très conservée et impliquée dans plusieurs processus physiologiques, dont fait partie la cicatrisation^{271,272}. De façon globale, une diminution de la signalisation Wnt a été montrée dans les chéloïdes par plusieurs études, suggérant son rôle dans la pathogenèse^{240,273}. La protéine SFRP1 (*Secreted Frizzled-Related Protein 1* - Protéine sécrétée apparentée à la protéine frizzled 1), un antagoniste de la voie de signalisation Wnt, est fortement diminuée dans les FC comparativement aux FDS²⁷³. Cette diminution d'expression a pu être expliquée par l'hyperméthylation du promoteur de SFRP1 dans les chéloïdes²⁷⁴. Le rôle de la signalisation Wnt a également été montré dans les FC par l'induction de DAAM1²⁷³, un médiateur de la voie dont le gène est situé sur la région chromosomale 14p22-q23, elle-même décrite comme mutée dans les chéloïdes²⁷⁵. De nombreux autres gènes ont été décrits comme modulés dans les FC comparément aux FDS, mais leur rôle dans les chéloïdes n'a pour l'instant que très peu été étudié.

2.6.1.2. Hétérogénéité intralésionnelle des fibroblastes de chéloïde

Grâce à l'essor récent de la technique de *Single Cell RNA sequencing*, les études visant à décrire le phénotype des fibroblastes de chéloïde ont finalement décrit une complexité bien plus importante que celle qui était pressentie et publiée jusqu'à aujourd'hui dans la

littérature. Très loin de former une population homogène, les fibroblastes de chéloïde possèdent différents phénotypes au sein même du tissu chéloïdien²⁷⁶.

Plusieurs sous-types de fibroblastes ont été décrits et différenciés par leur localisation au sein du tissu, et également par leurs activités *in vitro*. Il a en effet été montré que les fibroblastes du centre profond des chéloïdes étaient les plus actifs et présentaient une activité rétractile plus importante que les fibroblastes de la périphérie^{163,277}. Ces données ont très récemment été confirmées par une étude transcriptomique comparant FC et FDS, qui a montré que les fibroblastes réticulaires centraux des chéloïdes nodulaires étaient caractérisés par une synthèse importante de collagène, TGF- β , HIF-1 α et α -SMA²⁷⁸. Les fibroblastes de la périphérie des chéloïdes présentaient quant à eux une activité migratoire importante, suggérant leur implication dans la croissance des chéloïdes²⁷⁸.

Une étude publiée en 2020 et basée sur le profil transcriptomique des cellules a décrit l'existence de 4 sous-types de fibroblastes au sein du derme sain, dits papillaires-sécrétoires, réticulaires-sécrétoires, mésenchymateux et pro-inflammatoires²⁷⁹. Des phénotypes similaires ont récemment été décrits dans le derme de chéloïdes, dans une étude publiée dans *Nature Communication*²⁸⁰. Dans les chéloïdes, les fibroblastes papillaires-sécrétoires et réticulaires-sécrétoires sont généralement localisés dans le derme du même nom, respectivement papillaire et réticulaire. Les premiers expriment des marqueurs papillaires comme *COL13A1*, *COL17A1* et *COL23A1*, tandis que les fibroblastes réticulaires-sécrétoires expriment des marqueurs réticulaires. Les fibroblastes mésenchymateux expriment des marqueurs de cellules progénitrices mésenchymateuses, dont font partie *ADAM12*, *COL11A1* et *POSTN*^{280,281}. Les fibroblastes pro-inflammatoires sont caractérisés par leur expression de marqueurs de la réponse inflammatoire, leur capacité chimioattractante, et leur expression réduite de collagène²⁸⁰. Dans les chéloïdes, le pourcentage de fibroblastes mésenchymateux (*COL11A1+*) est décrit comme augmenté comparativement aux cicatrices normales, alors que les trois autres sous-types sont présents en quantités moins importantes. Ces fibroblastes mésenchymateux sont caractérisés par la surexpression de gènes impliqués dans le développement du système squelettique et dans la différenciation ostéoblastique, comme *COL11A1*, *COMP* et *POSTN*. Ces fibroblastes sont également associés à leur rôle dans le dépôt et l'organisation des fibres de collagène, faisant d'eux des potentielles cibles thérapeutiques dans le traitement des chéloïdes^{280,282}. Dans les chéloïdes, cette population de fibroblastes

mésenchymateux comporte 53,8% de myofibroblastes (ACTA2+), contre seulement 7,6 à 29,7% dans les autres sous-types de fibroblastes²⁸⁰.

Des études *in vitro* associées ont montré que le traitement des autres types de fibroblastes par du surnageant de FC mésenchymateux (CD90⁺/CD266⁺/CD9⁻) augmentait leur capacité de synthèse de collagène. Ces expérimentations ont ainsi permis de confirmer le rôle de ces cellules dans la pathogénèse des chéloïdes²⁸⁰.

2.6.2. Influence du TGF- β dans la pathogénèse des chéloïdes

En tant que régulateur clé du développement de la fibrose et de l'activation des fibroblastes⁷⁰, le rôle du TGF- β dans la pathogénèse des chéloïdes a été largement étudié durant les dernières années.

Dès 1991, Junni Uitto et son équipe ont montré la co-localisation des ARNm codant le TGF- β 1 et le collagène au sein du tissu chéloïdien²⁸³. Il avait alors été avancé que le TGF- β 1 pourrait exercer son rôle pro-fibrotique dans les étapes initiales de la formation des chéloïdes, lorsqu'il était exprimé par les cellules endothéliales vasculaires²⁸³. Depuis ces premières hypothèses, l'accumulation de TGF- β dans le tissu chéloïdien a été décrite⁶⁷, et son rôle pro-fibrotique sur les fibroblastes de chéloïdes a été largement étudié^{148,284-286}.

Dès les années 1990, il a été suggéré que les FC pourraient présenter une réponse « altérée » au TGF- β ²⁸⁴, comme résumée en *Figure 9*. En effet, le TGF- β augmente la synthèse de fibronectine et de collagène de type I dans les FC de façon plus rapide et importante que dans les FDS^{284,287}. Cette induction serait médiée par l'activation des protéines activatrices de la voie classique du TGF- β 1 : Smad2 et Smad3, dont la phosphorylation est induite dans les FC²⁸⁸. La diminution de la phosphorylation de l'inhibiteur Smad7 dans les FC permettrait quand à elle d'induire indirectement l'activation de la voie classique du TGF- β ²⁸⁸. Une étude *in vitro* a également montré que le TGF- β induit la synthèse du TGF- β 1 et de ses récepteurs TGF- β RI et TGF- β RII dans les FC²⁴⁵. Ainsi, il semblerait qu'une boucle autocrine soit capable d'induire la signalisation du TGF- β dans les chéloïdes, en augmentant progressivement la sensibilité des FC. Enfin, le TGF- β diminuerait la synthèse du marqueur pro-fibrotique CD26 dans les FC, ce qui pourrait induire l'accumulation de CXCL12 et participer à l'état pro-inflammatoire du tissu^{250,251,289}.

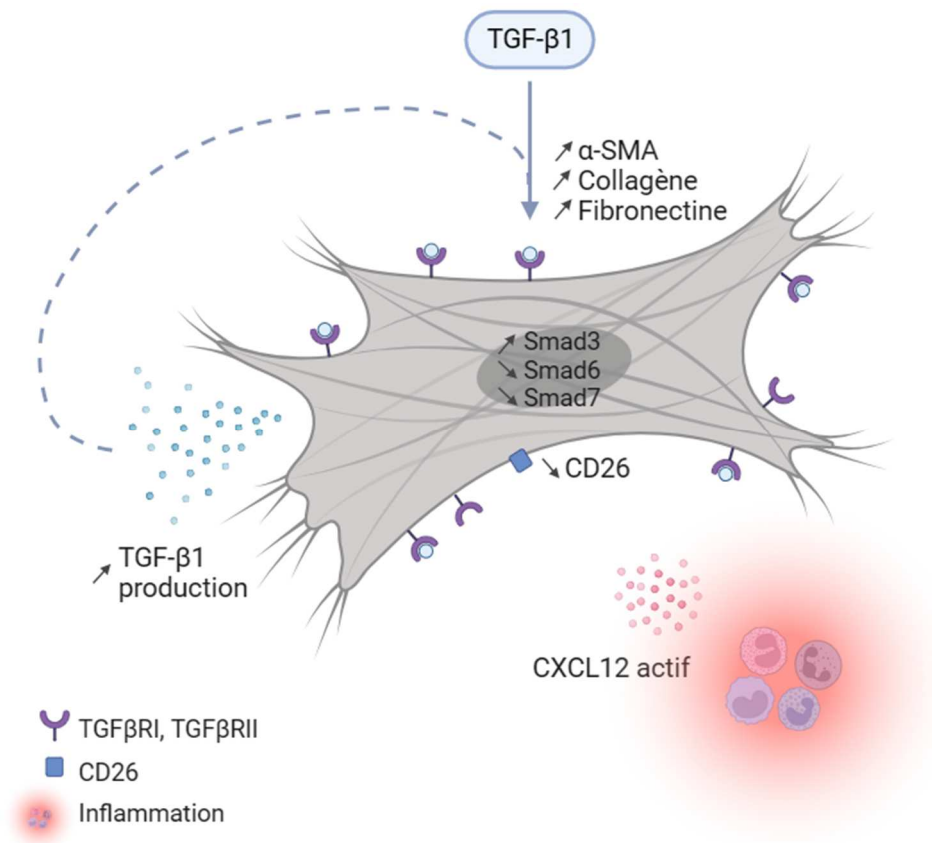


Figure 9 : Influence du TGF-β sur les fibroblastes de chéloïdes

De par leur expression des différents TGFβR, les fibroblastes de chéloïde présentent une forte sensibilité au TGF-β1. Celui-ci induit leur synthèse d'α-SMA, de collagène et de fibronectine, via l'induction de la voie Smad. L'environnement pro-fibrotique médié par le TGF-β induit également la sécrétion de TGF-β par les fibroblastes de chéloïde, formant une boucle d'activation autocrine. Les fibroblastes de chéloïdes expriment des taux moins importants de la protéine CD26, ce qui résulte en l'accumulation de CXCL12 actif dans l'environnement.

Schéma réalisé avec Biorender®.

Au-delà de son effet direct sur les fibroblastes de chéloïde, le TGF-β est l'un des principaux médiateurs permettant la communication entre fibroblastes et cellules immunitaires au sein du tissu. Il a en effet été montré *in vitro* que le surnageant de FC traités par du TGF-β1 contenait d'avantage de M-CSF/CSF-1, le facteur stimulant indispensable à la survie des macrophages²⁹⁰.

2.7. Les macrophages et le système immunitaire dans la pathogénèse des chéloïdes

Bien qu'étant historiquement considérée comme une « simple » pathologie de la cicatrisation, de plus en plus de preuves soutiennent que les chéloïdes pourraient en réalité être une maladie inflammatoire chronique, qui posséderait une manifestation fibrotique cutanée²⁹¹⁻²⁹³.

L'aspect immunologique de la pathogénèse des chéloïdes a été évoqué dès le début des années 70, suggérant que de nombreuses cellules immunitaires pourraient posséder un rôle dans la genèse de la maladie^{294,295}. Les mutations HLA ayant été retrouvées chez les patients atteints de chéloïdes²⁰¹, ainsi que l'accumulation du sHLA-E au niveau sanguin^{291,296}, soutiennent la présence d'une dérégulation immunitaire globale chez les patients touchés.

La présence d'un important infiltrat immunitaire sous forme d'amats cellulaires, nommés KALT (*Keloid-Associated Lymphoid Tissue* – Tissu lymphoïde associé aux chéloïdes) par Bagabir et ses collaborateurs, a été décrit comme l'un des piliers du tissu chéloïdien^{151,152,297}. Les macrophages, mastocytes, Treg (Lymphocytes T régulateurs), DCs (*Dendritic Cells* - Cellules dendritiques), cellules NK (*Natural killer* – Cellules tueuses) et cellules souches mésenchymateuses ont ainsi été décrits comme sur-représentés dans le tissu chéloïdien^{260,281,298-300}. Les chéloïdes contiennent en revanche des quantités moins importantes de lymphocytes T CD4⁺, T CD8⁺, cDC2 (*Type 2 conventional Dendritic Cells* - Cellules dendritiques de type 2 conventionnelles, connues pour médier l'inflammation³⁰¹) et lymphocytes T naifs et proliférants^{132,236,281,297,302,303}. Au niveau du microenvironnement chéloïdien, de nombreuses études ont mis en avant l'augmentation des taux tissulaires de TGF- β , d'IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-12, IL-17, TNF α , IL-4, IL-13, IL-18, iNOS, GM-CSF et M-CSF dans les chéloïdes^{236,281,291,304-307}. Les taux de certains médiateurs anti-inflammatoire et régulateurs négatifs de l'immunité ont également été décrits comme surexprimés dans les chéloïdes comparativement à la peau saine, comme l'IL-34 ou l'IL-37^{305,308,309}.

Cet état immunitaire dérégulé dans les chéloïdes a récemment été d'avantage décrit avec la généralisation des études transcriptomiques et du *single-cell RNA sequencing*^{280,281,303,310-315}. Wu et ses collaborateurs ont notamment décrit une *up régulation* générale des voies de signalisation liées à l'immunité dans les chéloïdes, en particulier les voies

Th1, Th2, Th17/Th22 et JAK3²³⁶. Le rôle des différents types de cellules immunitaires a également pu être décrit plus finement, révélant l'existence d'un réseau de régulation immunitaire complexe au sein des chéloïdes, qui *in fine* suractive le dépôt de matrice extracellulaire par les fibroblastes de chéloïde (*Figure 10*).

2.7.1. Les lymphocytes T

Un important infiltrat de lymphocytes T activés (CD3⁺, CD8⁺, CD28⁺, exprimant ICOS et CCR7)^{236,281,310,316} a été décrit au sein du tissu chéloïdien. Les protéines CCR9 et CCL25, formant un couple ligand/récepteur décrit pour induire le recrutement et la maturation des thymocytes, sont surexprimées dans le tissu^{236,317}. Les lymphocytes T CD4⁺ sont en revanche présents en moins grande quantité dans les chéloïdes comparativement à la peau saine adjacente²⁸¹. Dans les chéloïdes, la majorité des cellules T sont des lymphocytes T mémoires, et notamment des lymphocytes T effecteurs mémoire (T_{EM}) et résidents mémoire (T_{RM})³¹⁸. Au sein de la peau, les T_{RM} sont présents en première ligne dans le cadre d'une lésion cutanée, et permettent d'induire une réponse inflammatoire exacerbée³¹⁹. Ces lymphocytes T mémoire présents dans les chéloïdes expriment d'avantage de CD103/intégrine α E, et produisent d'avantage de TNF- α et d'IFN- γ que ceux présents dans la peau saine³¹⁸. Les auteurs ont ainsi suggéré que les cellules T mémoire CD45RO⁺ dans les chéloïdes seraient anormales, et pourraient être liées au développement des chéloïdes³¹⁸.

2.7.1.1. Les Th1

Les Th1 (*T helper 1* – Lymphocyte T auxiliaire) sont des lymphocytes T CD4⁺ exacerbant la réponse inflammatoire en induisant la phagocytose au sein des macrophages et l'activation des lymphocytes T cytotoxiques. Les voies de signalisation associées aux lymphocytes Th1 ont été montrées comme uprégulées dans les chéloïdes, ainsi que leur expression d'IFN γ ²³⁶. La réponse Th1, connue pour induire la cicatrisation par le biais de la synthèse d'IFN γ , pourrait limiter la prolifération des fibroblastes, et réguler leur synthèse des collagènes de type I et III^{320,321}.

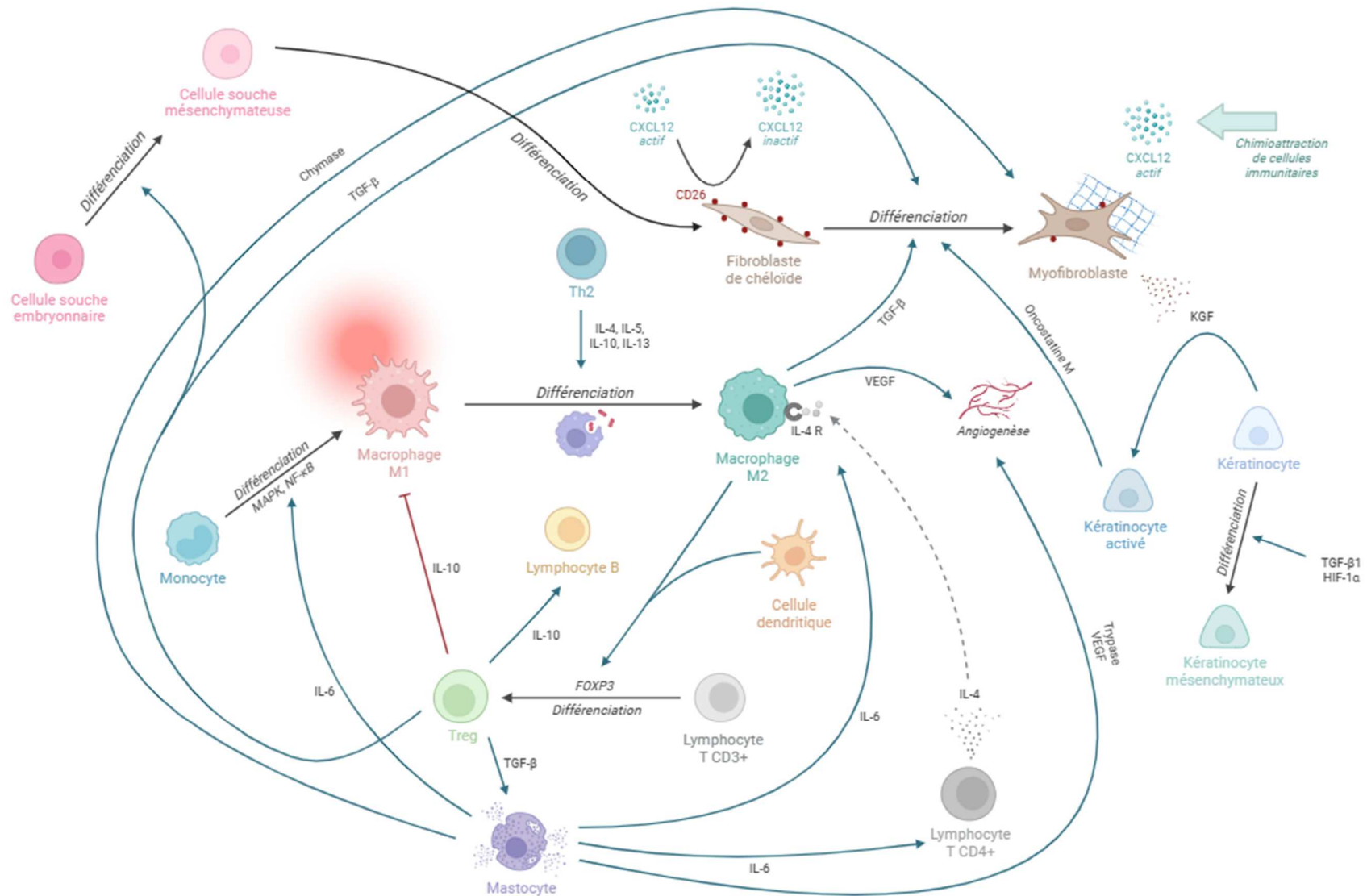


Figure 10 : Représentation schématique du réseau immunitaire décrit au sein des chéloïdes installées

Les fibroblastes de chéloïdes sont au centre du réseau de communication immunitaire présent dans les chéloïdes. Au sein de celui-ci, les macrophages de type M2, Treg, les mastocytes et les kératinocytes participent de façon directe à l'activation des fibroblastes chéloïdiens. L'IL-6 sécrété par les mastocytes participe à l'activation et l'accumulation des macrophages au sein du tissu fibreux. Il permet également d'induire la surexpression du récepteur à l'IL-4 sur les M2, ce qui contribue à maintenir leur phénotype pro-cicatriciel. Cette accumulation des M2 est également favorisée par l'IL-13 et l'IL-4 sécrété par les Th2.

Schéma réalisé avec Biorender®.

2.7.1.2. IL-13, IL-4 et rôle des Th2

Les Th2 ont comme principale fonction d'activer la réponse humorale des lymphocytes B. Plusieurs études ont suggéré la surreprésentation de Th2 anormaux dans le tissu chéloïdien³²²⁻³²⁴, mais également dans la peau saine des patients développant des chéloïdes³²². De la même façon que pour les Th1, les voies de signalisation associées aux Th2 (IL-4R α , CCL11, TNFSF4/OX40L) sont induites dans les chéloïdes^{236,322}. Les principales cytokines sécrétées par les Th2 (IL-13 et IL-4) sont présentes en quantités importantes dans le plasma des patients porteurs de chéloïdes. Elles participent à la polarisation des macrophages de type M2, et pourraient ainsi de façon indirecte posséder un effet pro-fibrotique. L'IL-13 et l'IL-4 jouent également un rôle direct sur les FC, et induisent leur synthèse de collagène³²³. Cette augmentation est elle-même positivement régulée par la périostine³²⁵, dont l'expression est accrue dans les chéloïdes²³⁶. Enfin, une étude américaine a révélé l'expression particulièrement faible du récepteur leurre à l'IL13 (IL-13R α 2) dans les FC comparativement aux FDS³²⁶. Ce récepteur présente une forte affinité avec son ligand, mais n'entraîne pas de transmission du signal. IL-13R α 2 étant présent en faible quantité sur les FC, les auteurs ont alors suggéré que ces cellules pourraient présenter une plus grande sensibilité à l'IL-13 de façon générale. Ainsi, il semblerait que les Th2, de par leur rôle sur les macrophages et les fibroblastes, puissent jouer un rôle central au sein du développement des chéloïdes³²⁷.

2.7.1.3. Les lymphocytes T régulateurs

Les Treg sont des lymphocytes T CD4⁺ permettant de contrôler la réponse inflammatoire. Via leur frein sur la prolifération et leur capacité à induire les polarisations Th1, Th2 et Th17, ils permettent de maintenir la tolérance du soi dans le cadre d'une réaction immunitaire^{328,329}. Les Treg (FoxP3⁺, TGF- β 1, TGF- β 3) sont présents en quantité plus importante dans les chéloïdes que dans la peau saine^{236,298,302,303}. Via leur synthèse de TGF- β , ils sont capables d'induire l'activation des FC et leur dépôt de MEC²⁹⁸, et stimulent la production d'IL-6 par les mastocytes³³⁰. Via leur synthèse d'IL-10, ils inhibent les macrophages pro-inflammatoires M1, et induisent l'activation des cellules B³³¹. De plus, l'expression de FoxP3 dans les chéloïdes est positivement corrélée au dépôt de collagène de type III, suggérant le lien entre les Treg et la formation des chéloïdes²⁹⁸. Il a néanmoins été suggéré que les Treg présents dans le tissu chéloïdien présenteraient des capacités altérées comparativement à ceux présents dans la peau saine. Ces Treg exprimeraient moins de TNF- α , de CD25, CTLA-4 et d'IL-

10, et plus d'IFN- γ que dans la peau saine, suggérant leur faible activité immunosuppressive³¹⁸.

2.7.1.4. Les Th17

L'accumulation d'IL-17 a été décrite au sein du tissu chéloïdien^{236,332}. Ses voies de signalisation associées, qui sont médiées par des acteurs comme CCL20, PI3 et S100As, ont également été décrites comme induites dans les chéloïdes. *In vitro*, il a été montré que l'IL-17 produit par les Th17 induit la synthèse d' α -SMA et de collagène dans les FC, suggérant leur effet pro-fibrotique. Les FC traités synthétiseraient également d'avantage de CXCL12/SDF-1, permettant la chimioattraction des monocytes, lymphocytes et granulocytes^{110,260}. L'IL-17 a également été décrite comme capable de freiner le processus d'autophagie au sein des fibroblastes de chéloïdes, en modulant STAT3 et le facteur HIF-1 α . Il induirait alors une diminution de l'apoptose des FC, qui participerait à l'accumulation des fibroblastes et au développement d'une fibrose cutanée^{333,334}.

2.7.2. Les mastocytes

Les mastocytes sont des leucocytes granulaires présents dans les tissus conjonctifs. Dans la peau, ils sont majoritairement retrouvés dans le derme, et jouent un rôle majeur dans le processus de cicatrisation en permettant d'initier l'inflammation et d'induire l'angiogenèse^{335,336}. Il a été supposé que ces cellules pourraient contribuer à la fibrose développée dans les chéloïdes, ainsi qu'au maintien de l'état inflammatoire du tissu³¹².

Dans le tissu chéloïdien, les mastocytes sont présents en très grand nombre, tant au niveau intralésionnel que périlésionnel^{236,297}. Ils se trouvent généralement dégranulés à proximité des fibroblastes activés, suggérant leur interaction réciproque³³⁷. Les mastocytes libèrent de nombreux facteurs tels que la chymase, la tryptase, l'histamine, le VEGF, le FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor 2* – Facteur de croissance des fibroblastes 2), le PDGF ou l'IL-6. Parmi eux, la chymase, le FGF-2, et le PDGF permettent d'activer la prolifération des FC ainsi que leur synthèse de collagène³³⁸. La tryptase est une sérine protéase possédant une forte activité pro-angiogénique, et son taux dans les chéloïdes a été positivement corrélé à une vascularisation importante des tissus³³⁸. La chymase est quant à elle une enzyme pro-fibrotique qui stimule la prolifération des fibroblastes et leur synthèse de collagène par le biais des voies TGF- β /Smad³³⁹ ou PI3K/Akt/mTOR³⁴⁰. La chymase induit également l'expression d'angiotensine II,

ce qui entraîne de façon indirecte l'up-régulation du TGF- β 1, du TNF- α , du PDGF et de l'IL-1 β dans les FC³⁴¹. L'IL-6 sécrété par les mastocytes contribue à l'état inflammatoire au sein des chéloïdes, puisqu'il active la différenciation des monocytes en M1 via une signalisation dépendante de MAPK/NF- κ B. Il est également responsable de l'induction de la synthèse d'IL-4 par les lymphocytes T CD4⁺. Cet IL-4 pourrait à son tour contribuer à induire la polarisation des macrophages vers un phénotype M2. *In vitro*, il a été montré que les mastocytes étaient capables d'induire la synthèse de MEC dans les FC de façon indirecte, en induisant leur expression d'HIF-1 α par un mécanisme impliquant les voies ERK et PI3K/Akt^{152,342}.

Une étude publiée en 2015 a montré qu'une des caractéristiques ultra structurales du tissu chéloïdien était la présence de mastocytes phagocytant des fibrilles de collagène. Les auteurs avaient alors suggéré que l'accumulation de collagène en trop grande quantité pourrait induire la chimioattraction des mastocytes et leur phagocytose des fibrilles présentes sur le site. Cette activation des mastocytes permettrait la sécrétion de médiateurs, qui à leur tour induiraient la synthèse et le dépôt de collagène, cultivant ainsi l'accumulation du tissu fibrotique³³⁷. Enfin, la proximité entre les cellules nerveuses et mastocytes, ainsi que la synthèse d'histamine par ces derniers, pourraient expliquer en partie la présence des douleurs et démangeaisons associées aux chéloïdes⁶.

2.7.3. Cellules dendritiques

Les DCs (*Dendritic Cells* – Cellules dendritiques) sont des cellules présentatrices d'antigènes qui permettent l'activation de la réponse immunitaire spécifique médiée par les lymphocytes^{343,344}. Leur présence est augmentée dans les chéloïdes comparativement aux cicatrices hypertrophiques et aux cicatrices normales^{236,281,345,346}. Leur rôle au sein du tissu a pour l'instant été peu décrit, mais il a été suggéré qu'elles pourraient jouer un rôle dans la formation des chéloïdes. Au sein du tissu, les DCs sont en effet localisées à la frontière entre derme et épiderme, ce qui suggère leur potentiel rôle de médiateurs entre les cellules dermiques et épidermiques. De plus, leur synthèse de TGF- β 1 contribue à la différenciation des Treg et des FC³⁴⁵. Le sous-type de DC conventionnelles de type 2 a quant à lui été décrit comme sous-représentées dans les chéloïdes²⁸¹. Ainsi, malgré la récente description de l'infiltrat de DCs dans les chéloïdes par les données de *single cell RNA sequencing*, d'autres données restent à apporter afin de réellement mesurer leur rôle dans la pathogénèse.

2.7.4. Cellules souches

Les CSE (Cellules Souches Embryonnaires) sont des cellules indifférenciées, pluripotentes, capable d'autorenouvellement et pouvant donner naissance à tout type cellulaire³⁴⁷⁻³⁴⁹. Au sein des chéloïdes, Zhang et ses collaborateurs ont décrit des « *cellules précurseurs dérivées des chéloïdes* », qui posséderaient une capacité d'auto-renouvellement, des marqueurs de cellules souches embryonnaires et mésenchymateuses, ainsi qu'une capacité de différenciation³³². Le *single-cell RNA sequencing* a permis de mettre en avant la forte présence de marqueurs de ces CSE, notamment *OCT4*, *pSTAT3*, *SOX2* et *NANOG*, au sein du tissu chéloïdien. Ces marqueurs sont localisées spécifiquement au niveau de l'endothélium des vaisseaux sanguins³⁴⁷. Les cellules souches présentes dans le tissu chéloïdien expriment d'avantage d'IL-6 et d'IL-17 que dans la peau saine, suggérant encore une fois le rôle de l'inflammation dans la génèse des chéloïdes³³². Il a récemment été suggéré que ces cellules souches pourraient entamer une transition endothélio-mésenchymateuse en réponse à la présence de TGF- β 1, leur permettant d'acquérir un phénotype de cellules souches mésenchymateuses. A partir de ces cellules, le développement de fibroblastes et de myofibroblastes permettrait de favoriser de façon indirecte la formation des chéloïdes^{332,347,348}.

2.7.5. Kératinocytes

Les kératinocytes, cellules majoritaires de l'épiderme, jouent un rôle majeur dans le processus de cicatrisation, en particulier au cours de la ré-épithélialisation. Les kératinocytes du tissu chéloïdien présentent un phénotype altéré. Ils sont en effet capables d'induire la prolifération des FC *in vitro*, ainsi que leur résistance à l'apoptose, et ce de façon plus importante que des kératinocytes extraits de peau saine^{350,351}. Cet effet sur la prolifération et la survie a été décrit comme associé à l'induction de la signalisation Jun, ainsi qu'à l'augmentation de la synthèse de Bcl-2 et du TGF- β 1 dans les FC³⁵¹.

La rigidité et la densité du tissu chéloïdien ont souvent été associées à un état hypoxique au centre de la cicatrice. En effet, le facteur HIF-1 α inductible par l'hypoxie est surexprimé dans les chéloïdes. Il est capable d'induire la transition épithélio-mésenchymateuse des kératinocytes, qui expriment alors d'avantage de vimentine et de fibronectine, et adoptent une morphologie fibroblaste-*like*³⁵². Le profil mésenchymateux des kératinocytes a été décrit comme potentiellement impliqué dans l'invasion excessive des

cellules épidermiques dans le cadre des chéloïdes. Il pourrait notamment expliquer que les chéloïdes puissent progresser et se développer au-delà des berges de la plaie initiale^{352,353}. Cette transition épithélio-mésenchymateuse des kératinocytes serait également régulée par le TGF- β 1, notamment via les voies Smad et ERK/p38³⁵⁴.

2.7.6. L'IL-6 et la voie JAK/Stat

L'interleukine 6 est une cytokine associée à l'immunité innée³⁵⁵, qui joue un rôle majeur dans la transition entre état inflammatoire et fibrotique³⁵⁶. D'un point de vue fonctionnel, l'IL-6 exerce son activité en se liant à son récepteur, lui-même composé des deux domaines IL-6R α et IL-6R β . Elle induit alors dans les cellules cibles l'activation de signaux et de facteurs de transcription comme JAK/Stat3, MAPK, Erk et PI3K³⁵⁷.

Le gène codant l'IL-6 présente des anomalies chez de nombreux patients porteurs de chéloïdes¹⁹². L'expression de cette cytokine et de son médiateur Stat3 est également augmentée dans les chéloïdes et dans les FC comparativement à un tissu cutané sain^{258,357,358}. Les fibroblastes de chéloïdes surexpriment la protéine JAK, elle aussi impliquée dans la même voie de signalisation. *In vitro*, l'inhibition de Stat3 diminue la production de collagène, la prolifération et la migration des FC³⁵⁷. En 2007, un mécanisme induisant la genèse des chéloïdes et basé sur l'IL-6 avait été décrit dans une étude japonaise. Les auteurs suggéraient alors que les prédispositions génétiques modulant l'expression et l'activité de l'IL-6 pourraient entraîner l'accumulation d'IL-6, et la formation d'une boucle d'activation autocrine. L'IL-6 induirait alors la sur-activation de la voie JAK/Stat3, augmentant la prolifération et la synthèse de matrice des fibroblastes, et, à terme, la formation des chéloïdes³⁵⁷. Plus récemment, il a été suggéré que la synthèse d'IL-6 pourrait être induite en réponse à la présence de TGF- β 1, par une voie dépendante de PI3K/MAPK³⁰². L'IL-6 induirait à son tour la différenciation des monocytes en macrophages pro-inflammatoires, en modulant la voie de signalisation NF- κ B³⁵⁹. L'IL-6 pourrait ainsi de façon indirecte alimenter l'état inflammatoire du tissu³⁵⁶. Elle pourrait également faire le lien entre Th2 et activation des macrophages, en induisant l'expression de l'IL-4R sur ces derniers ; permettant alors leur polarisation vers un profil M2³⁵⁹.

2.7.7. Les macrophages

Comme nous l'avons vu précédemment, les macrophages sont un marqueur de l'état inflammatoire de la fibrose¹. En effet, une fibrose dite chaude est caractérisée par un infiltrat macrophagique plus important qu'une fibrose dite froide. Dans les chéloïdes, les données actuelles prouvent la place centrale du macrophage dans la pathogénèse. Plusieurs études ont en effet montré la persistance des macrophages dans le tissu chéloïdien, en cytométrie²⁹⁹, en immunohistochimie^{297,360}, et dans des données de *single cell RNA sequencing*^{280,281}. Plusieurs cytokines associées aux macrophages, notamment l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-10, l'IL-12 et le TGF- β 1, sont présentes en plus grande quantité dans les chéloïdes comparativement à la peau saine²⁹⁹. La protéine chimioattractante des monocytes, MCP-1, est elle aussi retrouvée en quantités importantes dans le tissu³⁶¹.

Les dernières données de *single-cell RNA sequencing* réalisées sur du tissu chéloïdien ont montré que plusieurs gènes uprégulés dans les macrophages résidants dans les chéloïdes étaient plutôt caractéristiques des macrophages de type M2 (*RNASE1*, *SELENOP*, *C1QC*, *C1QB*, *C1QA*, *FOLR2*, *SLC40A1*, *APOE*, *LGGMN*, *CTSD*). Ces macrophages expriment fortement certains gènes impliqués dans la liaison à la MEC (*COL1A1*, *SPARC*) et liés aux processus d'oxydations phosphorylantes mitochondriales (*MT-CO1*, *MT-CYB*, *MT-ND5*, *MT-CO3*). Plusieurs études histologiques ont également montré la persistance des M2 dans le tissu via l'étude de marqueurs comme CD206^{152,297} et CD163^{360,362}. Malgré la prédominance des macrophages de type M2, l'infiltrat de M1 (iNOS⁺) a également été montré comme plus important que celui trouvé dans la peau saine, et pourrait en partie expliquer l'accumulation de cytokines inflammatoires dans le tissu chéloïdien^{281,302}. Au sein des chéloïdes, certains macrophages présentent des marqueurs de TAM (*Tumor Associated Macrophages* – Macrophages associés aux tumeurs), comme *RNASE1*, *C1QA*, *CD163*, *CD14*, *C1QC*, *FCGRT*, *MS4A7*, *APOC1*, *CTSB*, *CTSL*, et *TYROBP*²⁸¹. Généralement assimilés à des macrophages de type M2, les TAMs permettent entre autre de réguler l'activité des fibroblastes, des Th2, et des Treg au sein du tissu cancéreux^{363,364}. Leur présence dans les chéloïdes soutient le caractère quasi-néoplasique du tissu, qui, bien que bénin, forme des reliefs pouvant facilement être assimilés aux tumeurs.

Les études de *single-cell RNA sequencing* suggèrent qu'il pourrait exister un axe de communication cellulaire centré sur les macrophages au sein des chéloïdes. Cet axe, reliant macrophages, fibroblastes, mais également lymphocytes T, DCs et monocytes, révèle la

complexité des phénomènes mis en jeu dans la pathologie²⁸¹. Au niveau des échanges entre fibroblastes et macrophages, les auteurs ont suggéré que les interactions seraient principalement médiées par des couples ligands/récepteurs, notamment TGF- β 2/TGF- β R2, TGF- β 3/TGF- β R3, CCL2/CR1, et CCL2/CCR5²⁸¹. Les FC induiraient alors une polarisation des macrophages vers un phénotype M2, tandis que les macrophages moduleraient leur phénotype fibrotique²³⁶.

Au sein du tissu chéloïdien, les macrophages de type M2 sécrètent en effet de nombreux autres facteurs pro-fibrotiques médiant la prolifération et l'activation des FC, comme le TGF- β , le PDGF, le CTGF et le VEGF^{365,366}. Le TGF- β sécrété par les macrophages de type M2, comme montré en *Figure 9*, est alors capable d'induire l'activation des FC³⁰. La prolifération et l'activation des fibroblastes de chéloïdes est également largement induite par le PDGF, auquel les FC sont particulièrement sensibles via leur forte expression du PDGFR^{246,367,368}. Il a également été suggéré que la communication entre fibroblastes et macrophages au sein des chéloïdes passerait par plusieurs facteurs de transcription, notamment RB1 (*RetinoBlastoma protein 1* – Protéine du rétinoblastome 1), qui est connu pour moduler l'expression de gènes associés aux M2, comme *C1QC*, *C1QB* et *MRC1*. En induisant l'expression de RB1 dans les monocytes/macrophages, les fibroblastes de chéloïde pourraient ainsi induire de façon directe la transition des macrophages vers une polarisation M2²⁸¹.

Les études *in vitro* et *in vivo* ayant exploré l'interaction entre fibroblastes et macrophages au sein des chéloïdes sont très peu nombreuses. Parmi elles, une étude *in vitro* menée par le groupe de Susan Gibbs a montré que les FC étaient capables d'induire la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 CD206⁺. La présence de monocytes dans l'environnement de culture ne semblait en revanche pas moduler le phénotype des FC³⁶⁹. Lee et ses collaborateurs ont quant à eux développé des tissus matriciels cellularisés par des FC ou des FDS, qui ont par la suite été greffés dans des souris immunodéficientes. Les auteurs ont alors montré que l'infiltrat de macrophages murins était beaucoup plus important dans les matrices comportant des FC, que dans celles comportant des FDS. Il a ainsi été suggéré que le sécrétome des FC induirait le recrutement des macrophages, et ce même dans un modèle murin non humanisé³⁷⁰. Cette étude peut être mise en lien avec une seconde publication, qui a montré que des monocytes CD14⁺ issus de patients porteurs de chéloïdes induisent le

recrutement des macrophages en induisant la synthèse de MCP-1 dans des FDS. Ces monocytes induisent également la prolifération des FDS³⁶¹.

Bien que très peu de données *in vitro* soient disponibles sur le rôle des macrophages sur les fibroblastes de chéloïdes, de nombreuses études ont investigué leurs effets sur leurs homologues sains, les FDS. Sapudom et ses collaborateurs ont par exemple récemment montré que le milieu de macrophages de type M1 (iNOS⁺) augmente l'expression³⁷¹ et l'activité³⁷² de plusieurs métalloprotéases (MMP1, MMP2, MMP3 et MMP14) et de TIMP1³⁷¹ dans les fibroblastes dermiques, comparativement au milieu de M2. La synthèse des collagènes de type I et III est diminuée par le milieu de M1 dans les FDS, comparément aux cellules non traitées³⁷¹. Même si le milieu de M1 a été suggéré comme freinant l'expression d'ACTA2 (codant l' α -SMA) dans des fibroblastes dermiques humain, l' α -SMA n'était quant à elle pas modifiée³⁷¹. Il a également été montré que les macrophages de type M2a (CD206⁺) induisent les capacités prolifératives^{372,373} et migratoires³⁷³⁻³⁷⁵ des fibroblastes dermiques humains. Ils induisent également leur synthèse de collagène, en monocouche³⁷⁵ mais aussi lors d'une co-culture au sein d'un environnement matriciel³⁷⁴. Les fibroblastes dermiques cultivés en présence de M2 expriment d'avantage de TGF- β 1, TIMP1 (*Tissue Inhibitor of MetalloProtease 1* – Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases 1) et de collagène de type I, et présentent une activité métalloprotéase moins importante, suggérant leur profil pro-fibrotique³⁷². Dans une dernière étude, Kurachi et ses collaborateurs ont très récemment suggéré que des macrophages CD206⁺ pourraient, via leur synthèse d'IL-6, diminuer l'expression du collagène de type I et de MMP-1 dans des FDS. Bien que ces résultats suggèrent que l'IL-6 possède des capacités anti-fibrotiques sur les FDS, le phénotype de ces macrophages CD206⁺ pourrait être discuté. Ce marqueur membranaire n'étant pas strictement exprimé par les macrophages de type M2, il est en effet difficile de conclure de façon certaine quant à leur polarisation³⁷⁶. L'ensemble de ces études permettent de qualifier les M1 comme des macrophages plutôt anti-fibrotiques et les M2 comme des macrophages pro-fibrotiques, au regard de l'effet de leur sécrétome sur les fibroblastes dermiques sains (*Figure 11*).

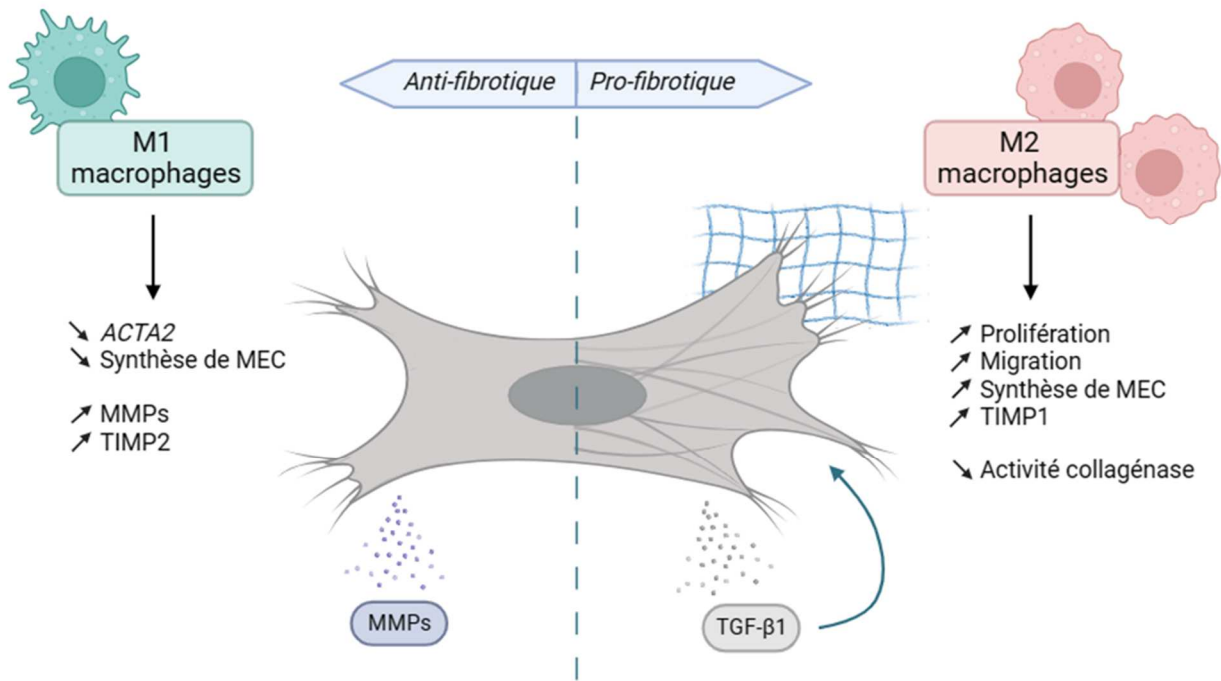


Figure 11 : Effet des macrophages de type M1 et M2 sur les fibroblastes dermiques sains

Les macrophages de type M1 ont un effet plutôt anti-fibrotique sur les fibroblastes dermiques sains, en diminuant leur synthèse d' α -SMA et de collagène, et en induisant leur activité collagénase. Les macrophages de type M2 ont quant-à eux une activité pro-fibrotique, et induisent la prolifération, la migration, la synthèse de MEC, et l'expression de TGF- β 1 dans les fibroblastes dermiques sains.

Schéma réalisé avec Biorender®.

Au-delà de leurs interactions avec les fibroblastes, les macrophages régulent également d'autres types cellulaires immunitaires au sein des chéloïdes. Les M2 sont notamment responsables de l'induction de FoxP3 dans les lymphocytes T CD3+ circulants, entraînant leur différenciation en lymphocytes Treg (T régulateurs)²⁹⁹. Ces derniers permettent de maintenir un équilibre au sein du système immunitaire, via leurs fonctions inhibitrices principalement médiées par l'IL-10 et le TGF- β ^{329,377}. L'origine de l'accumulation des macrophages au sein des chéloïdes, et notamment des M2, est encore mal décrite. Même si des études complémentaires seraient nécessaires afin de réellement valider cette théorie, il a néanmoins récemment été suggéré que cette polarisation pourrait être médiée par des signaux mécaniques, comme l'étirement et la tension cutanée³⁷⁸. La sur-représentation des M2 pourrait également être associée à l'accumulation d'IL-13 et d'IL-4 au sein des cicatrices³⁰³. L'induction de l'expression de l'IL-4R α a en effet été montré dans les chéloïdes, et pourrait participer à la polarisation des macrophages vers un phénotype M2²³⁶.

2.8. Traitements

Les traitements utilisés actuellement contre les chéloïdes sont nombreux, et visent majoritairement à diminuer le relief des cicatrices et/ou à limiter les douleurs et démangeaisons subies par les patients. La pharmacothérapie, l'irradiation, le laser et l'excision chirurgicale sont les principaux traitements utilisés³⁷⁹⁻³⁸¹.

Concernant les pharmacothérapies, les corticoïdes (dexaméthasone, triamcinolone acetonide) sont aujourd'hui un des principaux traitements utilisés afin de limiter le développement des chéloïdes^{380,381,381,382}. Les corticostéroïdes agissent en supprimant les médiateurs de l'inflammation (VEGF) ainsi que la prolifération des fibroblastes, et permettent de freiner leur synthèse de collagène^{383,384}. D'un point de vue clinique, les corticostéroïdes ont été largement montrés comme pouvant prévenir la récurrence des chéloïdes après excision chirurgicale. Ils peuvent également diminuer le volume des chéloïdes, en monothérapie et en bithérapie³⁸⁵⁻³⁸⁷. L'hétérogénéité des protocoles de traitements (concentration du produit, nombre d'injections, durée du traitement, association à une 2^{ème} thérapie, « âge » de la chéloïde et localisation) complique en revanche la mise en place d'un protocole standardisé³⁸¹. Bien qu'efficaces, les corticostéroïdes ont de nombreux effets secondaires, comme rapporté au fil des années. Douleurs au niveau du site d'injection, atrophie cutanée, ulcérations, altération de la pigmentation, douleurs, démangeaisons, et même acnée, troubles menstruels et hypertension ont été rapportés comme les effets secondaires les plus fréquents^{385,386,388-392}.

Au regard des inconvénients liés à l'utilisation des corticostéroïdes, de nombreuses équipes ont cherché à développer d'autres pharmacothérapies³⁸¹. Les études et protocoles de traitement étant encore une fois très diversifiés, il est difficile de conclure quant à l'efficacité de ces pharmacothérapies nouvelles. Néanmoins, certaines de ces thérapies sont de plus en plus décrites comme pouvant posséder un réel impact thérapeutique, comme la bléomycine, le 5-fluorouracile, ou la mitomycine C³⁸¹. La mitomycine C est un agent anti-cancéreux, qui permet de diminuer la prolifération des fibroblastes^{393,394}. Elle a montré des capacités à diminuer la récurrence des chéloïdes après excision, lorsqu'appliquée de façon topique ou intralésionnelle³⁹⁵⁻³⁹⁹. Le 5-fluorouracile est un analogue de la pyrimidine qui possède la capacité d'inhiber la thymidine synthase, entraînant ainsi un frein sur la réplication de l'ADN et

la prolifération cellulaire⁴⁰⁰. Plus de 50% des patients présentaient une diminution significative de la taille de la cicatrice après injections intralésionnelles de 5-fluorouracile⁴⁰¹. En revanche, son efficacité était plus faible que celle apportée par les corticostéroïdes, avec 57% de réduction de taille après injection intralésionnelle, contre 71% pour le traitement aux corticostéroïdes⁴⁰². La bléomycine, en clivant l'ADN des cellules cibles et en induisant leur apoptose, permettrait quant à elle de réduire la récurrence des chéloïdes après excision^{403,404}.

Les pharmacothérapies décrites précédemment sont la plupart du temps associées à des traitements non médicamenteux, comme l'excision chirurgicale, la cryothérapie, la radiothérapie ou l'utilisation de pansements compressifs. Même si l'excision chirurgicale est aujourd'hui un des traitements de référence pour lutter contre les chéloïdes, elle entraîne des taux de récurrences très élevés, entre 45 à 100%, lorsque réalisée en monothérapie^{166,405}. De plus, le geste technique réalisé par le chirurgien peut grandement impacter le devenir de la cicatrice. Une manipulation douce, évitant la tension sur les bords de la plaie et la sollicitation importante du tissu, ainsi que des mesures hygiéniques strictes (désinfection, contrôle des saignements), pourraient limiter la récurrence^{406,407}.

La cryothérapie, qui est également largement utilisée pour lutter contre les chéloïdes, a montré son efficacité afin de diminuer la taille des chéloïdes, seule ou en combinaison avec différentes pharmacothérapies⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰. Elle permet de moduler le profil des fibroblastes de chéloïdes, en induisant leur changement de phénotype vers un phénotype sain^{411,412}.

La radiothérapie, bien qu'elle induise un taux très important de récurrences lorsque réalisée en monothérapie, présente des résultats intéressants lorsque combinée à une excision chirurgicale⁴¹³. Elle permet en effet de diminuer la prolifération des fibroblastes et leur synthèse de collagène de façon indirecte, en modulant le relargage de TGF- β au sein du microenvironnement des chéloïdes³⁸¹.

Les pansements compressifs et les traitements à base de silicone permettent de moduler la pression et la tension appliquée au sein de la cicatrice, et limiteraient ainsi leur développement. Plusieurs systèmes de compression des cicatrices ont en effet été développés, et ont montré des capacités à réduire le taux de récurrences⁴¹⁴⁻⁴¹⁶.

De nouvelles pratiques encore peu décrites, qu'elles soient chirurgicales ou basées sur l'utilisation de traitements secondaires non médicamenteux, ont été suggérées afin de traiter les chéloïdes. Très récemment, une étude préliminaire chinoise a démontré que l'injection de fibroblastes autologues non lésionnels sur le site de la chéloïde après excision permettait de diminuer le relief et la rigidité de la cicatrice, ainsi que la pigmentation de la peau⁴¹⁷. Des inhibiteurs de trypase, une enzyme pro-angiogénique sécrétée majoritairement par les mastocytes, ont montré des effets bénéfiques sur les symptômes associés aux chéloïdes³³⁸. Enfin, une très récente étude a montré que l'utilisation d'inhibiteurs de JAK1 et JAK3, qui sont impliquées dans les mécanismes de signalisation conduisant au développement des chéloïdes, pourraient avoir un intérêt thérapeutique. La prise orale d'un de ces inhibiteurs, le Tofacitinib, a en effet été montrée comme capable de réduire le volume des chéloïdes, en diminuant la prolifération et la synthèse de collagène des fibroblastes⁴¹⁸.

En conclusion, et bien que les thérapies visant à limiter le développement des chéloïdes soient nombreuses, aucun traitement n'a pour l'instant été admis comme traitement de référence. L'hétérogénéité des protocoles et la petite taille des échantillons de patients recrutés dans les études cliniques ne suffisent pas à pouvoir conclure en l'efficacité de ces traitements de façon fiable.

2.9. Modèles d'étude de la maladie chéloïdienne

Les chéloïdes sont une maladie réputée unique aux *homo sapiens*. Aucune autre espèce animale, y compris les primates, ne sont capables de développer des chéloïdes de façon spontanée, comme c'est le cas chez l'Homme. Ainsi, le manque de modèles animaux a particulièrement entravé les efforts de recherche visant à la prévention de la maladie et au développement de thérapeutiques. Afin de pallier au manque de modèles d'études disponibles, de nombreuses équipes ont mis au point des modèles de chéloïdes *in vitro* et *in vivo* plus ou moins complexes et représentatifs de la pathologie (résumés en *Figure 11*).

2.9.1. Modèles *in vitro* et *ex vivo*

Il existe deux types principaux de modèles *in vitro*, ceux basés sur la culture de fragments de chéloïdes récoltés après excision, nommés explants, et ceux basés sur la culture de cellules extraites du tissu pathologique⁴¹⁹.

2.9.1.1. Modèles cellulaires *in vitro*

En tant que principales cellules sécrétrices de MEC dans la pathologie, les fibroblastes de chéloïde ont été placés au centre de la plupart des modèles expérimentaux *in vitro* mis au point au cours des dernières années (Figure 12). Un des modèles les plus utilisés, à savoir la culture de fibroblastes de chéloïdes en monocouche, possède l'avantage d'être facile à mettre en place, et relativement comparable entre les différents laboratoires^{239,286}. Ce type de modèle a notamment été utilisé pour des études visant à évaluer l'expression du collagène^{420,421} ou de FAP⁴²² dans les FC. Certaines études évaluent la réponse des FC à une blessure⁴²³ ou à la présence de différentes cytokines^{150,424,425}, tandis que d'autres utilisent ces monocouches afin d'évaluer l'effet de drogues anti-fibrotiques^{286,426-430}. Plusieurs équipes de recherche ont également entrepris de réaliser des co-cultures en monocouches, en ajoutant aux fibroblastes plusieurs types cellulaires comme des kératinocytes⁴³¹, des cellules souches³⁴⁹, ou encore des mastocytes³⁴⁰.

Des cultures indirectes entre fibroblastes et d'autres cellules ont permis de mesurer l'interaction entre les deux populations, tout en s'affranchissant de leur immunocompatibilité. C'est notamment le cas des modèles en chambres de Boyden, associant fibroblastes et kératinocytes^{351,432,433}, lymphocytes⁴³⁴, monocytes³⁶¹ ou encore des cellules du follicule pileux⁴³⁵. La plupart de ces études visaient à montrer l'importance de l'environnement des fibroblastes, et notamment des kératinocytes, sur leur activité fibrogénique. Il a ainsi été montré par plusieurs études que les kératinocytes de chéloïde entraînent une induction de la prolifération^{350,351,436}, de la synthèse de collagène^{432,433,436,437} et de l'activation de la voie du TGF- β ^{436,438} dans les FC. D'autres équipes ont également utilisé des milieux induits par différents types cellulaires (sécrétomes), afin d'évaluer leurs effets sur les FC^{439,440}.

Au-delà des monocouches cellulaires, de nombreuses équipes ont développé des supports 3-D composés de MEC (collagène de type I, Matrigel® ...) et cellularisés par des fibroblastes de chéloïde⁴⁴¹⁻⁴⁴⁵. Li et ses collaborateurs ont notamment montré qu'un modèle de ce type permettait d'induire la synthèse de collagène et de MMPs des FC comparément à la culture en monocouche⁴⁴¹. Kamamoto et son équipe ont en parallèle mis en évidence l'activité contractile plus élevée des FC comparée aux FDS, en utilisant des gels de collagène rétractés libres⁴⁴².

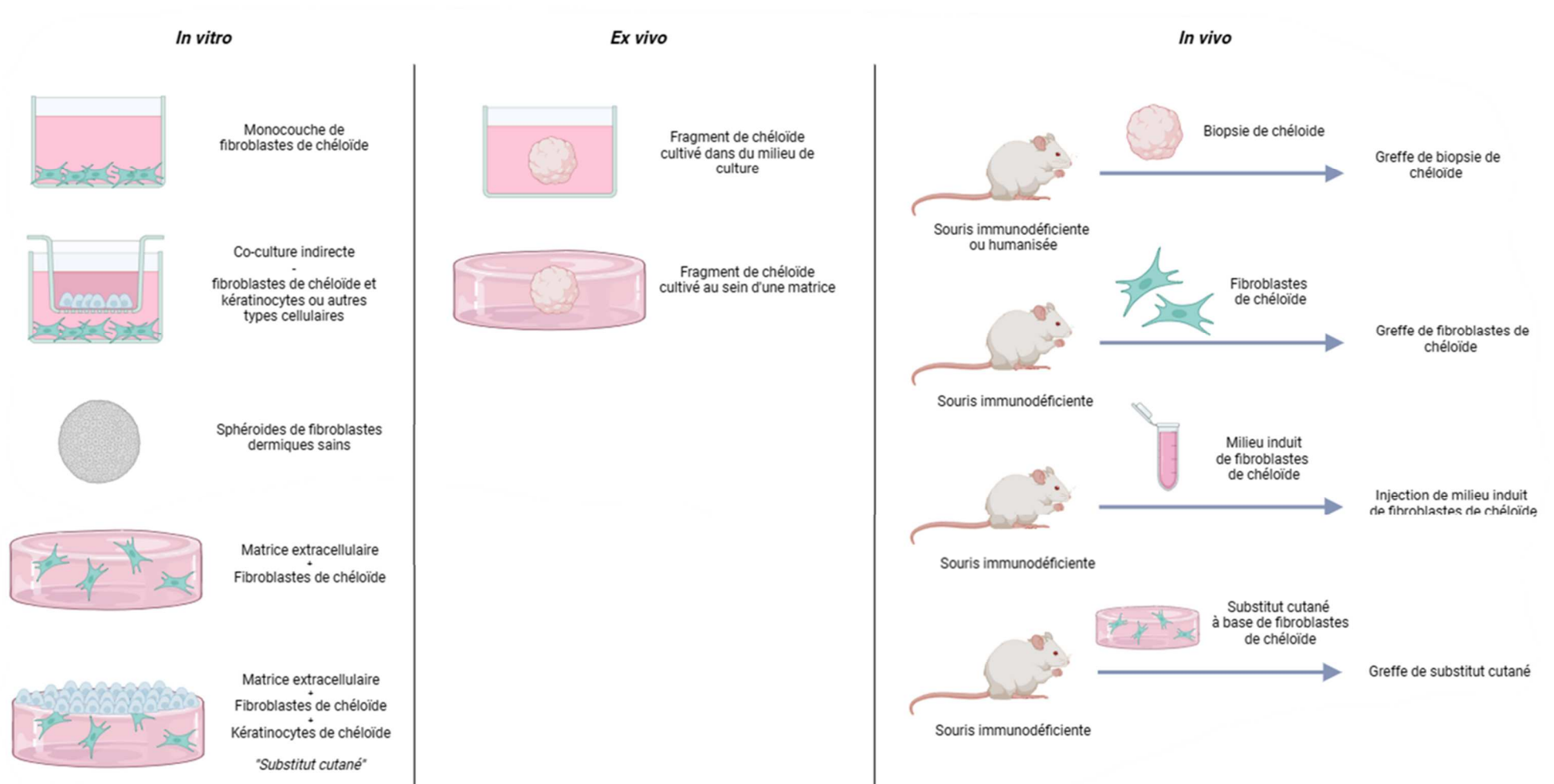


Figure 12 : Représentation schématique des différents modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* utilisés pour l'étude des chéloïdes

Schéma réalisé avec Biorender®.

En complexifiant ces modèles par l'ajout de kératinocytes, plusieurs équipes ont développé des « substituts cutanés », généralement composés d'une matrice emprisonnant des fibroblastes de chéloïdes et surmontée d'une couche de kératinocytes. Plusieurs études ont ainsi montré que les substituts formés de FC présentaient un dépôt de collagène plus important que ceux formés de fibroblastes sains^{135,446-448}. La contraction du modèle, ainsi que l'épaisseur de l'épiderme était également plus importante dans les modèles utilisant des cellules provenant de chéloïdes¹³⁵. De plus, après blessure des substituts cutanés à l'aide d'un scalpel, une équipe a pu observer la migration des kératinocytes au sein de la plaie, de façon concomitante avec la rétraction du modèle⁴⁴⁸.

Dans le cadre du développement des modèles composés d'une matrice de collagène, certaines équipes ont cherché à évaluer le caractère fibrogénique des FC provenant de différentes régions intra-lésionnelles. Ils ont alors dissocié fibroblastes et/ou kératinocytes provenant de la périphérie de la cicatrice et de son centre plus ou moins profond, ainsi que les fibroblastes provenant de la peau saine adjacente (*Figure 13*). Une collaboration entre notre équipe et l'Université de Chiang Mai a caractérisé la production d'une matrice cellularisée en 3 parties distinctes, contenant chacune des FC de centre, de périphérie, et des fibroblastes de peau saine adjacente à la chéloïde¹⁶³. Une étude néerlandaise a quant à elle développé des modèles associant fibroblastes et kératinocytes dans une matrice extracellulaire, et ce pour chaque zone des chéloïdes décrites en *Figure 12*²⁷⁷. Les deux études ont conclu que les fibroblastes du centre profond des chéloïdes sont les plus actifs et présentent une activité rétractile plus importante. De plus, les auteurs ont montré que la

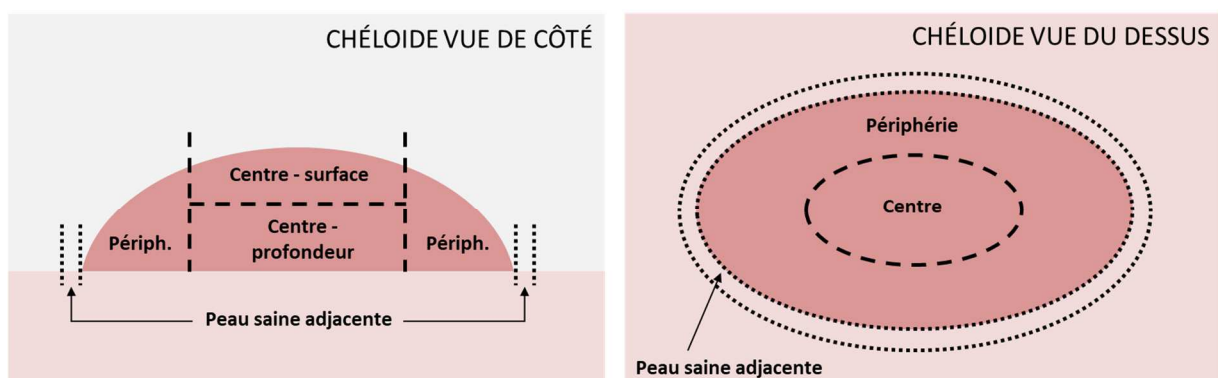


Figure 13 : Cartographie des différentes zones décrites au sein des chéloïdes

Modifié de Limandjaja et al, *Reconstructed human keloid models show heterogeneity within keloid scars*, Arch Dermatol Res, 2018

rétraction du modèle 3D ainsi que l'épaisseur de l'épiderme était plus importante dans les modèles composés de fibroblastes de chéloïdes, comparativement à ceux formés de FDS.

2.9.1.2. Culture d'explants – modèles *ex vivo*

Les explants, qui sont des fragments de chéloïde directement prélevés au sein du tissu, ont été largement utilisés durant les dernières années pour l'étude des chéloïdes. Avec ou sans conservation de la couche épidermique⁴⁴⁹, cultivés dans du simple milieu de culture⁴⁵⁰ ou dans une matrice de collagène^{449,451,452}, ou encore totalement immergés⁴⁵⁰ ou en partie exposés à l'air^{451,452}, les conditions de maintien de ces explants sont très variables d'une étude à l'autre. Nombre de ces études s'accordent néanmoins sur le fait que les explants pourraient être maintenus en culture jusqu'à 6 semaines après chirurgie^{449,451}. Les fibroblastes y exprimaient alors autant de collagène de type I^{449,451} et de collagène de type III⁴⁴⁹ qu'après excision de la chéloïde, ce qui a permis de valider l'intégrité du modèle à moyen terme. Assez rapidement, il a été admis que cultiver ces explants au sein d'une matrice de collagène permettait de conserver au mieux la morphologie 3D du tissu^{449,451}. Duong et ses collaborateurs ont montré que des explants avec épiderme présentaient une morphologie plus proche de celle des chéloïdes lorsque l'épiderme était placé à la surface, en dehors de la matrice de collagène dans laquelle ils étaient cultivés⁴⁴⁹, reproduisant ainsi la conformation et l'orientation du tissu *in vivo*.

L'intérêt de la culture d'explants de chéloïdes dans la recherche de thérapeutiques a été montré par plusieurs études *in vitro*. Bagabir et ses collaborateurs ont par exemple montré que la dexaméthasone, un glucocorticoïde utilisé couramment pour le traitement des chéloïdes, entraîne une diminution de la taille de l'explant *in vitro*, ainsi que du nombre de cellules et de l'épaisseur de l'épiderme⁴⁴⁹.

Bien ces modèles d'explants semblent pertinents à moyen terme, ils demandent d'avoir accès de façon régulière et contrôlée à du tissu frais. Un grand nombre de prélèvements serait également nécessaire afin de pouvoir lisser la variabilité entre les patients. De plus, et comme dans beaucoup de modèles *in vitro*, les explants pourraient être perturbés par l'absence d'un système circulatoire fonctionnel permettant d'irriguer le tissu.

2.9.2. Modèles *in vivo*

Les chéloïdes sont une maladie propre à l'Homme. Aucune espèce animale n'est en effet capable de former des chéloïdes après une blessure, et ce de façon spontanée. Pour ces raisons, le développement d'un modèle animal de chéloïde a été un réel enjeu majeur au cours des dernières années. Jusqu'alors, trois stratégies principales ont été évoquées afin d'obtenir des animaux développant des cicatrices le plus similaire possibles aux chéloïdes :

- La formation d'une lésion cutanée par l'expérimentateur,
- L'injection d'agents chimiques,
- L'injection/greffe de cellules et/ou tissus chéloïdiens humains.

Néanmoins, bien que plusieurs équipes aient décrit des modèles de « chéloïde » basés sur les deux premières stratégies, les plaies induites chez les animaux étaient en réalité loin de récapituler les principales caractéristiques des chéloïdes. En raison du faible relief des cicatrices et de leur incapacité à s'étendre dans le tissu sain adjacent, ces modèles ont finalement d'avantage été considérés comme des modèles de fibrose cutanée non chéloïdienne^{453,454}. Pour cette raison, ces modèles ne seront pas plus amplement détaillés dans ce manuscrit. Nous nous concentrerons sur les modèles animaux basés sur l'utilisation de tissu chéloïdien, et sur les modèles d'ingénierie cellulaire visant à injecter des cellules pathologiques au sein des souris.

2.9.2.1. Modèles basés sur l'utilisation de tissu chéloïdien

Dès les années 1980, Shetlar et ses collaborateurs ont initié la réalisation de greffes de tissu chéloïdien humain dans des souris athymiques, immunodéficientes, qui possèdent l'avantage d'éviter tout rejet de greffe⁴⁵⁵⁻⁴⁵⁹. Les xénogreffes ainsi créées sont alors viables durant plusieurs semaines, et présentent une synthèse persistante de MEC⁴⁵⁷ ainsi qu'une néo vascularisation⁴⁶⁰. L'équipe de Yang décrit « *des greffons de peau de pleine épaisseur maintenus viables chez des souris nudes athymiques jusqu'à 6 mois après la transplantation* »⁴⁵⁶. En revanche, après plusieurs mois, la plupart des greffons diminuent en masse (plus de 50% de perte), et synthétisent de la matrice en quantité moindre^{456,459,460}. Ces modèles de xénogreffe semblent donc particulièrement indiqués sur des temps courts, ne s'étendant pas au-delà de 6 mois. Bien que prometteur, ce type de modèle peut être compliqué à mettre en place de par la nécessité d'avoir accès à du tissu frais de façon régulière

et planifiée. Au regard de l'hétérogénéité intra-lésionnelle des chéloïdes, le choix de la localisation de l'explant au sein de la chéloïde excisée pourrait également être discuté. Ainsi, bien qu'ils présentent plusieurs avantages, les problématiques citées précédemment ont limité l'utilisation de ces modèles.

Afin de palier à l'absence de système immunitaire humain dans ces modèles, la première description d'un modèle de greffe de chéloïde dans des souris humanisées a été réalisée très récemment, durant l'été 2023⁴⁶¹. Les auteurs ont tout d'abord conféré aux souris immunodéficientes un système immunitaire humain via l'injection de PBMC humain. Des fragments de chéloïdes ont ensuite été greffés sur le dos des souris. Après 4 semaines, une augmentation du poids du greffon avait été constatée. Comparativement aux modèles utilisant de simples souris immunodéficientes, les auteurs ont ici observé la formation d'un néotissu aux limites du greffon. Celui-ci était riche en Th17, IL-17 et HIF-1 α , de façon similaire aux marges des chéloïdes chez l'Homme. L'infiltrat de lymphocytes T et la synthèse de collagène étaient également plus élevés au sein du greffon. Ainsi, ce premier modèle de souris humanisée est une réelle avancée dans le développement des modèles de chéloïde *in vivo*, et pourrait présenter un grand intérêt pour le développement de nouvelles thérapeutiques⁴⁶¹.

2.9.2.2. Modèles d'ingénierie cellulaire et tissulaire

Dans les années 1980, de façon parallèle à la mise en place de modèles comme celui de Shetlar, l'équipe d'Estrem et ses collaborateurs a développé un modèle basé sur l'injection sous cutanée de FC dans des souris athymiques⁴⁵⁵. Ces injections conduisaient à la formation d'une boule au niveau du site d'injection après plusieurs semaines. Des études histologiques de ces amas ont confirmé la prolifération des fibroblastes ainsi que la présence d'un dépôt de collagène similaire à celui présent dans les chéloïdes⁴⁵⁵.

Plus récemment, une étude évaluant l'effet de l'injection en sous cutané d'un mélange de Matrigel® et de milieu induit par des FC a montré que le milieu induit était suffisant pour induire le développement d'excroissances fibreuses, dont la morphologie est semblable à celle des chéloïdes. L'analyse du milieu de FC utilisé a révélé des taux importants de la protéine RANTES/CCL5, une chimiokine surexprimée dans de nombreux tissus fibrotiques et qui pourrait être à l'origine du développement des chéloïdes⁴⁶².

En 2017, Sunaga et son équipe ont développé une chambre de greffage, directement suturée au niveau d'une plaie sur des souris immunodéficientes. Cette chambre permettait le dépôt localisé de fibroblastes et de kératinocytes provenant de chéloïdes sur la peau lésée⁴⁶³. Les fibroblastes et kératinocytes déposés semblaient alors se réorganiser de façon spontanée pour former un analogue cutané directement *in vivo*. Après 12 semaines, la peau reconstituée à partir des cellules pathologiques était plus épaisse que celle formée à partir des cellules saines, et la formation d'un réseau de collagène anarchique avait été constatée. En revanche, aucune invasion des cellules pathologique dans le tissu environnant n'a pu être décrite. Ce phénomène a été expliqué par les auteurs par l'absence de l'environnement caractéristique des chéloïdes, notamment le système immunitaire et les forces mécaniques⁴⁶³.

Dorothy Supp et ses collaborateurs ont développé en 2012 des substituts cutanés composés de fibroblastes et de kératinocytes de chéloïdes, cultivés au sein d'une matrice de collagène bovin⁴⁴⁶. Après avoir démontré l'intérêt du modèle *in vitro*, les substituts ont été greffés dans des souris immunodéficientes. Le modèle composé de cellules pathologiques a alors montré une épaisseur plus importante, ainsi qu'une forte déposition de collagène de type I, contrairement au même modèle composé de cellules saines. Une organisation anarchique du collagène a également été relevée, en particulier dans les substituts composés de FC profonds ou superficiels. Après 4 semaines, la taille des substituts composés de cellules pathologiques avait augmenté, contrairement à ceux formés de cellules saines⁴⁴⁶.

Au fil des années, plusieurs modèles similaires ont été développés, tous basés sur la greffe de substituts cutanés formés d'une matrice et de fibroblastes et/ou kératinocytes provenant de chéloïdes. Allant du PLGA (*Poly Lactic-co-Glycolic Acid*)⁴⁶⁴, des glycosaminoglycanes⁴⁶⁵ jusqu'à un mélange de plasma, fibrine et thrombine³⁷⁰, de nombreux *scaffold* matriciels ont été utilisés dans le cadre de ces modèles d'ingénierie tissulaire. Malgré la diversité des supports, les études s'accordent sur la stabilité des modèles après greffe dans des souris immunodéficientes, qui s'étend de 126³⁷⁰ à 180 jours⁴⁶⁴. Comme montré en *Figure 14*, la taille⁴⁶⁴ et l'épaisseur³⁷⁰ des greffons composés de cellules pathologiques augmente dans les semaines suivant la greffe. La densité de collagène^{370,464} augmente également, et son organisation est décrite comme anarchique, de façon similaire aux chéloïdes^{370,464}.

Lee et ses collaborateurs ont cependant montré que ce collagène n'était pas produit de façon exogène, mais provenait uniquement des cellules greffées³⁷⁰. Pour conclure, bien que les modèles *in vitro* et *in vivo* ayant été développés afin d'étudier les chéloïdes soient nombreux, aucun n'a pour l'instant été admis comme modèle de référence.

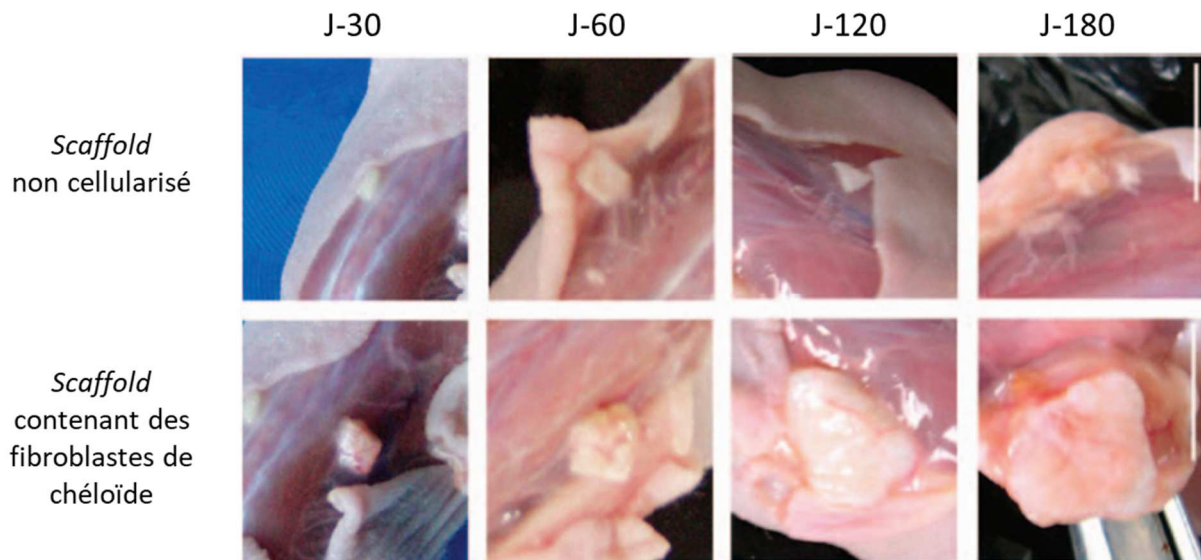


Figure 14 : Photographies illustrant l'évolution du modèle PLGA dans des souris athymiques

Des matrices de PLGA ont été cellularisées ou non par des fibroblastes de chéloïdes, et greffées dans des souris athymiques. Les photographies montrent l'évolution de la taille des greffons, qui augmente dans le cadre d'une cellularisation, contrairement aux greffons témoins.

Modifié de Wang et al, *Establishment of an animal model for human keloid scars using tissue engineering method*, Journal of Burn care and Research, 2013

PARTIE II

-

Objectifs des travaux de thèse

L'état de l'art à propos de la maladie chéloïdienne détaillé dans la partie précédente fait état d'une maladie complexe dont les mécanismes qui sous-tendent l'apparition et le développement sont encore aujourd'hui mal compris. Pour cette raison, peu de traitements réellement efficaces sont actuellement disponibles, faisant de la prise en charge de cette pathologie un besoin clinique non couvert.

Au cours des travaux de thèse présentés ci-après, nous avons souhaité contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la fibrogénèse chéloïdienne, dans le but de proposer de nouvelles approches thérapeutiques.

Ainsi, deux questions de recherche principales ont été menées en parallèle, l'une sur l'amélioration des outils *in vitro* d'investigation disponibles pour l'étude des chéloïdes, l'autre sur l'étude de l'axe inflammation-fibroblaste-fibrose. Nos travaux se sont donc focalisés sur les fibroblastes, en tant qu'effecteurs principaux du dépôt de matrice extracellulaire au cours de la fibrogénèse des chéloïdes.

Dans un premier temps, et grâce à l'étude d'une drogue anti-fibrotique (halofuginone), nous avons mis en place un panel de tests *in vitro* nous permettant d'évaluer le profil fibrogénique des fibroblastes chéloïdiens et d'adresser la question de leur régulation.

En parallèle, nous avons cherché à développer un nouveau modèle *in vitro* pour l'étude de la fibrogénèse chéloïdienne, basé sur la culture de fibroblastes en 3 dimensions sous forme de sphéroïdes.

Enfin, la partie majeure des travaux présentés ci-après a consisté en l'étude du rôle du système immunitaire dans la pathologie. Nous avons en effet évalué l'impact de la polarisation des macrophages dans la régulation du phénotype fibroblastiques, faisant de ces cellules immunitaires un levier potentiel pour la prise en charge de la maladie chéloïde.

PARTIE III

-

Etudes expérimentales

1. Evaluation de l'effet anti-fibrotique de l'halofuginone sur les fibroblastes de chéloïde

Ce premier article a été publié en décembre 2020 dans *Biomedicine and Pharmacotherapy* et a permis de définir et valider les bases expérimentales des travaux de recherche que j'ai mis en œuvre tout au long de ma thèse. Nos cellules d'intérêt, les fibroblastes de chéloïde (FC), ont été obtenus via l'étude clinique « Scar Wars » (NCT03312166). Mené au Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, cet essai clinique vise à évaluer l'efficacité et la sécurité d'un dispositif médical compressif conçu pour prévenir la récurrence de la fibrose chéloïdienne après résection chirurgicale. Tous les patients inclus dans l'étude ont bénéficié d'une chirurgie au cours de laquelle nous avons collecté le tissu excisé (objectif secondaire de l'étude clinique). Ainsi, nous avons pu mettre en place une banque de tissus pathologiques dans le but d'en isoler les fibroblastes associés. Une fois nos cellules d'intérêt extraites et amplifiées, nous avons alors mis en place un banc expérimental nous permettant d'adresser l'effet d'une drogue anti-fibrotique, l'halofuginone sur le statut fibrogénique des FC.

Lors de mon arrivée au laboratoire, une partie des travaux avaient été engagés dans le cadre de la thèse d'exercice de Médecine du Dr Pierre Marty. J'ai alors pu collaborer à la finalisation du projet en contribuant à la réalisation et à l'analyse des expérimentations visant à quantifier l'activité collagénase des fibroblastes de chéloïde traités par l'halofuginone.

1.1. Rationnel de l'étude

Les fibroblastes, de par leur capacité de synthèse et de remodelage de la matrice extracellulaire, sont des acteurs majeurs dans le développement des chéloïdes. Comme démontré dans l'état de l'art de ce manuscrit, les fibroblastes de chéloïde présentent un phénotype d'avantage pro-fibrotiques en comparaison à leurs homologues sains. Ils expriment *in vitro* des quantités plus importantes d' α -SMA, ce qui leur confère une activité contractile plus élevée, synthétisent plus de matrice extracellulaire, et sont d'avantages sensibles à leur microenvironnement, notamment au TGF- β 1. Ce dernier, comme nous l'avons vu précédemment, est décrit comme la principale cytokine pro-fibrosante chez l'Homme, et est

incontestablement un des acteurs majeurs de l'activation des fibroblastes au cours de la formation des chéloïdes. Bien qu'il existe aujourd'hui de nombreux traitements pour lutter contre cette pathologie, très peu présentent des résultats satisfaisants et une efficacité suffisante pour être décrits comme traitement de référence, en dehors ou en complément de la résection chirurgicale. L'halofuginone (HF), un dérivé chimique de la fébrifugine isolée de la plante chinoise *Dichroa febrifuga*, est utilisée pour ses capacités anti-parasitaires⁴⁶⁶. Son potentiel anti-fibrotique avait néanmoins été suggéré dès les années 1990 dans le cadre du traitement de nombreuses maladies fibrotiques⁴⁶⁷⁻⁴⁷⁰. L'halofuginone serait en effet capable de prévenir l'activation myofibroblastique médiée par le TGF- β , en inhibant la phosphorylation de Smad3⁴⁷¹. En 2007, une étude italienne avait suggéré que l'HF pourrait posséder un potentiel effet thérapeutique dans le cadre du traitement des chéloïdes⁴⁷². Aucune preuve *in vitro* ou *in vivo* n'avait cependant été apportée.

Dans l'étude présentée ci-après, nous avons cherché à évaluer *in vitro* l'effet thérapeutique de l'HF en déterminant sa capacité à modifier le profil fibrogénique des fibroblastes de chéloïdes. Pour cela, nous avons d'abord réalisé un screening afin de déterminer une concentration de travail optimale. Ensuite, nous avons traité nos cellules cultivées en monocouche et dans un modèle 3D de gel de collagène, et avons évalué la réponse des FC en étudiant leur capacité de prolifération, de migration, d'activation myofibroblastique et de synthèse de matrice extracellulaire. Dans toutes nos expériences, le TGF- β 1 a été utilisé pour simuler l'environnement pro-fibrotique présent *in vivo* dans les chéloïdes.

Halofuginone regulates keloid fibroblast fibrotic response to TGF- β induction

MARTY Pierre^{1,2}, CHATELAIN Brice², LIHOREAU Thomas³, TISSOT Marion¹, DIRAND Zélie¹, HUMBERT Philippe¹, SENEZ Clémence¹, SECOMANDI Eleonora⁴, ISIDORO Ciro^{4*} and ROLIN Gwenaël^{1,3*}

¹ Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, RIGHT Interactions Greffon-Hôte-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, 25000 Besançon, France

² Service de Chirurgie Maxillo-faciale, Stomatologie et Odontologie Hospitalière, CHU Besançon, F25000 Besançon, France

³ INSERM CIC-1431, CHU Besançon, 25000 Besançon, France

⁴ Laboratory of Molecular Pathology, Department of Health Sciences, Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Novara, Italy

* Correspondence: Dr. Gwenaël ROLIN, PhD, Centre d'Investigation Clinique - Inserm CIC 1431- CHU de Besançon / Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, RIGHT Interactions Greffon-Hôte-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France : grolin@chu-besancon.fr and Professor Ciro ISIDORO, Department of Health Sciences, Università del Piemonte Orientale, Novara, Italy, E-mail: ciro.isidoro@med.uniupo.it

Abstract: Keloids are characterized by increased deposition of fibrous tissue in the skin and subcutaneous tissue following an abnormal wound healing process. Although keloid etiology is yet to be fully understood, fibroblasts are known to be key players in its development. Here we analyze the antifibrotic mechanisms of Halofuginone (HF), a drug reportedly able to inhibit the TGF- β 1-Smad3 pathway and to attenuate collagen synthesis, in an *in-vitro* keloid model using patient-derived Keloid Fibroblasts (KFs) isolated from fibrotic tissue collected during the “Scar Wars” clinical study (NCT NCT03312166). TGF- β 1 was used as a pro-fibrotic agent to stimulate fibroblasts response under HF treatment. The fibrotic related properties of KFs, including survival, migration, proliferation, myofibroblasts conversion, ECM synthesis and remodeling, were investigated in 2D and 3D cultures. HF at 50nM concentration impaired KFs proliferation, and decreased TGF- β 1-induced expression of α -SMA and type I procollagen production. HF treatment also reduced KFs migration, prevented matrix contraction and increased the metallo-proteases/inhibitors (MMP/TIMP) ratio. Overall, HF elicits an anti-fibrotic contrasting the TGF- β 1 stimulation of KFs, thus supporting its therapeutic use for keloid prevention and management.

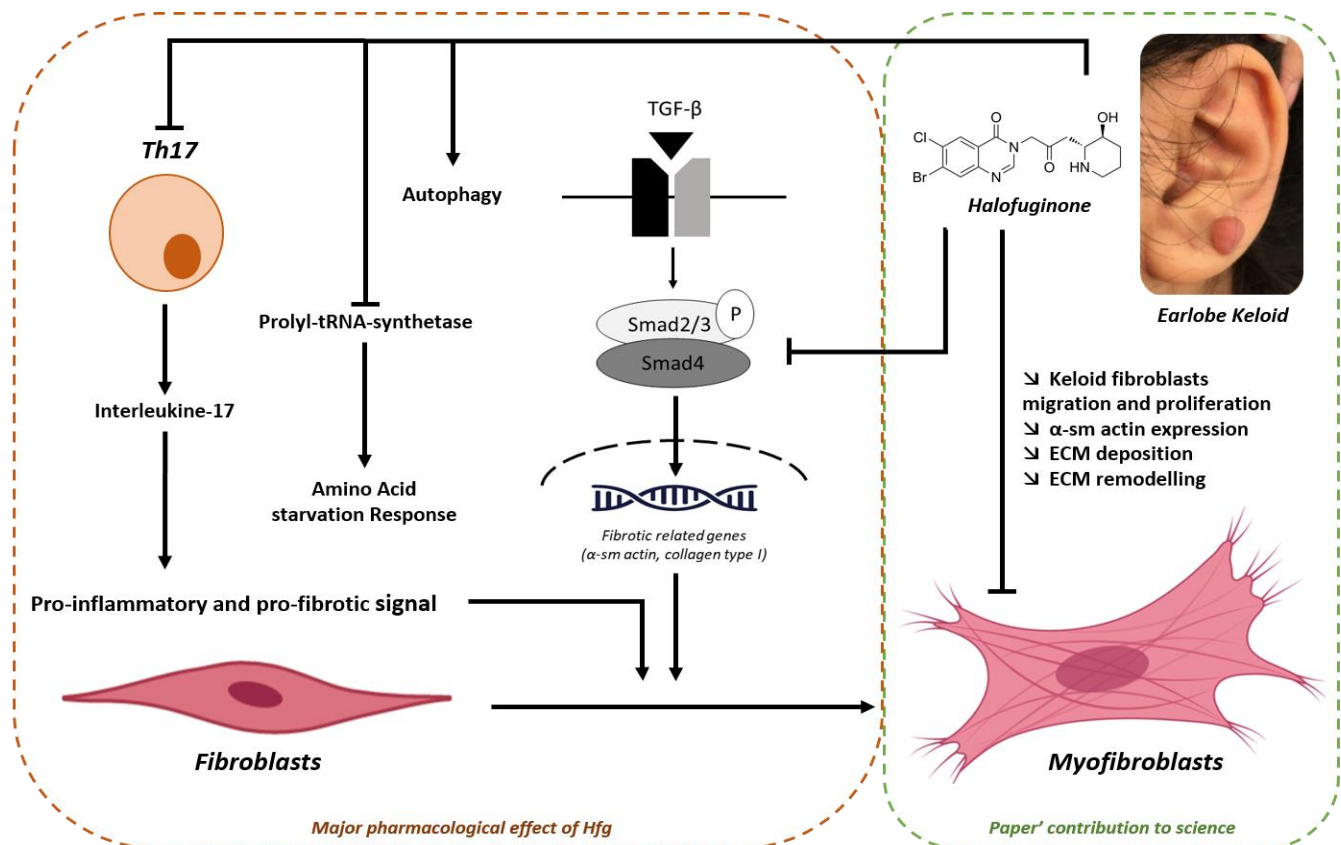
Keywords: Halofuginone, Keloid, Myofibroblasts, TGF- β , Fibrosis

Abbreviations: TGF- β 1, transforming growth factor β 1; ECM, extracellular matrix; SMADs, Mothers against decapentaplegic homolog; α -SMA, alpha-smooth muscle actin; MMP, matrix metalloproteinases ; TIMP, tissue inhibitors of metalloproteinases; HF, Halofuginone; KF, keloid fibroblast; AUC, Area Under the Curve.

Highlights

- TGF- β pathway is a target to interfere with fibroblast-mediated keloid progression
- No data about the effects of Halofuginone on keloids have been reported previously
- Halofuginone reduces all the fibrosis-related properties of keloid fibroblasts
- Halofuginone could be strongly considered as a new drug for keloid management

Graphical abstract



1. Introduction

Since 2018, World Health Organization defines keloids as a member of a group of disorders “characterized by increased deposition of fibrous tissue in the skin and subcutaneous tissue” [1]. Accordingly, keloids are considered not just pathological scars, rather the outcome of an abnormal wound healing process with features similar to that of chronic inflammatory diseases and cancer [2]. Clinically, keloids present as a fibrotic tissue that proliferates beyond the primary injured area and persist over time without natural regression. Keloids may cause pain and pruritus, and seriously affect patient quality of life when they are located in visible areas [3]. Keloids may result from different skin injuries, including surgery, burns, trauma, piercing, and folliculitis, though their location appears mainly confined to chest, shoulders, neck and ears [4].

Despite the ample variety of treatments available, which include occlusive dressing, compressive therapy, cryotherapy, radiation, laser, and pharmacotherapies with steroids, mitomycin C, 5-FU, bleomycin, no effective therapeutic protocols or standardized guidelines have been published yet [5]. Surgery is commonly indicated in order to reduce keloid volume, despite the high recurrence rate after excision and the development of a fibrosis worse than the initial one [6]. The lack of effective treatments clearly reflects our poor understanding of keloid pathogenesis, though keloid histopathology has been extensively described in the past decades [7]. The papillary-reticular distribution of dermal compartment is lost in keloid tissue, where the Extracellular Matrix (ECM) is mainly composed of randomly distributed thick collagen fibers. Compared to normal skin, the keloid fibrotic tissue shows an increased collagen type-I to type-III ratio along with other ECM-related components such as fibronectin, glycosaminoglycans and chondroitin sulfate [8]. However, keloid etiology and pathogenesis remain largely unknown. Recently, Limandjaja et al. [8] proposed that keloid could be triggered by a combination of three risk factors, the “keloid triad”, involving genetics, wound healing process and external factors [9], and in this scenario the fibroblast is a key player.

Keloid fibroblasts (KFs) are the central effectors of the “keloid triad” leading to the abnormal deposition of fibrous tissue. Quantitatively speaking, fibroblasts and myofibroblasts are more numerous in keloids than in non-pathological scars [10,11]. Compared to normal skin fibroblasts, KFs have an increased proliferation rate [12,13] and a reduced apoptosis rate [14,15]. Moreover, KFs are more responsive to growth factors activation (*i.e* by TGF- β 1 and PDGF) than their normal counterparts [16–18], and this leads to higher production of type I and III collagens (ratio I/III in keloid is 17:1 vs 5:1 in normal skin) and ECM accumulation [19]. During wound healing, ECM degradation and remodeling is controlled by a family of enzymes called matrix metalloproteinases (MMPs). MMPs are synthesized by fibroblasts and their activity is regulated by the tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMPs). Dysregulation of such MMP/TIMP equilibrium may underlie ECM over-accumulation. In keloid, the levels of MMP-1 and -13 (collagenase), MMP-2 (gelatinase) and TIMP-1 and -2 increase, whereas the level of MMP3 (stromelysin) decreases, compared to the respective levels in normal scars [19–21]. The TGF- β 1/Smad signaling pathway is pivotal in the process of keloid fibrosis. TGF- β 1 regulates fibroblast-to-myofibroblast conversion, α -SMA expression and collagen synthesis during the development of fibrosis. TGF- β 1 is found in higher quantity in keloid than in normal scar [22–24]. Accordingly, a variety of therapeutic strategies (drugs, siRNA, shRNA, miRNA, etc) have been designed to target the TGF- β /Smad signaling pathway in order to interfere with fibroblast-mediated keloid progression [25].

In the past years, Halofuginone [7-Bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidiny)]-2-oxopropyl]-4(3H)-quinazolinone] has been proposed as a new potential agent capable of contrasting tissue fibrogenesis [26]. Halofuginone (HF) is a chemical derivative of febrifugine originally isolated from the chinese plant *Dichroa febrifuga*. HF is widely used for its anti-coccidiosis and anti-parasitic properties in the poultry industry [27]. Additionally, HF has been reported to inhibit Smad3 phosphorylation downstream of the TGF- β 1 signaling pathway, impairing the fibroblasts-to-myofibroblasts phenoconversion and reduction of collagen synthesis and ECM accumulation [28]. In 2007, Lista and Emanuele [29] proposed HF as a new therapeutic option for keloid management, yet no mechanistic data in support of this hypothesis have been published to date.

The present study aims to fill this gap of knowledge by investigating *in vitro* the effects and mechanism of action of HF on keloid fibroblasts cultured in a pro-fibrotic environment. To this end, we

analyzed the key events and factors involved in the abnormal functioning of keloid fibroblasts within the profibrotic environment, including survival, migration, proliferation, myofibroblasts conversion, ECM synthesis and remodeling. We show that HF greatly attenuates the response of keloid fibroblasts to TGF- β stimulation. Our results support the clinical use of HF as a new therapeutic tool for keloid management.

2. Material and Method

2.1. Reagents

Phosphate Buffer Saline (P04-36500), Dulbecco Modified Eagle's Medium (P04-05540), Penicillin-Streptomycin (P06-07100), Trypsin-EDTA (P10-023100), NaHCO₃ (P04-49100) and Fetal Calf Serum (S1810-500) were purchased from Dutscher (Brumath, France); MMP1 Human ELISA Kit (EHMMP1) and MMP3 Human ELISA Kit (BMS2014-3) from Thermo Fisher Scientific (Villebon-sur-Yvette, France); Collagenase (Collagen degradation/zymography) assay kit (ab234624) and Human alpha SMA ELISA Kit (ab240678) from Abcam (Paris, France); Pierce solution (C2284 and B9643), Triton x100 (T8787), Goat serum (S26), Glycine (G7403), BSA (A3294), DAPI (D9542), anti- α -smooth actin mAb (A2547), anti-Mouse IgG (Fab specific) F(ab')₂ fragment-FITC antibody (F8521), Halofuginone (HF) hydrobromide (VETRANAL™, 32481), cell proliferation ELISA kit (11647229001), Protease inhibitor cocktail (P1860), MTT (M5655), DMSO (D4556), NaOH (1091372500), and p-Aminophenylmercuric Acetate (164610) from Sigma-aldrich (Saint Quentin Fallavier, France); Type I collagen (207050257) from Jacques Boy (Reims, France); Recombinant Human TGF-beta 1 Protein (ref 240-B-002) from R&D Systems Europe Ltd (Lille, France). Quanti-Blue™ kit and HEK-Blue™ TGF- β cells were purchased from Invivogen (Toulouse, France).

2.2. Clinical study approval

Keloid tissues were obtained from patients undergoing reductive plastic surgery (Table I) performed at Maxillo-Facial Surgery Department of the University Hospital of Besançon (France). All included-patients were informed and provided consent. The clinical study was conducted in compliance with the ethical standards, namely the Declaration of Helsinki. This work was ethically approved by the French Regulatory Agency (ANSM), Ethic committee (CPP Sud-Ouest et Outre-Mer I) and was registered on clinicaltrial.gov as "SCAR WARS" (NCT03312166). "SCAR WARS" is a monocentric and single group assignment clinical trial which is carried out on 27 patients with earlobe keloid.

Table 1 : Details of patient sample processed for cell extraction.

Inclusion number	Gender	Patient age	Keloid site
3	Female	59	Earlobe
5	Female	38	Earlobe
7	Male	21	Earlobe
8	Female	44	Earlobe
10	Male	37	Earlobe
16	Female	19	Earlobe
17	Female	54	Earlobe

2.3. Human primary keloid fibroblasts collection

Keloid tissues were processed for cell extraction immediately after surgery. Under laminar flow, biopsies (5 mm diameter) were harvested from the center of each keloid tissue. Then, biopsies were incubated with antibiotics (PS, 10 min, RT), washed three times in PBS (5 min, RT) and cut into smaller pieces (2mm x 2mm). Samples were then plated in 25 mm² tissue culture flasks (dermis side on plastic) and cultured in complete medium [DMEM supplemented with 10% FCS, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (0.1 mg/mL)] in cell culture incubator (37 C, 5% CO₂). Culture medium was changed every 3 days. After 7–10 days of culture, spindle-shaped fibroblasts began to proliferate from explants edges. When cells reached local confluence, fibroblasts were detached from culture flask with trypsin (0.05%) - EDTA (0.02%) solution and sub-cultured for cell expansion. Primary keloid fibroblasts (KF) used in this experimental study was extracted from seven patients (Table I). For further experiments, cells were used between the third and eighth passage.

2.4. Human keloid fibroblasts culture and treatment

During routine cell culture and cell seeding prior to treatment, KFs were cultured in complete medium [DMEM supplemented with 10% FCS, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (0.1 mg/mL)]. During treatment, low serum concentrated medium (5%) was used as drug vehicle. In further experimentation, FK were treated with HF (50nM), TGF-β1 (2ng/ml), a combination of HF and TGF-β1 (respectively 50nM and 2ng/ml) or vehicle alone (Ctrl). If necessary, other ways of treatment will be specified. Bioactivity of TGF-β1 (non-latent form) was verified using HEK-Blue™ TGF-β cells prior to investigation (data not shown). HEK-Blue™ TGF-β cells allow the detection of bioactive TGF-β by monitoring the activation of the TGF-β/Smad pathway.

2.5. Determination of suitable Halofuginone working concentration

2.5.1. Cytotoxicity

Viability of KFs was determined by MTT assay. KFs were seeded into 96 wells culture plate (7.5.10³ cells per well) and treated during 24h with a range of HF concentrations (1-5-10-25-50-100-200-500-1000-10000 nM) vs vehicle. After treatment, MTT solution (final concentration: 2mg/ml) was added to each well and incubated 4h. Then, supernatant was discarded, cells were washed two times with PBS and formazan crystals were dissolved by adding 100 µl of DMSO. Absorbance at 490 nm was measured by a microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific). Raw data were obtained from independent experimentation performed with three different primary cell lines (n=10 per condition).

2.5.2. Cell cycle

Keloid fibroblasts were seeded into 12-well culture plate (2 10⁵ cells per well) and treated during 24h with a panel of HF concentration (10, 25, 50nM) vs vehicle. To analyze cell-cycle progression, cells were harvested and immobilized in 70% ethanol at 4°C for 12 h followed by washing with phosphate buffer solution (PBS). Then, cells were incubated in PBS 1X supplemented with RNase (0.32 µg/mL), propidium iodide (0.16 µg/mL). Cells were stored in a dark room until flux cytometry measurement (FC500 Beckman Coulter). Raw data were obtained from independent experimentation performed with three different primary cell lines (n=2 per condition).

2.5.3. Adhesion test

Keloid fibroblasts were seeded into 24-well culture plate (2.5×10^4 cells per well) into increasing halofuginone concentration (50-100-1000 nM) vs vehicle and incubated 6h. Then, culture medium and detached cells were discarded, the adherent cells were washed with PBS and subsequently trypsinized and counted. Raw data were obtained from independent experimentation performed with three different primary cell lines (n=3 per condition).

2.5.4. Cell growth

Keloid fibroblasts were seeded into 12-well culture plate (5×10^4 cells per well) and treated for increasing time with 50 nM HF or vehicle to determine the time-dependent effect of HF on KF growth. At day 3 post treatment, part of cells cultured with HF were then cultured into vehicle and vice versa. The other part was cultured into the same medium as at the beginning. Medium was changed every 3 days and cells were counted at day 3, 6 and 9. Raw data were obtained from independent experimentation performed with three different primary cell lines (n=3 per condition). The effect of HF combined with TGF- β 1 on KFs growth was also determined by cell counting. To this end, KF were seeded into 12-well culture plate (5×10^4 cells per well) and treated as described in 2.4 section. After 3 days, cells were collected by trypsination and viable cells were counted excluding the trypan blue-positive. Raw data were obtained from independent experimentation performed with three different primary cell lines (n=3 per condition).

2.6. Proliferation assay

Cell proliferation was assessed by BrDU incorporation during DNA synthesis. Keloid fibroblasts were seeded into 96 wells culture plate (5×10^3 cells per well) and treated as described in 2.4 section. Cell proliferation ELISA kit was used according to the manufacturer's instruction. Absorbance at 450 nm was measured by a microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific). Raw data were obtained from independent experimentation performed with three different primary cell lines (n=10 per condition).

2.7. Scratch wound assay

Keloid fibroblasts were seeded into IncuCyte[®] ImageLock 96-well culture plate (2×10^4 cells per well) in complete medium. After overnight adhesion, both confluence status and homogenous cell covering were checked prior to wounding. WoundMaker[™] device (Essen BioScience) was used to create standardized scratches into 96-well plate. After wounding, medium was aspirated; each well was washed twice with PBS and refilled with treatment or vehicle (100 μ l). Plates were incubated in IncuCyte S3[™] and automatically photographed in bright field every 2 hours for 72 hours. After a preliminary visualization of the resulting images, three typical wells were chosen for setting automatic analysis parameters as proposed by the manufacturer. Relative wound density at each time point was analyzed using the IncuCyte[™] Scratch Wound Cell Migration Software Module (Essen BioScience). Raw data were obtained from independent experimentation performed with three different primary cell lines (n=10 per condition).

2.8. ECM synthesis and remodeling protein

2.8.1. ELISA assay

Keloid fibroblasts were seeded into 6 wells culture plate (0.5×10^6 cells per well) and treated as described in 2.4 section during 48h. Supernatants were collected on ice in the presence of anti-proteinases (10%)

and frozen at -80°C until use. The protein quantity of Type-I Procollagen, MMP1, TIMP1 and MMP3 was measured in the supernatant by ELISA assays according to manufacturer instruction. Data obtained from ELISA assays were normalized to total cell protein. In brief, after supernatant collection, cells were washed twice with PBS and NaOH (0.1N, 500 μl per well) was added. Cell lysate were collected on ice and stocked at -80°C until total protein assay. Pierce BCA reaction assay was used to quantify total protein concentration. Briefly, 20 μl of each cell lysate was mixed to 200 μL Pierce solution (Copper II sulfate solution/bicinchonic acid, 1:50) and incubated 30 min at 37°C . Absorbance at 571 nm was measured by a microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific). BSA standard was used to determine protein quantity in cell lysate. Results were expressed as a ratio of control condition. Raw data were obtained from independent experimentation performed with three different primary cell lines (n=3 per condition).

2.8.2. Collagenase activity – Zymography assay

Keloid fibroblasts were seeded into 6 wells culture plate (0.5 10^6 cells per well) and treated as described in 2.4 section during 48h. After treatment, cell lysates were collected, inactive zymogen forms of collagenase were activated with 1mM p-aminophenylmercuric acetate (AMPA) and collagenase activity was determined using a collagenase zymography assay kit (ab234624) in accordance with manufacturer instruction. Collagenase activity was normalized by total protein concentration in cell lysate as described in 2.8.1. Results were expressed in U/mg and raw data were obtained from independent experimentation performed with three different primary cell lines (n=3 per condition).

2.8.3. Collagen gel retraction

ECM remodeling was assessed using free retracted collagen gel as previously described [12]. First, a specific medium was prepared [DMEM medium (0.8 X), FCS (9% v/v), NaOH (0.005 N), NaHCO_3 (0.3%), Penicillin (200 U/mL) and Streptomycin (0.2 mg/mL)] and kept chilled on ice. Then, acid-extracted type I collagen (0.6 mg/mL) and keloid fibroblast suspension (8.10^4 cell/mL) were added. 2.5 ml of the liquid gel mixture was dispensed into Petri dish (30 mm diameter) and incubated at 37°C for at least 1 h to allow for gel polymerization. Immediately after polymerization, gels were smoothly detached from plastic and treated as previously described. Petri dish were scanned daily and gel diameter were determined using Image J software [30]. Results about collagen gel retraction were expressed as a percentage of initial area. Raw data were obtained from independent experimentation performed with three different primary cell lines (n=4 per condition).

2.8.4. Myofibroblasts phenoconversion

Alpha-smooth muscle actin (α -SMA) was used as the main phenoconversion marker of fibroblast into myofibroblast. α -SMA was quantified by ELISA and ratio of α -SMA positive cells were determined after immunofluorescence staining. For ELISA assay, keloid fibroblasts were seeded into 6 wells culture plate ($0.3 \cdot 10^6$ cells per well) and treated as described in 2.4 section during 96h. After treatment, cell lysate were collected and α -SMA was quantified using α -SMA *in vitro* SimpleStep ELISA[®] kit (Abcam) according to manufacturer instruction. Data were normalized to total cell protein, as described in 2.8.1. Raw data were obtained from independent experimentation performed with three different primary cell lines (n=3 per condition).

For immunostaining, KFs ($0.3 \cdot 10^6$) were seeded into Petri dish (60 mm) containing 3 sterile glass coverslip and treated as described in 2.4 section during 96h. After treatment, cells were washed with

PBS and fixed in 4% PFA. Cell membranes were permeabilized with Triton x100 (0.1% in PBS) and subsequently washed with PBS. Cells were then incubated in 1% Glycine (10 min, RT), afterwards a blocking solution (2.7% BSA; sheep serum 10%; 1% Triton x100) was used to saturate nonspecific binding site. After saturation step, cells were incubated overnight in 1:200 mouse anti- α -sm actin mAb (A2547) at 4°C. The next day, following several subsequent washes, cells were incubated for 1 h at room temperature with Anti-Mouse IgG (Fab specific) F(ab')₂ fragment-FITC antibody (F88521). Nuclei were counterstained with DAPI for 15 min before microscopy. A negative control was obtained by omitting the primary antibody. Images were obtained using a confocal microscope (Zeiss LSM800). On each slide, pictures from five areas were randomly taken excluding the edges of the coverslip due to cells homogeneity issues. Total cells and α -SMA positive cells were counted from these pictures. Raw data were obtained from independent experimentation performed with three different primary cell lines (n=3 per condition).

2.9. Statistics

Results are expressed as mean \pm SD. Statistical analyses were performed using one-way or two-way analysis of variance followed by Tukey test for multiple comparisons. All analyses were performed using GraphPad Prism 7 software. Differences were considered as statistically significant * for $p < 0.05$; ** for $p < 0.01$; *** for $p < 0.001$.

3. Results

HF [50nM] is a suitable concentration to impair keloid fibroblasts proliferation. The effect of HF on cell morphology was also followed during treatment (Fig. 1A). Below 10^2 nM, keloid fibroblasts demonstrated a classical fibroblast-like morphology. Above 10^2 nM, increased cell granularity and cellular shrinkage were observed as well as detachment from culture surface. As shown in figure 1B, HF concentration from 0 to 10 nM did not trigger any modification in cell viability while HF at 25nM and 50nm has a moderate effect compared to control (respectively 86.3% and 75.1%). Highest concentrations (from 10^2 nM to 10^5) induced a significant and critically reduction of cell viability. 70% of viability was used as a threshold to choose the maximum dose tolerated by cells. Therefore, 50nM was selected as the treatment dose for subsequent experiments. In addition, we examined the cell-cycle profile of keloid fibroblasts treated 24h with HF at 0, 10, 25 and 50 nM (Figure 1C). HF treated fibroblasts showed the same cell-cycle profile as control. Moreover, during a short-term adhesion test, HF did not show any influence on KF adhesion properties (Figure 1D).

HF impairs KF proliferation in a persistent way. At day 3, the addition of HF [50 nM] in culture medium led to the decrease of KF proliferation rate in comparison to control, for which basal medium was used for the 6 next days (Figure 1D). KF proliferation slowed down but was not entirely suppressed, as shown by the positive slope of the proliferation curve. Conversely, after 3 days of treatment with HF [50nM], drug replacement by control medium was not able to fully restore the proliferation level as in control condition, even if cell quantity slightly increased compared to HF treated cells over time.

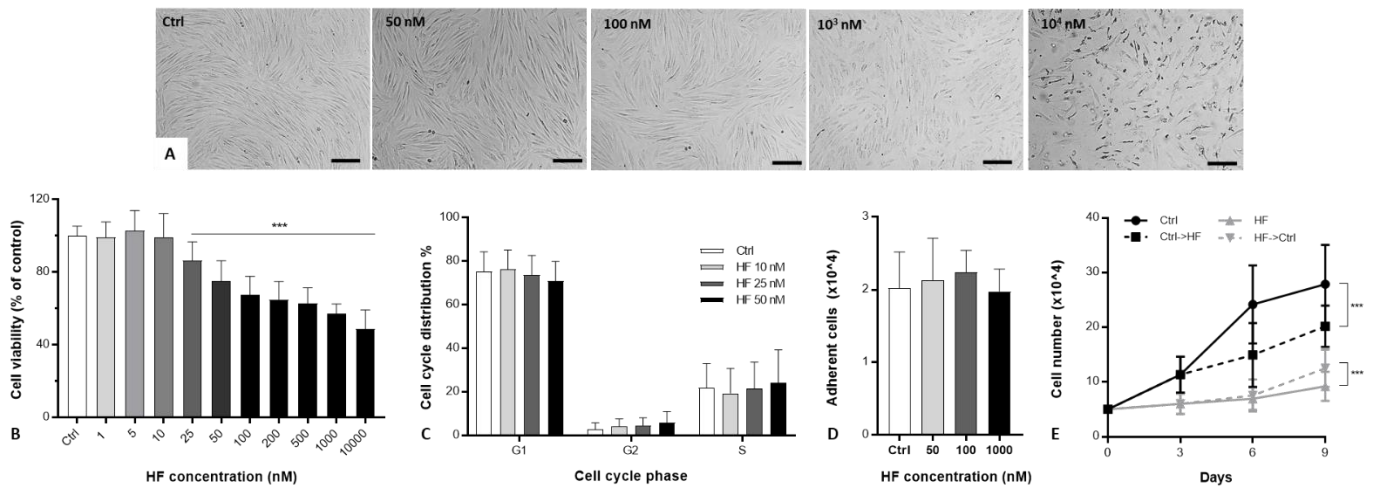


Figure 1: Halofuginone concentration screening and determination HF suitable working concentration (50 nM). (A) HF do not affect KF morphology at low concentration (scale bar = 200 μ m). (B) HF at 25nM and 50nM has a moderate effect compared to control (** $p < 0.001$). (C, D) At low concentration HF do not modify neither fibroblast cell cycle nor adhesion properties. (E) HF blocks KF proliferation (dot black line) compared to control (black line). This effect is maintained and persistent over time even after HF withdrawing (dot gray line), (** $p < 0.001$). Results are expressed as mean \pm SD. Statistical analyses were performed using one-way (B, C, D) or two-way analysis (E) of variance followed by Tukey test for multiple comparisons.

HF retains anti-proliferative properties in profibrotic culture condition. After 24h of treatment, BrdU incorporation assay showed that HF significantly blocked proliferation capacities of KF even in the presence of TGF- β 1 (Figure 2A). In terms of cell quantity, similar results were observed 3 days after treatment (Figure 2B). Cell number were significantly lower after HF treatment with or without TGF- β 1, compared to the respective controls. In both BrdU assay and cell counting experiments, TGF- β 1 showed no significant effects in short term incubation. However, while in control cultures fibroblasts showed a clear spindle-like shape and were parallel-oriented, in the presence of TGF- β 1 KF morphology and orientation were affected as shown in figure 2C.

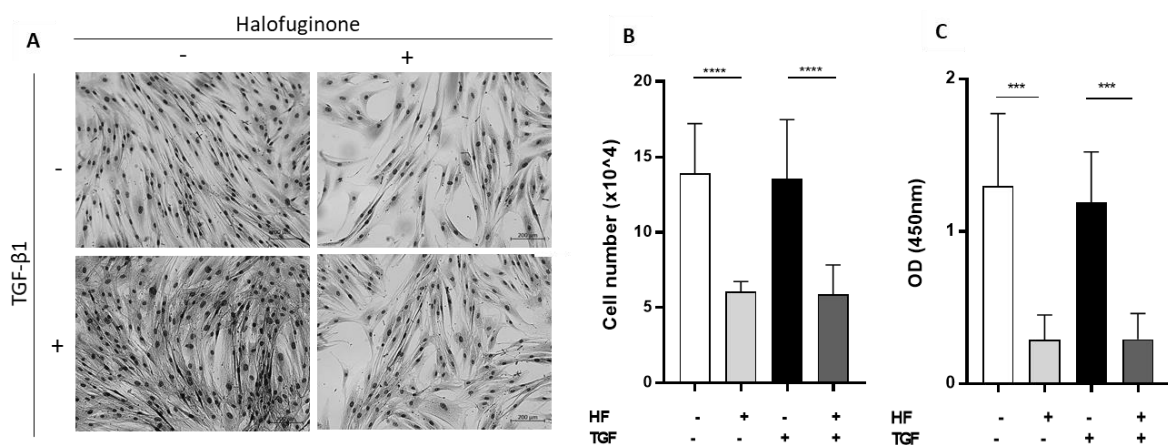


Figure 2: Effect of Halofuginone on keloid fibroblast proliferation in pro-fibrotic culture condition. (A, B) Scale bar = 200 μ m. TGF- β 1 treatment do not enhance short term cell proliferation. Cell number is statistically lower when HF is used in control or pro-fibrotic medium (**** $p < 0.0001$). (C) BrdU incorporation assay shows that HF significantly blocked proliferation capacities of KF with or with combination with TGF- β 1 (** $p < 0.001$). Results are expressed as mean \pm SD. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance followed by Tukey test for multiple comparisons.

HF limits FK migration over time. Real-time monitoring of KF wounded monolayers was used to investigate HF effect on KF migration. Figure 3A shows representative images obtained with Incucyte system over time according culture conditions. Software analysis led to the measurement of initial wound mask (blue area) and time-dependent wound area (yellow), both used for Relative Wound Density (RWD) calculation. Representative results of RWD evolution over time are presented in Figure 3B. Apparently, TGF- β 1 did not influence KF migration rate compared to control, yet HF shows a synergistic effect during the first 36 hours when combined with the pro-fibrotic growth factor. Overall, KF migration is reduced in the presence of HF in culture medium with and without TGF- β 1, compared to control. This global effect is shown in figure 3C and is also evidenced by the lower area under the curve (AUC) in HF treated cells (statistically significant).

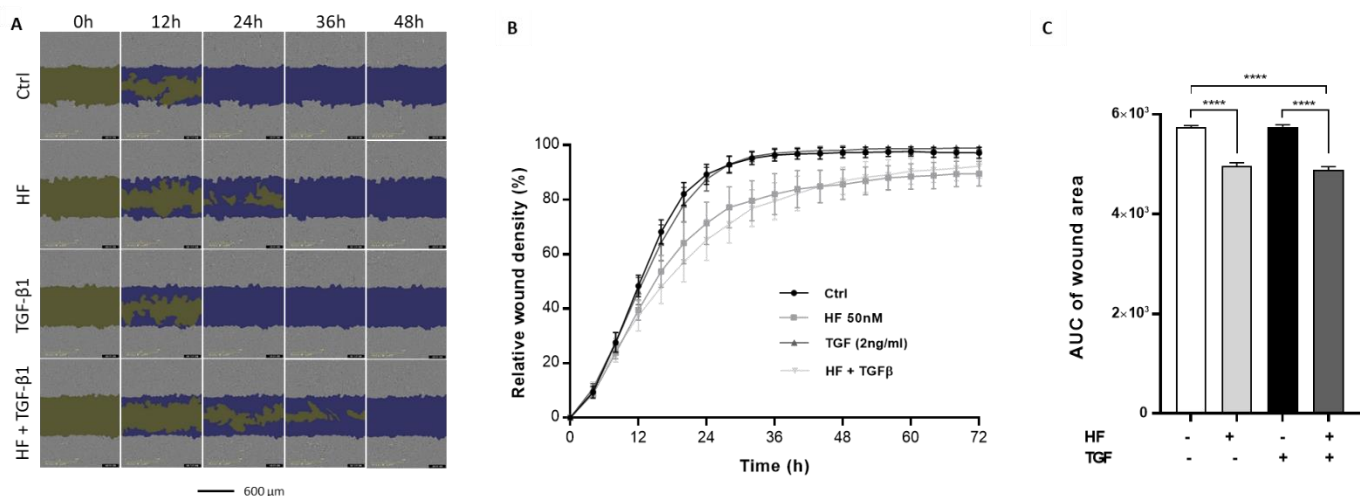


Figure 3: (A) Representative images of wounded monolayer over time. Initial wound (blue area) and wound at different time (yellow) are represented for each culture condition, Scale bar = 600 μ m). (B) Relative Wound Density (RWD) was calculated from picture using Incucyte 2019B rev 2 software. The graph is representative of result obtain with one of the three keloid fibroblast strain. (C) Area under the curve was determined from RWD for each cell strain. HF significantly limits KF migration compared to control and pro-fibrotic medium (**** $p < 0.0001$). Results are expressed as mean \pm SD. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance followed by Tukey test for multiple comparisons.

HF prevents TGF- β 1-induced myofibroblast phenoconversion and ECM remodelling. α -SMA was used as a phenoconversion marker of fibroblast into myofibroblast, both in immunostaining investigation (Figure 4A-B) and ELISA assay (Figure 4C). While TGF- β 1 treatment led to a 2-to-3-times higher number of α -SMA positive cells, HF could significantly bring back α -SMA expression to the basal level, in terms of either positive cells or protein quantity. During tridimensional collagen gel retraction assay (Figure 4D), HF reduced the mechanical contraction ability of KF. Over time, the retraction ratio (expressed as the percentage of initial gel area) of HF treated gel increased slowly compared to control. The presence of TGF- β 1 did not influence the retracting capacity of gel embedded KF.

HF downregulates procollagen type I synthesis without impacting overall collagenase activity. In TGF- β 1-stimulated keloid fibroblasts, procollagen type-I quantity significantly increased by 1.5 to 2-fold (Figure 5A), and this effect was completely nullified by HF. To be noted, HF *per se* did not modify the expression of procollagen type-I. MMP1 expression level (Figure 5B) was not modified either by HF or TGF- β 1 when drugs were added individually in KF culture. When HF was combined with TGF- β 1, MMP1 was significantly lower compared to control condition. MMP3 expression level (Figure 5C) significantly increased in TGF- β 1-stimulated KF culture, while it was not modified by HF. HF significantly

reduced MMP3 protein synthesis in pro-fibrotic culture condition. TIMP1 expression level (Figure 5D) was not modified by HF compared to control. The addition of TGF- β 1 to KF led to an increase of TIMP1 protein, and HF significantly blocked this induction and actually further reduced its expression at level lower than control. The effect of HF on collagenase activity is shown in figure 5E. Pro-fibrotic treatment with TGF- β 1 led to a slight but significant reduction of collagenase activity mediated by KFs, and the addition of HF had no impact on this activity nor it prevented the TGF- β 1 effect.

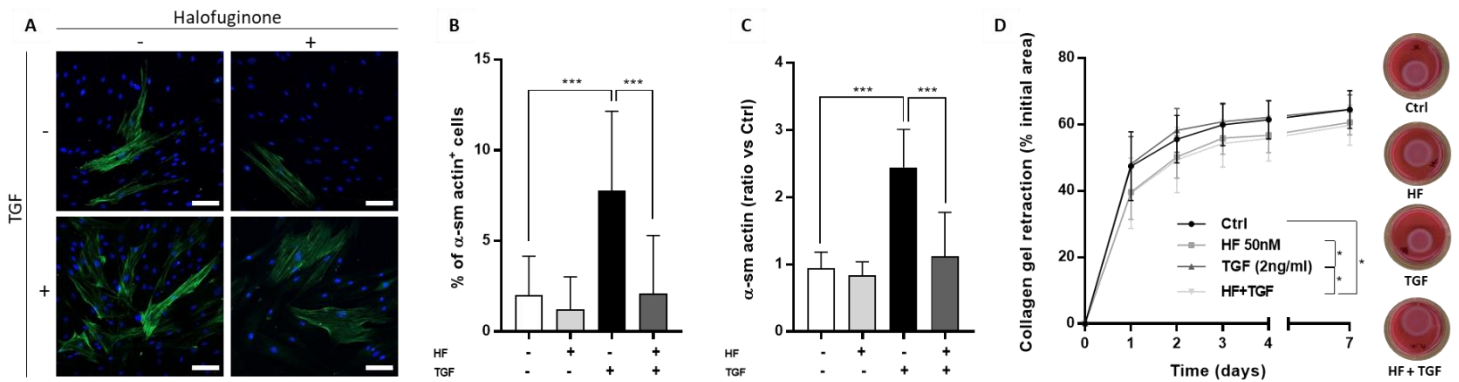


Figure 4: HF prevents myofibroblast phenocconversion from TGF- β 1 induction as well as ECM remodeling. (A, B) α -sm actin was stained in green and cell nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale Bar = 100 μ m). TGF- β 1 treatment led to a 2-to-3-time higher number of α -sm actin positive cells (** $p < 0.001$). HF was able to significantly bring cells back to a basal level of α -sm actin expression (** $p < 0.001$). (C) α -sm actin protein quantification confirmed that HF is able to reverse myofibroblasts activation induced by TGF- β 1 (** $p < 0.001$). (D, E) Collagen gel retraction assay was used to investigate the effect of HF on ECM mechanical remodeling over time. HF was also able to slow down mechanical contraction ability of KF. The retraction ratio of HF treated gel increased slowly compared to control or pro-fibrotic condition (* $p < 0.05$). Results are expressed as mean \pm SD. Statistical analyses were performed using one-way (B, C) or two-way (D) analysis of variance followed by Tukey test for multiple comparisons.

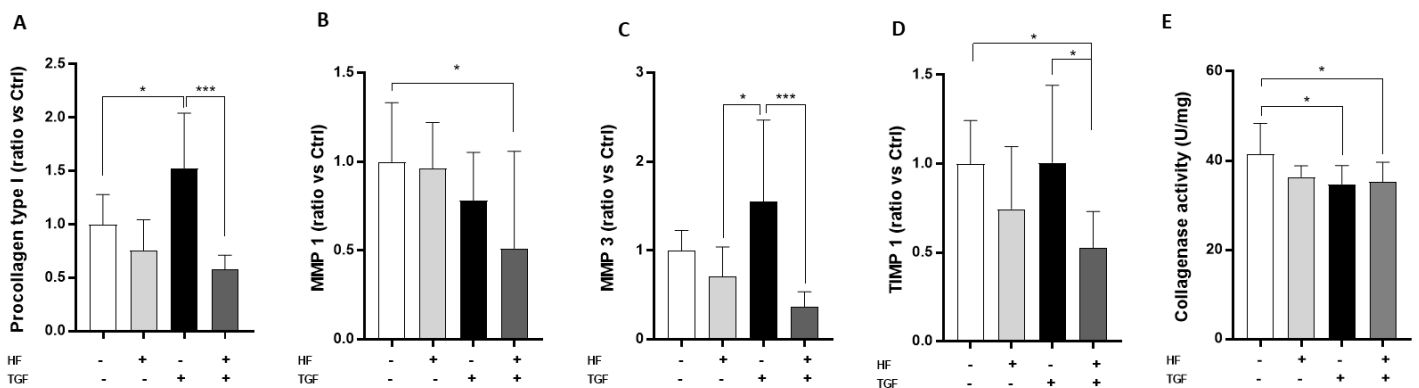


Figure 5 : Effect of HF on ECM deposition and degradation. (A) When HF was combined to TGF- β 1, Halofuginone was able to restore the basal level of synthesized procollagen type I, while HF only did not modify the protein expression level compared to control (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$). (B) HF decrease MMP1 protein expression in KF treated with TGF- β 1 (* $p < 0.05$). (C) MMP3 expression level significantly increased in TGF- β 1 induced KF culture. HF significantly reduced MMP3 protein synthesis in pro-fibrotic culture condition (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$). (D) TGF- β 1 induction increases TIMP1 protein synthesis by KF. HF significantly downregulates TIMP1 synthesis I (* $p < 0.05$). (E) TGF- β 1 lightly reduces collagenase activity in treated keloid fibroblasts whereas HF has no impact whatever the culture conditions. Results are expressed as mean \pm SD. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance followed by Tukey test for multiple comparisons.

4. Discussion

Keloid fibroblasts (KF) are the key effectors involved in fibrotic tissue production. In keloid tissue, TGF- β 1 is overexpressed and regulates fibroblast-to-myofibroblast conversion, α -SMA expression and ECM synthesis during wound healing and fibrosis progression [22–24]. Halofuginone (HF) has been shown to be a potent inhibitor of tissue fibrosis [25,26], and its effect have been already described on different type of pathological fibroblasts in cardiac fibrosis [31], rheumatoid arthritis [32], corneal fibrosis [33], Interstitial fibrosis [34], and scleroderma [35].

The present *in vitro* study aimed to investigate for the first time the anti-fibrotic effect and the underlying mechanisms of HF in patient-derived keloid fibroblast. First, we have determined that a low HF concentration [50 nM] was efficient to limit KF proliferation without any major cytotoxicity effect or cell cycle disruption. These results are in accordance with the literature where comparable effects were observed with low HF concentration from 10^{-7} to 10^{-10} M [35–37]. Our results also proved that HF effect was maintained in a persistent way. This latter observation has interesting clinical implication, since suggests the possibility to get a maximum drug effect while limiting the amount or frequency of drug application. Then, we focused on the effect of HF on KF properties involved in pathological wound healing and fibrosis (*i.e* proliferation and remodeling phases). Fibroblast migration and proliferation play a crucial role in pathological healing process by initiating the proliferative step of tissue repair. Fibroblast recruitment is regulated by a range of molecules involving numerous growth factors, cytokines and chemokines released by immune cells and fibroblasts during the inflammation step [38]. In a time-laps monolayer scratch assay, we showed that HF limits KF migration over time even in a pro-fibrotic environment of culture (mimicked by the presence of TGF- β 1), suggesting that HF could contribute *in vivo* to limit fibroblasts recruitment to the wound site and their over proliferation during keloid progression. Our results are consistent with those obtained by Zeng *et al.* [32] in the context of rheumatoid arthritis, where HF decreased F-actin expression and migration of synovocyte fibroblast. Myofibroblasts are the ultimate key cell for physiological tissue repair as well as in generating fibrotic tissue in pathological situation [39]. Here, we provide evidence that myofibroblasts phenoconversion by TGF- β 1 is prevented by HF. Same properties were previously described in corneal fibroblast by Nelson *et al.* [33] and Sheffer *et al* [40]. During remodeling, myofibroblasts play an important role in tissue contraction [41]. We observed that HF did not totally blocked fibroblasts-mediated ECM contraction, but it slightly decreased the intensity of this phenomenon. Our findings are in agreement with those published by Tacheau *et al.* [42] who showed that HF concentration below 100 nM could decrease the capacity of fibroblasts to contract collagen gel without affecting fibroblast cell cycle. This suggests that HF potentially contributes *in vivo* to reduce the high number of contractile myofibroblasts observed in keloid tissue [10,11]. As a result, from fibroblasts hyper-proliferation and myofibroblasts differentiation, ECM deposition is the tip of the “fibrosis” iceberg. Two major approaches could be considered to revert the pathological ECM deposition: either by reducing ECM proteins synthesis or by triggering their degradation. As expected, TGF β -1 promoted the synthesis of procollagen type I by keloid fibroblasts and the matrix accumulation. In agreement with previously published data [35–37], HF was able to reverse such TGF β -1 stimulation by bringing back type I procollagen synthesis to control level. In keloid, the ratio between MMPs (matrix metalloproteinases) and TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) is critically disrupted [19–21]. As much as MMPs/TIMPs are regulated by TGF β -1 [43], they could be targeted to restore the

right degradation/synthesis balance [44–46]. While TGF β -treated KF produced less MMP1 and HF treatment decreased the production of MMP3 and TIMP1, the zymography assay did not detect any changes in the overall collagenase activity.

In summary, our findings point that HF could contribute to keloid fibrosis resolution by restoring basal level of ECM deposition as well as by decreasing proliferation, migration and ECM protein synthesis of TGF β -activated myofibroblasts.

In the future, we wish to further decipher the molecular mechanisms underlying the anti-fibrotic potential of HF in keloid formation. Indeed, at the molecular level, numerous studies showed that the action of HF on TGF- β signaling is mediated by the inhibition of TGF β -dependent Smad3 phosphorylation, the elevation of the expression of the inhibitory Smad7 and by decreasing of TGF β II protein [47]. Besides, at the pharmacological, HF is a competitive inhibitor of the glutamyl-prolyl-tRNA-synthetase [48], that subsequently inhibits production of high proline content (*i.e* collagen) and triggers the AAR (Amino Acid starvation Response). Beyond AAR, HF is also proposed as a time-dependently inducers of autophagy [49], and this is another major pathway that likely plays a role in keloid fibroblast regulation. Finally, HF is also able to prevent the development of Th17 cells by the mechanism of AAR activation [50], leading to reduction of IL-17 production, a cytokine which promotes fibrosis by inducing inflammatory response and regulating the activation of fibroblasts. The mutual contribution to fibrosis by a ‘vicious circle’ between Th17 cells and keloid fibroblasts has been recently documented by Lee *et al.* [51]. Thus, the contribution of HF to counteract IL-17 effect on KF definitely should also be investigated. Finally, and because no strongly relevant animal models for keloid are available yet [52], further investigation should be done on 3D complex models such as spheroids [53]. In this way, we will be able to consider keloid *in vitro* as a chronic inflammatory disease sharing close similarity to cancer [2]. This approach will take into account the effect of cytokines and growth factors other than TGF β -1 only (*i.e* TNF- α , IL-1, -6, -10, -17...) [54,55], as well as the cell-cell interplay during fibrosis initiation (*i.e* KFs and macrophages).

5. Conclusion

Taken together, the present data indicate that Halofuginone has a strong potential to contribute to solve keloid disease issues. As an anti-fibrotic molecule, HF was able to regulate the fibrotic response induced by TGF- β 1 in keloid fibroblasts by reverting their myofibroblast phenotype from the dark side of the wound healing process. Our study can be considered as a first milestone leading to move Halofuginone forward from bench to bedside as a new tool for keloid disease management.

Acknowledgements

Authors are thankful to the UMR 1098 RIGHT ATI team for fruitful scientific debate and discussion. The team warmly thank all patients who enrolled in the ‘Scar Wars’ clinical study. A special thank is due to Alexandre Tetard from UMR 6249 team for his kind assistance during zymography assay.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding Sources

This work was supported by CHU Besançon, FRANCE [APICHU, 2017 - ID-RCB 2016-A01579-42]; Univ. Bourgogne Franche-Comté [Chrysalide 2019 – Projet émergent]; the Agence Nationale de la Recherche (ANR) under the program 'Investissements d'Avenir' [ANR-11-LABX-0021-LipSTIC]; the Région Bourgogne Franche-Comté.

References

- [1] ICD-11 - Mortality and Morbidity Statistics, (n.d.). <https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http%3a%2f%2fid.who.int%2fid%2fententy%2f831995767> (accessed May 26, 2020).
- [2] S. Tan, N. Khumalo, A. Bayat, Understanding Keloid Pathobiology From a Quasi-Neoplastic Perspective: Less of a Scar and More of a Chronic Inflammatory Disease With Cancer-Like Tendencies, *Front. Immunol.* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01810>.
- [3] P.D. Butler, M.T. Longaker, G.P. Yang, Current progress in keloid research and treatment, *J. Am. Coll. Surg.* 206 (2008) 731–741. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2007.12.001>.
- [4] R. Ogawa, Mechanobiology of scarring, *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 19 Suppl 1 (2011) s2-9. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2011.00707.x>.
- [5] U. Betarbet, T.W. Blalock, Keloids: A Review of Etiology, Prevention, and Treatment, *J. Clin. Aesthetic Dermatol.* 13 (2020) 33–43.
- [6] C. Siotos, A.C. Uzosike, H. Hong, S.M. Seal, G.D. Rosson, C.M. Cooney, D.S. Cooney, Keloid Excision and Adjuvant Treatments: A Network Meta-analysis, *Ann. Plast. Surg.* 83 (2019) 154–162. <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000001951>.
- [7] N. Jumper, R. Paus, A. Bayat, Functional histopathology of keloid disease, *Histol. Histopathol.* 30 (2015) 1033–1057. <https://doi.org/10.14670/HH-11-624>.
- [8] G.C. Limandjaja, F.B. Niessen, R.J. Scheper, S. Gibbs, The Keloid Disorder: Heterogeneity, Histopathology, Mechanisms and Models, *Front. Cell Dev. Biol.* 8 (2020). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00360>.
- [9] P.T. Agbenorkul, H. Kus, T. Myczkowski, The keloid triad hypothesis (KTH): a basis for keloid etiopathogenesis and clues for prevention, *Eur. J. Plast. Surg.* (1995). <https://doi.org/10.1007/BF00178546>.
- [10] K. Ueda, E. Furuya, Y. Yasuda, S. Oba, S. Tajima, Keloids have continuous high metabolic activity, *Plast. Reconstr. Surg.* 104 (1999) 694–698. <https://doi.org/10.1097/00006534-199909030-00012>.
- [11] H. Jiao, T. Zhang, J. Fan, R. Xiao, The Superficial Dermis May Initiate Keloid Formation: Histological Analysis of the Keloid Dermis at Different Depths, *Front. Physiol.* 8 (2017) 885. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00885>.
- [12] D. Suttho, S. Mankhetkorn, D. Binda, L. Pazart, P. Humbert, G. Rolin, 3D modeling of keloid scars in vitro by cell and tissue engineering, *Arch. Dermatol. Res.* 309 (2017) 55–62. <https://doi.org/10.1007/s00403-016-1703-2>.
- [13] C.-K. Shi, Y.-P. Zhao, P. Ge, G.-B. Huang, Therapeutic effect of interleukin-10 in keloid fibroblasts by suppression of TGF- β /Smad pathway, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 23 (2019) 9085–9092. https://doi.org/10.26355/eurrev_201910_19311.
- [14] F. Lu, J. Gao, R. Ogawa, H. Hyakusoku, C. Ou, Biological differences between fibroblasts derived from peripheral and central areas of keloid tissues, *Plast. Reconstr. Surg.* 120 (2007) 625–630. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000270293.93612.7b>.
- [15] Y. Zhou, Y. Sun, W. Hou, L. Ma, Y. Tao, D. Li, C. Xu, J. Bao, W. Fan, The JAK2/STAT3 pathway inhibitor, AG490, suppresses the abnormal behavior of keloid fibroblasts in vitro, *Int. J. Mol. Med.* 46 (2020) 191–200. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4592>.
- [16] M. Babu, R. Diegelmann, N. Oliver, Keloid fibroblasts exhibit an altered response to TGF-beta, *J. Invest. Dermatol.* 99 (1992) 650–655. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12668146>.
- [17] D.A. Bettinger, D.R. Yager, R.F. Diegelmann, I.K. Cohen, The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis, *Plast. Reconstr. Surg.* 98 (1996) 827–833. <https://doi.org/10.1097/00006534-199610000-00012>.
- [18] M. Haisa, H. Okochi, G.R. Grotendorst, Elevated levels of PDGF alpha receptors in keloid fibroblasts contribute to an enhanced response to PDGF, *J. Invest. Dermatol.* 103 (1994) 560–563. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12396856>.
- [19] M. Xue, C.J. Jackson, Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring, *Adv. Wound Care.* 4 (2015) 119–136. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0485>.

- [20] D. Ulrich, F. Ulrich, F. Unglaub, A. Piatkowski, N. Pallua, Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with different types of scars and keloids, *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 63 (2010) 1015–1021. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2009.04.021>.
- [21] M. Aoki, K. Miyake, R. Ogawa, T. Dohi, S. Akaishi, H. Hyakusoku, T. Shimada, siRNA Knockdown of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in Keloid Fibroblasts Leads to Degradation of Collagen Type I, *J. Invest. Dermatol.* 134 (2014) 818–826. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.396>.
- [22] A. Desmoulière, A. Geinoz, F. Gabbiani, G. Gabbiani, Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts, *J. Cell Biol.* 122 (1993) 103–111. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.1.103>.
- [23] J. Jagadeesan, A. Bayat, Transforming growth factor beta (TGFbeta) and keloid disease, *Int. J. Surg. Lond. Engl.* 5 (2007) 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijso.2006.04.007>.
- [24] J.M. Carthy, TGFβ signaling and the control of myofibroblast differentiation: Implications for chronic inflammatory disorders, *J. Cell. Physiol.* 233 (2018) 98–106. <https://doi.org/10.1002/jcp.25879>.
- [25] T. Zhang, X.-F. Wang, Z.-C. Wang, D. Lou, Q.-Q. Fang, Y.-Y. Hu, W.-Y. Zhao, L.-Y. Zhang, L.-H. Wu, W.-Q. Tan, Current potential therapeutic strategies targeting the TGF-β/Smad signaling pathway to attenuate keloid and hypertrophic scar formation, *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 129 (2020) 110287. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110287>.
- [26] M. Pines, Halofuginone for fibrosis, regeneration and cancer in the gastrointestinal tract, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 14778–14786. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i40.14778>.
- [27] M. Pines, I. Spector, Halofuginone - the multifaceted molecule, *Mol. Basel Switz.* 20 (2015) 573–594. <https://doi.org/10.3390/molecules20010573>.
- [28] Y. Luo, X. Xie, D. Luo, Y. Wang, Y. Gao, The role of halofuginone in fibrosis: more to be explored?, *J. Leukoc. Biol.* 102 (2017) 1333–1345. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0417-148RR>.
- [29] S. Lista, E. Emanuele, Potential therapeutical effects of topical halofuginone hydrobromide in keloid management, *Med. Hypotheses.* 69 (2007) 707. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.01.009>.
- [30] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods.* 9 (2012) 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- [31] J. Wu, K.C.V. Subbaiah, L.H. Xie, F. Jiang, E.-S. Khor, D. Mickelsen, J.R. Myers, W.H.W. Tang, P. Yao, Glutamyl-Prolyl-tRNA Synthetase Regulates Proline-Rich Pro-Fibrotic Protein Synthesis During Cardiac Fibrosis, *Circ. Res.* 127 (2020) 827–846. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315999>.
- [32] S. Zeng, K. Wang, M. Huang, Q. Qiu, Y. Xiao, M. Shi, Y. Zou, X. Yang, H. Xu, L. Liang, Halofuginone inhibits TNF-α-induced the migration and proliferation of fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients, *Int. Immunopharmacol.* 43 (2017) 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.12.016>.
- [33] E.F. Nelson, C.W. Huang, J.M. Ewel, A.A. Chang, C. Yuan, Halofuginone down-regulates Smad3 expression and inhibits the TGFbeta-induced expression of fibrotic markers in human corneal fibroblasts, *Mol. Vis.* 18 (2012) 479–487.
- [34] N. Haran, L. Leschinski, M. Pines, J. Rapoport, Inhibition of rat renal fibroblast proliferation by halofuginone, *Nephron Exp. Nephrol.* (2006). <https://doi.org/10.1159/000093674>.
- [35] O. Halevy, A. Nagler, F. Levi-Schaffer, O. Genina, M. Pines, Inhibition of collagen type I synthesis by skin fibroblasts of graft versus host disease and scl eroderma patients: effect of halofuginone, *Biochem. Pharmacol.* (1996). [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(96\)00427-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(96)00427-3).
- [36] A. Nagler, O. Gofrit, M. Ohana, D. Pode, O. Genina, M. Pines, The effect of halofuginone, an inhibitor of collagen type I synthesis, on urethral stricture formation: in vivo and in vitro study in a rat model, *J. Urol.* 164 (2000) 1776–1780.
- [37] T.L. McGaha, R.G. Phelps, H. Spiera, C. Bona, Halofuginone, an inhibitor of type-I collagen synthesis and skin sclerosis, blocks transforming-growth-factor-beta-mediated Smad3 activation in fibroblasts, *J. Invest. Dermatol.* 118 (2002) 461–470. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01690.x>.
- [38] S. Barrientos, O. Stojadinovic, M.S. Golinko, H. Brem, M. Tomic-Canic, Growth factors and cytokines in wound healing, *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 16 (2008) 585–601. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x>.
- [39] G. Gabbiani, G.B. Ryan, G. Majne, Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction, *Experientia.* 27 (1971) 549–550. <https://doi.org/10.1007/BF02147594>.
- [40] Y. Sheffer, O. Leon, J.H. Pinthus, A. Nagler, Y. Mor, O. Genin, M. Iluz, N. Kawada, K. Yoshizato, M. Pines, Inhibition of fibroblast to myofibroblast transition by halofuginone contributes to the chemotherapy-mediated antitumoral effect, *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 570–577. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0468>.
- [41] P.-J. Wipff, B. Hinz, Myofibroblasts work best under stress, *J. Bodyw. Mov. Ther.* 13 (2009) 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.jbmt.2008.04.031>.
- [42] C. Tacheau, L. Michel, D. Farge, A. Mauviel, F. Verrecchia, Involvement of ERK signaling in halofuginone-driven inhibition of fibroblast ability to contract collagen lattices, *Eur. J. Pharmacol.* 573 (2007) 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.07.030>.
- [43] M.-C. Hall, D.A. Young, J.G. Waters, A.D. Rowan, A. Chantry, D.R. Edwards, I.M. Clark, The Comparative Role of Activator Protein 1 and Smad Factors in the Regulation of Timp-1 and MMP-1 Gene Expression by Transforming Growth Factor-β1, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 10304–10313. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212334200>.

- [44] A. Page-McCaw, A.J. Ewald, Z. Werb, Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 221–233. <https://doi.org/10.1038/nrm2125>.
- [45] V. Arpino, M. Brock, S.E. Gill, The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis, *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 44–46 (2015) 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.03.005>.
- [46] T. Dohi, K. Miyake, M. Aoki, R. Ogawa, S. Akaishi, T. Shimada, T. Okada, H. Hyakusoku, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 Suppresses Collagen Synthesis in Cultured Keloid Fibroblasts, *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open.* 3 (2015) e520. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000000503>.
- [47] P. Juárez, P.G.J. Fournier, K.S. Mohammad, R.C. McKenna, H.W. Davis, X.H. Peng, M. Niewolna, A. Mauviel, J.M. Chirgwin, T.A. Guise, Halofuginone inhibits TGF- β /BMP signaling and in combination with zoledronic acid enhances inhibition of breast cancer bone metastasis, *Oncotarget.* 8 (2017) 86447–86462. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21200>.
- [48] T.L. Keller, D. Zocco, M.S. Sundrud, M. Hendrick, M. Edenius, J. Yum, Y.-J. Kim, H. Lee, J.F. Cortese, D. Wirth, J.D. Dignam, A. Rao, C.-Y. Yeo, R. Mazitschek, M. Whitman, Halofuginone and other febrifugine derivatives inhibit prolyl-tRNA synthetase, *Nat. Chem. Biol.* 8 (2012) 311–317. <https://doi.org/10.1038/nchembio.790>.
- [49] C. Follo, C. Vidoni, F. Morani, A. Ferraresi, C. Seca, C. Isidoro, Amino acid response by Halofuginone in Cancer cells triggers autophagy through proteasome degradation of mTOR, *Cell Commun. Signal. CCS.* 17 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0354-2>.
- [50] M.S. Sundrud, S.B. Koralov, M. Feuerer, D.P. Calado, A.E. Kozhaya, A. Rhule-Smith, R.E. Lefebvre, D. Unutmaz, R. Mazitschek, H. Waldner, M. Whitman, T. Keller, A. Rao, Halofuginone Inhibits TH17 Cell Differentiation by Activating the Amino Acid Starvation Response, *Science.* 324 (2009) 1334–1338. <https://doi.org/10.1126/science.1172638>.
- [51] S.-Y. Lee, E.K. Kim, H.B. Seo, J.W. Choi, J.H. Yoo, K.A. Jung, D.-S. Kim, S.C. Yang, S.J. Moon, J.H. Lee, M.-L. Cho, IL-17 Induced Stromal Cell-Derived Factor-1 and Profibrotic Factor in Keloid-Derived Skin Fibroblasts via the STAT3 Pathway, *Inflammation.* 43 (2020) 664–672. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-01148-1>.
- [52] D.M. Supp, Animal Models for Studies of Keloid Scarring, *Adv. Wound Care.* 8 (2019) 77–89. <https://doi.org/10.1089/wound.2018.0828>.
- [53] G. Granato, M.R. Ruocco, A. Iaccarino, S. Masone, G. Cali, A. Avagliano, V. Russo, C. Bellevicine, G. Di Spigna, G. Fiume, S. Montagnani, A. Arcucci, Generation and analysis of spheroids from human primary skin myofibroblasts: an experimental system to study myofibroblasts deactivation, *Cell Death Discov.* 3 (2017) 17038. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.38>.
- [54] Q. Zhang, T. Yamaza, A.P. Kelly, S. Shi, S. Wang, J. Brown, L. Wang, S.W. French, S. Shi, A.D. Le, Tumor-like stem cells derived from human keloid are governed by the inflammatory niche driven by IL-17/IL-6 axis, *PLoS One.* 4 (2009) e7798. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007798>.
- [55] X.-Y. Li, X.-J. Weng, X.-J. Li, X.-Y. Tian, TSG-6 Inhibits the Growth of Keloid Fibroblasts Via Mediating the TGF- β 1/Smad Signaling Pathway, *J. Investig. Surg. Off. J. Acad. Surg. Res.* (2020) 1–10. <https://doi.org/10.1080/08941939.2020.1716894>.
-

1.3. Conclusion de l'étude

Dans un premier temps, cette étude a permis de confirmer l'effet anti-fibrotique de l'HF dans le contexte des chéloïdes. En effet, même à des concentrations modérées, l'HF permet de limiter la prolifération et la migration des FC. Elle est aussi capable d'inhiber l'effet pro-fibrotique du TGF- β 1, en prévenant l'augmentation de synthèse d' α -SMA et de collagène de type I par les FC. Enfin, l'HF permet de diminuer l'activité contractile des FC, ainsi que leurs capacités de remodelage. L'ensemble des résultats obtenus dans cet article nous ont ainsi conduits à considérer l'intérêt thérapeutique de l'HF pour la prévention et la prise en charge des chéloïdes.

Dans le cadre de mes travaux de thèse, cette étude a servi de tremplin technique puisqu'elle nous a permis de mettre au point l'ensemble des expériences permettant d'investiguer de façon multiparamétrique le profil fibrogénique des fibroblastes de chéloïde.

La prolifération des cellules, leur migration, leur activation myofibroblastique et leur capacité à synthétiser et à remodeler la matrice ont ainsi été fixés comme paramètres principaux à étudier dans ce cadre. Au-delà d'un contrôle positif d'activation myofibroblastique, nous avons également poursuivi l'utilisation du TGF- β 1 pour simuler un environnement pro-fibrotique dans l'ensemble de nos expérimentations présentées dans les articles II et III ci-après.

Pour compléter notre arsenal de technique *in vitro* et proposer un nouveau modèle d'étude tridimensionnel du fibroblaste de chéloïde, nous avons émis l'hypothèse que cultiver nos FC sous forme de sphéroïdes nous permettrait de reproduire *in vitro* le profil quasi-néoplasique de la pathologie. Ainsi, nous avons donc posé la question de la pertinence de cultiver des sphéroïdes de fibroblastes chéloïdiens comme modèle fibrotique, plus proche de la maladie *in vivo*. L'article suivant est centré sur la réponse à cette question.

2. Les sphéroïdes sont-ils un modèle pertinent pour étudier la fibrogénèse dans les chéloïdes ?

2.1. Rationnel de l'étude

Comme nous l'avons vu en introduction de ce manuscrit, de nombreux modèles d'études *in vitro* et *in vivo* ont été mis au point durant les 30 dernières années afin de modéliser et d'étudier la maladie chéloïdienne¹⁶⁶. Cultures de fibroblastes de chéloïde en monocouche ou dans des gels de collagène ont été largement décrites et utilisées par de nombreuses équipes de recherche. Néanmoins, ces modèles classiques sont loin de récapituler dans l'espace et dans le temps toutes les interactions cellulaires et matricielles observées au cours de la mise en place de la fibrose chéloïdienne. En réponse à cette problématique, plusieurs équipes ont mis en place des modèles de culture d'explants, basés sur le maintien en survie *in vitro* de fragments tissulaires directement issus de chéloïdes. Ce type de modèles, utilisant directement le tissu provenant de l'*in vivo*, nécessite néanmoins d'avoir accès à des échantillons humains frais de façon fréquente, et ce dans un environnement réglementaire adapté.

Depuis quelques années, les sphéroïdes sont communément utilisés en recherche en cancérologie. Les sphéroïdes sont des structures cellulaires 3D formées spontanément *in vitro* à partir d'une suspension cellulaire dont l'adhérence à une surface est empêchée. Ce type de modèle cellulaire permet d'étudier les interactions cellules-cellules et cellules-matrice en mimant la structure d'organes ou de tissus pathologiques *in vitro*^{473,474}. Dans cette étude, nous avons cherché à transposer cette approche à notre thématique de travail et avons posé la question de la pertinence de cultiver des sphéroïdes de fibroblastes chéloïdiens comme modèle fibrotique *in vivo*. Dans l'article présentée ci-après, nous avons produit des sphéroïdes à partir de fibroblastes dermiques sains (FDS) ou issus de chéloïdes (FC). Pour chaque type de sphéroïdes, nous avons évalué le profil fibrogénique de nos cellules en adressant la différenciation myofibroblastique et la synthèse des protéines constitutives de la matrice. En parallèle, nous avons cultivé ces mêmes cellules en 2D sur nos supports de culture habituels, afin de pouvoir comparer le comportement de nos fibroblastes lors du changement d'échelle de nos cultures cellulaires (2D vs 3D). Comme indiqué précédemment, le TGF- β 1 a été utilisé pour simuler un environnement pro-fibrotique dans l'ensemble de nos expérimentations.

Is spheroid a relevant model to address fibrogenesis in keloid research?

DIRAND Zélie¹, TISSOT Marion¹, CHATELAIN Brice², VIENNET Céline¹, ROLIN Gwenaël^{3*}

¹ Université de Franche-Comté, Sciences Médicales et Pharmaceutiques, EFS, INSERM, UMR RIGHT, 25000 Besançon, France

² Service de Chirurgie Maxillo-Faciale, Stomatologie et Odontologie Hospitalière, CHU Besançon, 25000 Besançon, France

³ Université de Franche-Comté, Sciences Médicales et Pharmaceutiques, CHU Besançon, EFS, INSERM, UMR RIGHT, 25000 Besançon, France

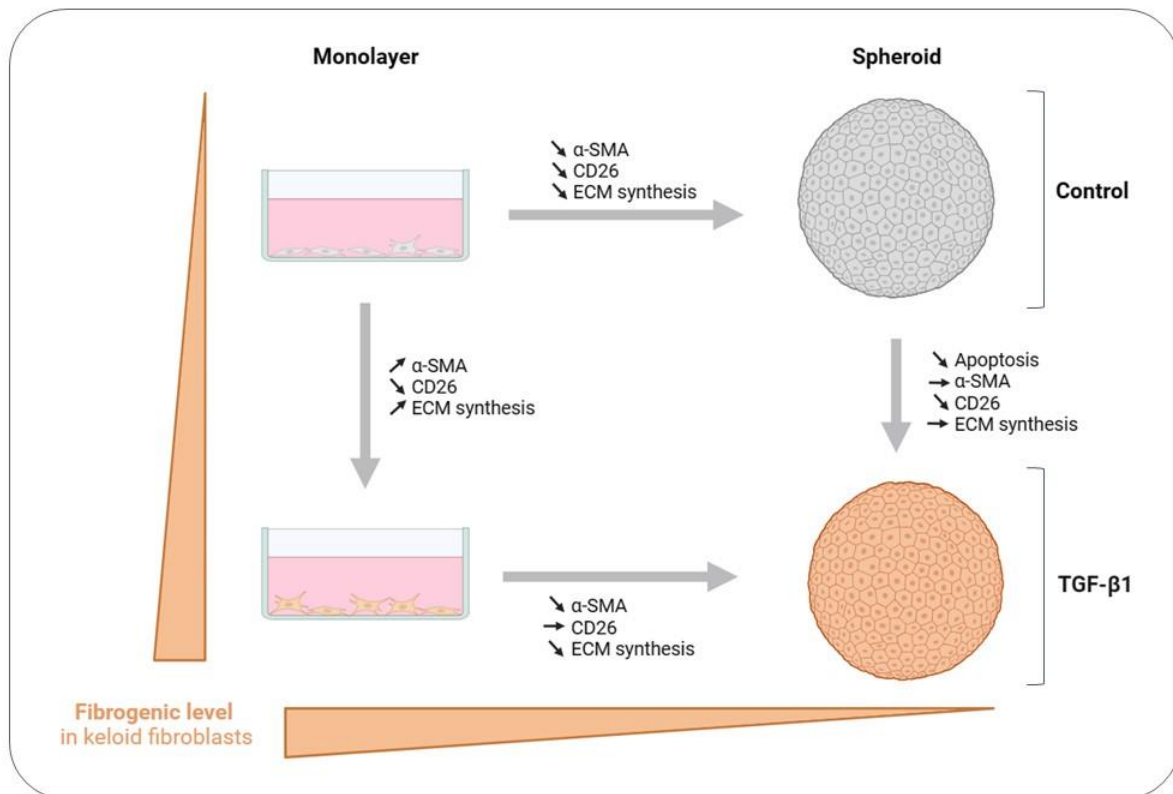
* Correspondence: gwenael.rolin@univ-fcomte.fr

Abstract: Keloid refers to a fibro-proliferative disorder characterized by an accumulation of extracellular matrix at the dermis level, overgrowing beyond the initial wound and forming tumor-like nodule areas. The absence of treatment for keloid is clearly related to limited knowledge about keloid etiology. *In vitro*, keloids were classically studied through fibroblasts monolayer culture, far from keloid *in vivo* complexity. Today, cell aggregates cultured as 3D spheroid have gained in popularity as new tools to mimic tissue *in vitro*. However, no previously published works on spheroids have specifically focused on keloids yet. Thus, we hypothesized that spheroids made of keloid fibroblasts (KFs) could be used to model fibrogenesis *in vitro*. Our objective was to qualify spheroids made from KFs and cultured in a basal or pro-fibrotic environment (+TGF- β 1). As major parameters for fibrogenesis assessment, we evaluated apoptosis, myofibroblast differentiation and response to TGF- β 1, extracellular matrix (ECM) synthesis, and ECM-related genes regulation in KFs spheroids. We surprisingly observed that fibrogenic features of KFs are strongly downregulated when cells are cultured in 3D. In conclusion, we believe that spheroid is not the most appropriate model to address fibrogenesis in keloid, but it constitutes an efficient model to study the deactivation of fibrotic cells.

Key words: Spheroid, keloid fibroblast, fibrosis, ECM, α -SMA, TGF- β 1

Abbreviations: TGF- β 1, transforming growth factor β 1; ECM, extracellular matrix; SMADs, Mothers against decapentaplegic homolog; α -SMA, alpha-smooth muscle actin; MMP, matrix metalloproteinases ; TIMP, tissue inhibitors of metalloproteinases; HF, Halofuginone; KF, keloid fibroblast; AUC, Area Under the Curve.

Graphical abstract



1. Introduction

Keloid refers to a fibro-proliferative disorder characterized by an accumulation of extracellular matrix (ECM) components at the dermis level, overgrowing beyond the initial wound and forming tumor-like nodule areas [1]. Whatever the trauma, keloids always start from skin lesions and are the consequence of a dysregulated healing process. Experts now consider keloids as a chronic inflammatory disease [2] that shares close similarities with cancer [3]. Clinically, keloids are benign; however, they seriously impair patients' quality of life, especially when they are located on the face and joints. Moreover, keloids can cause itching, pain, and discomfort in patients. Unfortunately, a treatment for keloids is yet to be uncovered [4], and the lack of an efficient therapy is clearly related to limited knowledge about keloid etiology, despite the increasing number of publications on the subject.

Molecular mechanisms in keloids still need to be deciphered. This challenge remains difficult because of the lack of relevant animal models to efficiently address keloid fibrogenesis [5]. However, various models have been developed to study keloid disease, including *in silico*, *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* models, as reviewed by Lebeko et al. [6]. All these tools became essential in keloid research in order to explore keloid fibroblast biology, screen anti-fibrotic drugs [7], and discover new biomarkers [8].

Whatever the experimental model, numerous research were carried out through the prism of fibroblast as the major effector of ECM deposition [9]. In keloids, fibroblasts are present in high numbers compared to normal tissues [10]. Keloid fibroblasts (KFs) express higher rates of α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) [11] and collagen [12] than normal dermal fibroblasts (NDFs). KFs also have a higher proliferation rate [13] and are able to develop higher retraction forces [14,15]. In addition, KFs are more sensitive to their biological microenvironment, as they have more TGF- β (TGF β RI and TGF β RII, the two first sensors of TGF- β [16]) and PDGF receptors than NDFs [17–19]. KFs are more responsive to growth factors that upregulate myofibroblast differentiation and over-amplify collagen and ECM synthesis and deposition [20].

KFs cultured in 2D do not fully recapitulate the *in vivo* quasi-neoplastic profile, architecture, cell–cell, and cell-matrix interactions observed in keloid tissue. Recent data published from single-cell investigations [8,21] highlight the close communication network between fibroblasts, keloid-associated immune cells (i.e., macrophages and dendritic cells), and keloid-associated stem cells [22], which can all modulate fibrogenesis of KFs. Gathering all these cell types into the same *in vitro* model could be technically difficult.

In response to these limitations, researchers proposed several 3D models to propose an intermediate complexity between monolayers and keloid tissue; for example, KFs embedded in 3D collagen gels or dermo-epidermal reconstructed keloid. Closer to *in vivo*, keloid explants obtained from surgical procedures can also be maintained in culture and used as an *in vitro* platform for experimentation. In proper conditions, explants retain the main characteristics of fibrotic tissue (i.e., TGF- β 1 expression and collagen content) [23–25]. These models can also be customized thanks to the addition of cells, ECM, and biological factors around the sample in order to create an *in vivo*-like microenvironment [6]. However, the main limitation of this model is the required complex logistic to have frequent access to fresh tissue from surgery in the right regulatory environment.

Recently, spheroids have emerged as new tools for tissue engineering and cancer research to mimic organs or diseases as a replacement for animal models [26]. A spheroid is a 3D aggregate of cells which spontaneously forms when attachment to a substrate is prevented [27]. In spheroids, cells create cell–cell interaction and are able to generate their own ECM micro-environment similar to *in vivo* conditions. Spheroids are now widely used for treatment screening [27–29], namely in cancer research. Spheroids have also already been considered as a tool for research in cutaneous biology [30,31]. But to our knowledge, no previous works have specifically focused on keloid pathology yet. Thus, we hypothesized that spheroids made from keloid fibroblasts could be used to model fibrogenesis *in vitro*. Indeed, keloid fibroblasts are the main effectors of ECM deposition, and 2D KFs cell culture has been the main tool for understanding keloid physiopathology for a long time. However, monolayer cultures of KFs are very far from the *in vivo* reality and complexity of keloids.

The objective of our study was to qualify spheroids made from keloid fibroblasts (KFs) in comparison to normal dermal fibroblasts (NDFs). To this aim, we produced KFs and NDFs spheroids and cultured them in a basal or pro-fibrotic environment (with TGF- β 1). To fully characterize the 3D fate of our cells, we also classically cultured them in 2D as an ultimate control. As major parameters for fibrogenesis assessment in KFs, we evaluated apoptosis, fibroblast-to-myofibroblast differentiation (α -SMA and CD26 expression) and response to TGF- β 1, ECM synthesis, and ECM-related genes regulation. Regarding our results, we surprisingly highlighted that KFs are strongly inactivated when

cultured from 2D to 3D and that they lost their sensitivity to TGF- β 1 in spheroids. In consequence, α -SMA and collagen expression is reduced to basal level. In conclusion, we believe that while spheroid is not the expected relevant model to address fibrogenesis in keloids, it constitutes an efficient tool to study the deactivation of fibrotic cells and offers new perspectives for keloid research.

2. Material and Method

2.1. Clinical study approval

Keloid tissues were obtained from patients undergoing reductive plastic surgery performed at Maxillo-Facial Surgery Department of the University Hospital of Besançon (CHU de Besançon, France). All included patient provided informed consent and the study was conducted in accordance with the ethical standards, namely the Declaration of Helsinki. This work was ethically approved by the French Regulatory Agency (ANSM), ethic committee (CPP Sud-Ouest and Outre-Mer I) and was registered on clinicaltrials.gov as “SCAR WARS” (NCT03312166). Normal skin was obtained from abdominal dermolipectomy performed during routine surgical procedure and after informing the patient and obtaining their consent. Sex and age of donors are listed in Table 1.

Table 1 : Liste of keloid donors, sex, age and phototype.

Location	Sex	Age	Phototype
Earlobe	F	22	III
Earlobe	F	22	II
Earlobe	F	19	II
Earlobe	F	54	III

2.2. Human Normal Dermal (NDFs) and Keloid Fibroblasts (KFs) collection

Normal dermal fibroblasts (NDFs) and keloid fibroblasts (KFs) were, respectively, isolated from abdominal dermolipectomy and earlobe keloid. NDFs and KFs were isolated as previously described [7]. After outgrowth, KFs were subcultured in complete DMEM (5% FCS, 1% PS) and used between the third and eight passage for all experiments.

2.3. Monolayer and spheroid cultures

In 2D, NDFs and KFs were seeded at 2×10^5 cells/well in 12-well plates. For 3D spheroids formation, NDFs and KFs were seeded at 4.5×10^4 per well in Ultra Low Attachment (ULA) 96-well culture plates (MS-9096UZ Prime Surface[®] 3D culture, S-Bio,). During both 2D and 3D situation, cells were cultured in “control” condition (DMEMc) or in “TGF- β 1” condition (DMEMc + 10 ng/mL TGF β -1 [240-B-002, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA]). For both monolayers and spheroids, half of the medium was renewed after 4 days of culture, and cells were harvested for analysis after spheroid maturation period (7 days). The size of spheroids was monitored every 24 h for 7 days using IncuCyteS3TM real-time microscope.

2.4. Histological and Immuno-Histological Characterization of Spheroids

Spheroids were collected after 7 days of culture, washed with PBS 1X, and fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). After fixation, spheroids were embedded in

TissueTek® O.C.T (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) and frozen at -80°C . HES staining was first used to characterize spheroid architecture. Moreover, $7\ \mu\text{m}$ spheroid sections from TissueTek® were washed in distilled water, and then incubated in Harris hematoxylin solution (3 min, RT). Sections were washed with tap water, incubated with eosin (1 min, RT), washed again with distilled water, and incubated in 1% acetic water. Sections were dehydrated in 100% ethanol (10 min, RT) before staining in saffron solution (5 min, RT). Sections were mounted between a glass slide and coverslip before microscopic imaging using Axioskop40 epifluorescence microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). For immunostaining, spheroid sections were manipulated as follows: $7\ \mu\text{m}$ spheroid slice were first permeabilized in 0.1% Triton X100. Then, blocking solution (PBS, 3% BSA, 10% sheep serum) was used to saturate aspecific binding sites. Appropriate dilutions of primary antibodies targeting αSMA (A2547, Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), CD26 (OTI11D7, OriGene, Rockville, MD, USA), and TGF β RII (PA5-35076, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were added on glass slides before incubation (overnight, 4°C in a wet chamber). Then, sections were incubated (1 h, RT) with appropriate secondary antibodies (F8521 and AP307R, Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Nuclei were counterstained with DAPI (15 min, RT). A negative control was obtained by omitting primary antibodies. Images were obtained using a LSM800 confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Fluorescence quantification was performed using ImageJ. Results are expressed as a relative fluorescence intensity (RFI). RFI was calculated as protein fluorescence (green) normalized by DAPI intensity (blue). Raw data were obtained from independent experimentation performed with three different primary cell lines of NDFs and three primary cells lines of KFs ($n = 3$ per cell line and condition). The fluorescence quantification was performed on at least 7 spheroids slides per culture conditions and per cell line.

2.5. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) assay

Spheroid sections were produced as described in Section 2.4, and TUNEL assay was performed using One-Step TUNNEL In Situ Apoptosis kit (Elabscience, Houston, TX, USA), following manufacturer's instructions. Briefly, cells were permeabilized with proteinase K solution (10 min, 37°C). Labeling solution containing TdT enzyme was then added on slides and incubated 1 h at 37°C . Then, nuclei were counterstained with DAPI, washed with PBS, and mounted between slide and coverslip. Stained samples were imaged with a LSM900 laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Positives cells (red) were counted using ImageJ, and results were expressed as a number of apoptotic cells per mm^2 . Raw data were obtained from independent experimentation performed with two different primary cell lines of NDFs and three primary cells lines of KFs ($n = 2$ per cell line and condition). The count of TUNEL positive cells was determined on a minimum of 7 spheroids per culture conditions and per cell line.

2.6. RT-qPCR

After treatment, cells from 2D and 3D cultures were harvested and lysed in RLT buffer supplemented with 4% dithiothreitol. RNA extraction was performed using RNeasy mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), and RNAs were reverse-transcribed using High capacity RNA to cDNA kit (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) according to manufacturer's instructions. Then, specific TaqMan probes from Thermo Fisher Scientific (TaqMan Gene Expression Assays-ACTA2: Hs00426835_g1, DPP4: Hs00897405_g1, TGF β RII: Hs00234253_m1, COL1A1: Hs00164004_m1, COL3A1: Hs00164103_m1 and FN1: Hs01549976_m1) were used for qPCR amplification. All samples were run in duplicate. A normalization of the RNA level was performed against the GAPDH gene. Data were analyzed using the

Δ CT technique [32] and are represented as a relative expression compared to the monolayer control condition. Raw data were obtained from independent experimentation performed with three different primary cell lines of NDFs and three primary cells lines of KFs ($n = 1$ per cell line and condition).

2.7. α -Smooth muscle actin and fibronectin quantification

After 7 days, concentration of α -SMA and fibronectin in 2D and 3D culture were quantified using Human α -SMA ELISA (ab240678, Abcam, Cambridge, United Kingdom) and Human fibronectin ELISA (ab219046, Abcam, Cambridge, United Kingdom) according to manufacturer instructions. Data were normalized to the number of total proteins in samples, which was determined using Pierce BCA reaction. Raw data were obtained from independent experimentation performed with three different primary cell lines of NDFs and KFs ($n = 3$ per cell line and condition).

2.8. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SD. Statistical analyses were performed using two-way analysis of variance (ANOVA). All analyses were performed using GraphPad Prism 9 software. Differences were considered as statistically significant * for $p < 0.05$; ** for $p < 0.01$; *** for $p < 0.001$; **** for $p < 0.0001$.

3. Results

KFs and NDFs diameter equally evolve overtime independently from TGF- β 1 activation. The evolution of KFs and NDFs spheroids was followed over time, and their diameters were measured daily in each culture condition (Figure 1A). No difference was observed between KFs and NDFs neither in control nor in profibrotic condition (TGF- β 1). In each spheroid batch, we observed a large compaction phase during the first 12 hours (from 107 to $2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$), followed by the stabilization of the phenomenon until the third day. Then, spheroid diameter reached a plateau ($2.105 \mu\text{m}^2$) at the end of the follow-up period (7 days). Similarly, no differences were observed in spheroids' architecture, whatever the fibroblast origin or the culture condition, as shown by HES staining in Figure 1B.

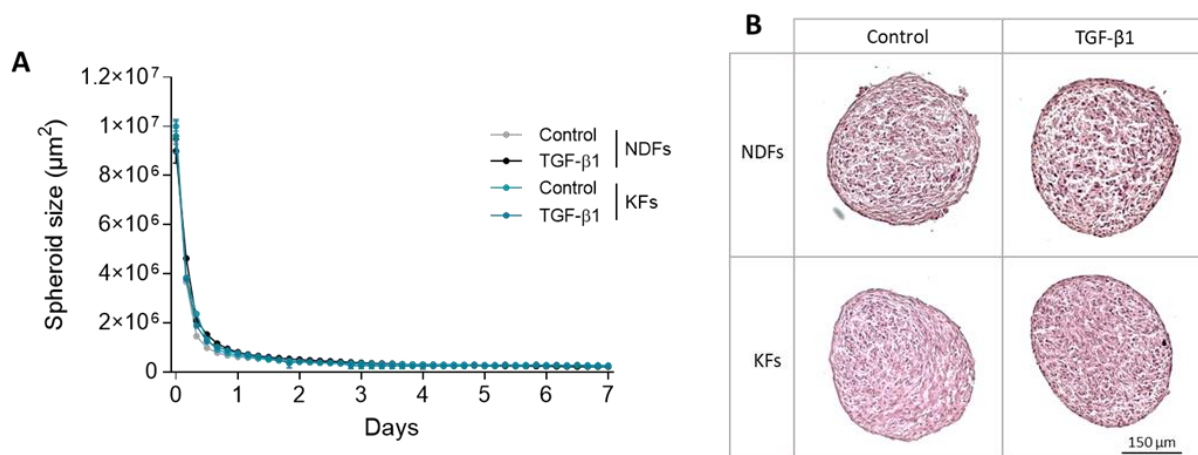


Figure 1 : KFs and NDFs area equally evolve over time independently from TGF- β 1 activation. To generate spheroids, NDFs or KFs were seeded in ULA culture plates +/- TGF- β 1. **(A)** Diameters were followed over time using IncuCyteS3 microscope. **(B)** After maturation (7 days), spheroids slices were stained with H&E for architecture study. Results are expressed as mean \pm SD. Statistical analyses were performed using two-way ANOVA ($n = 16$ spheroids per condition).

TGF- β 1 reduced apoptotic cells rate in KFs spheroids more than in NDFs ones. We performed a TUNEL assay to label apoptotic cells in spheroid section and assess cell viability in 3D structure after 7 days of maturation (Figure 2A). Apoptotic cells (red) were counted from picture series and cell number per surface unit was quantified and presented in (Figure 2B). Results show that the number of cells undergoing apoptosis are over numbered in NDFs compared to KFs spheroids cultured in control conditions. Interestingly, in both NDFs and KFs, TGF- β 1 reduces the quantity of apoptotic cells in 3D.

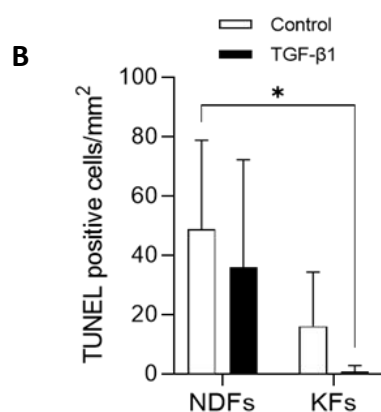
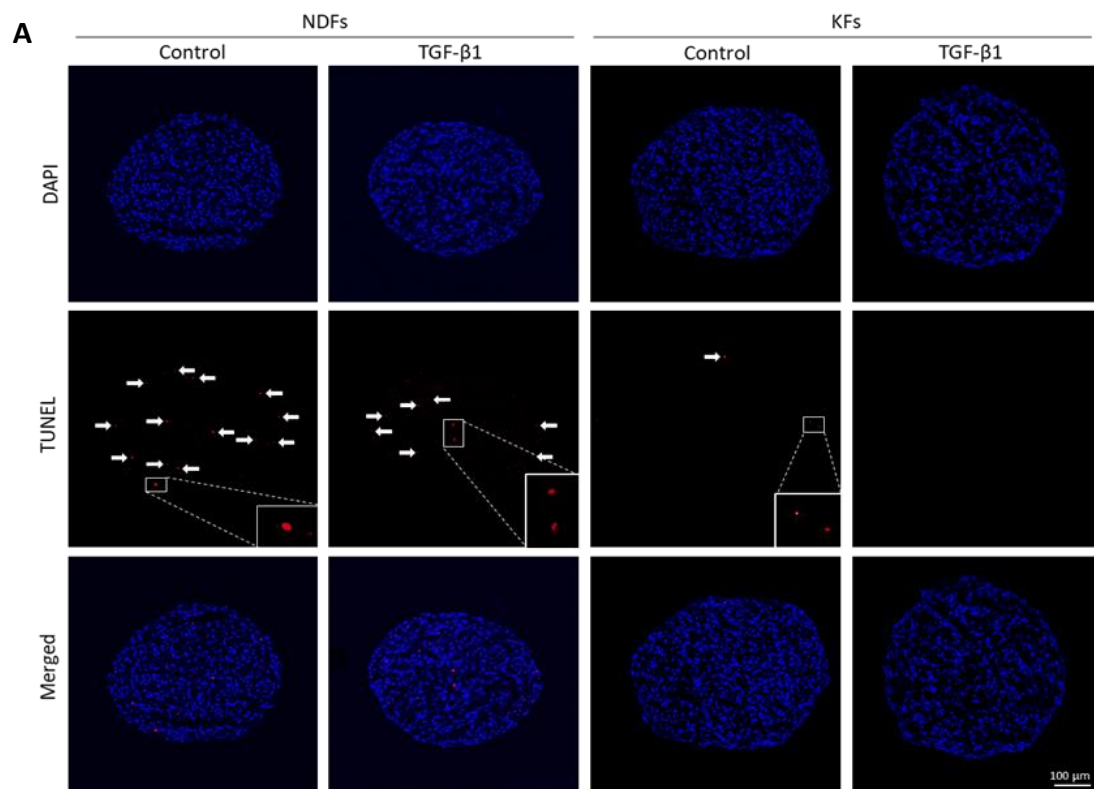


Figure 2 : TGF- β 1 reduced apoptotic cells rate in KFs spheroids more than in NDFs ones. **(A)** After 7 days, NDFs and KFs spheroids (either culture in control medium or with 10 ng/mL TGF- β 1) were prepared for TUNEL staining (7 μ m spheroid section). Images from confocal microscope show total nuclei in blue and those from apoptotic cells in red (highlighted by the white arrows). **(B)** TUNEL positive cells were counted on spheroid sections. Results are represented as a number of positive cells/mm². A minimum of five slides were used for each spheroid [$n = 4$ spheroid per condition]. Statistical analyses were performed using two-way ANOVA * for $p < 0.05$.

TGF- β 1-Induced α -SMA expression discontinues in KFs spheroids. α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) was investigated as the main marker of fibroblast-to-myfibroblast transition. We analyzed α -SMA regulation in KFs and NDFs cultured in 2D and 3D by RT-qPCR, ELISA, and immunostaining (Figure 3). First, we observed that α -SMA protein level was strongly increased in KFs monolayer in response to TGF- β 1 activation (6.34 μ g α -SMA/g total proteins vs. 44.70, *** $p = 0.0004$) compared to NDFs (4.78 vs. 6.45, $p > 0.9999$). These observations were also confirmed at the mRNA level (Figure 3B). Switching from 2D to 3D, the TGF- β 1 induction of α -SMA expression discontinued in KFs spheroids compared to monolayer culture. In spheroids, previous results were confirmed by immunofluorescence (Figure 3C,D), which showed that α -SMA expression is equivalent in spheroids, whatever the origin of fibroblasts (normal or keloid) and the nature of the treatment (control or TGF- β 1).

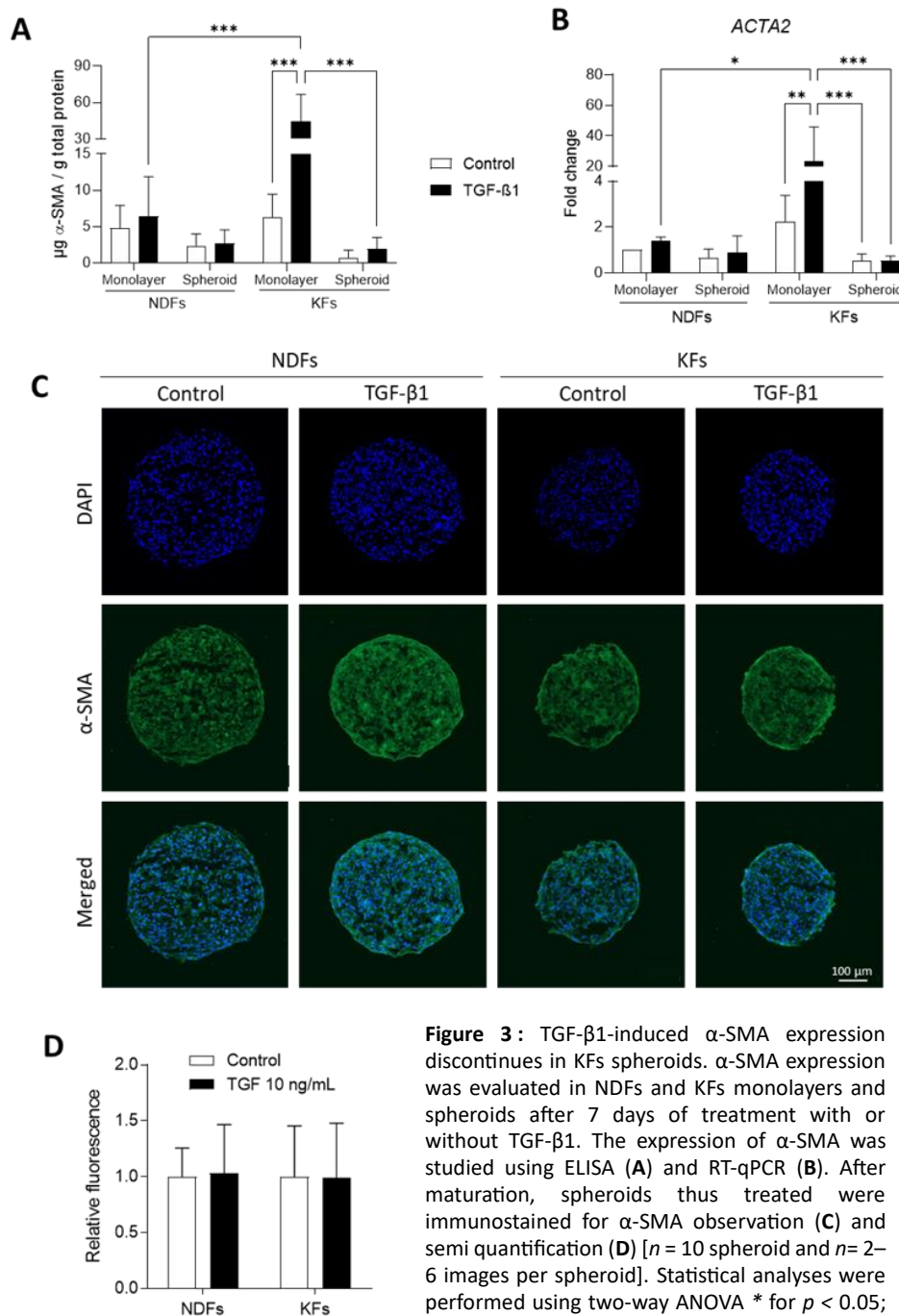


Figure 3: TGF- β 1-induced α -SMA expression discontinues in KFs spheroids. α -SMA expression was evaluated in NDFs and KFs monolayers and spheroids after 7 days of treatment with or without TGF- β 1. The expression of α -SMA was studied using ELISA (**A**) and RT-qPCR (**B**). After maturation, spheroids thus treated were immunostained for α -SMA observation (**C**) and semi quantification (**D**) [$n = 10$ spheroid and $n = 2-6$ images per spheroid]. Statistical analyses were performed using two-way ANOVA * for $p < 0.05$; ** for $p < 0.005$; *** for $p < 0.001$.

Three-dimensional culture and TGF- β 1 activation converge to downregulate CD26 and TGF β RII expression. To evaluate the fibrogenic level of fibroblasts and their capacity to respond to TGF- β 1 activation, we investigated mRNA (Figure 4A,B) and protein (Figure 4C,E) expressions of TGF β RII (TGF β RII) and DPP4 (CD26) in confluent monolayer or 3D spheroids. We observed that TGF β RII transcription was significantly more important in NDFs confluent monolayers than in KFs ones, in both non-fibrotic and fibrotic conditions (Figure 4A). Interestingly, moving from 2D to 3D culture leads to the decrease in TGF β RII transcription profile both in NDFs, in control or treated conditions. Figure 4B presents fold change in DPP4 expression that is not impacted by TGF- β 1 treatment or spheroids culture in NDFs. However, we showed that DPP4 mRNA expression is downregulated in KFs confluent monolayers compared to NDFs. Both in 2D and in 3D, this expression is even more restricted by TGF-

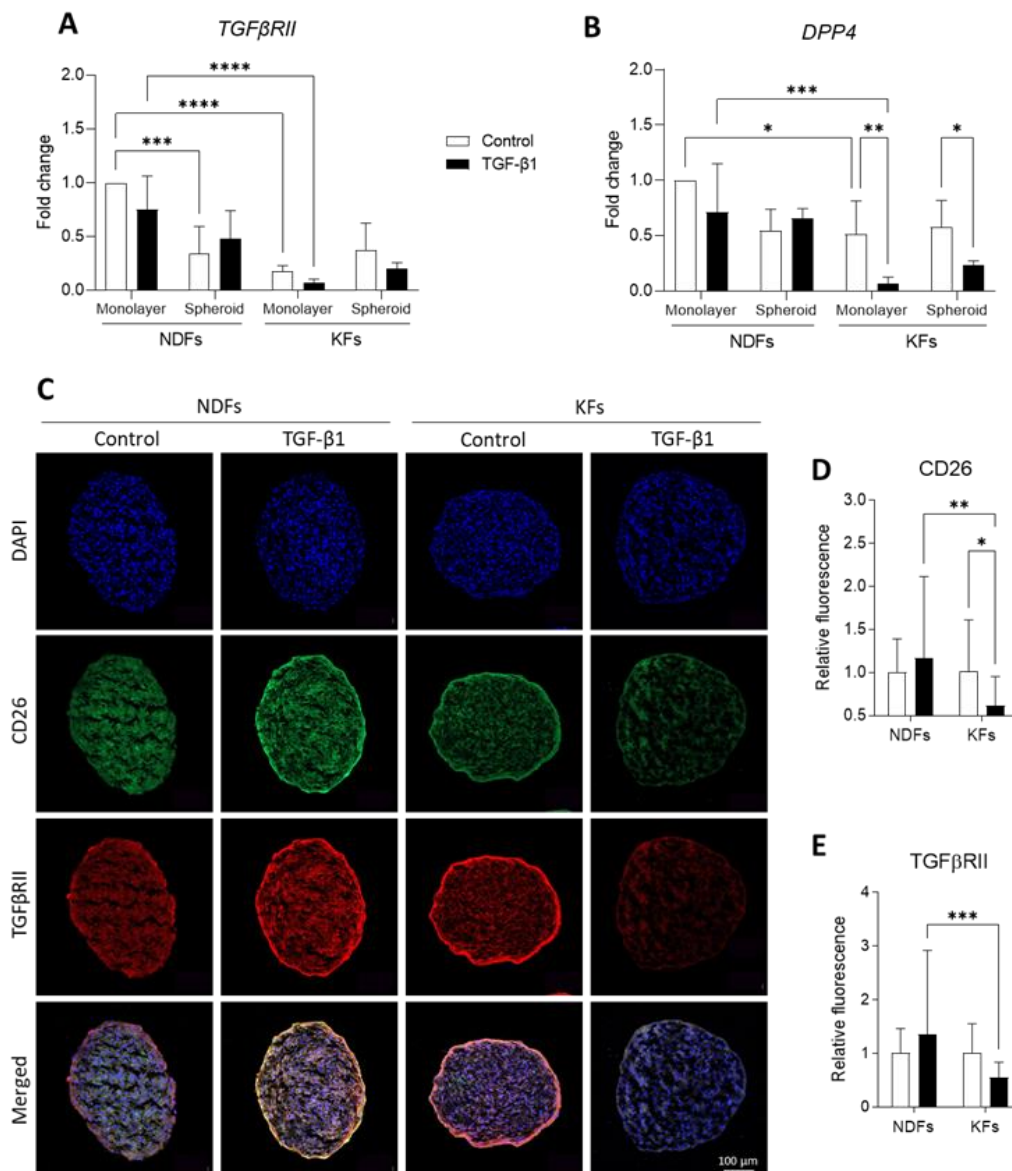


Figure 4 : Three-Dimensional culture and TGF- β 1 activation converge to downregulate CD26 and TGF β RII expression. TGF β RII (A) and DPP4 (B) mRNA synthesis were evaluated by RT-qPCR in monolayers and spheroids performed either with NDFs or KFs in the presence of TGF- β 1 vs. control [n = 4 per condition]. After 7 days of treatment, spheroids thus treated were immunostained for CD26 (green) and TGF β RII (red) observation (C) and semi quantification (D,E). Nuclei were counterstained with DAPI (Blue). [n = 10 spheroid and n= 2–6 images per spheroid]. Statistical analyses were performed using two-way ANOVA * for p < 0.05; ** for p < 0.005; *** for p < 0.001; **** for p < 0.0001.

β 1 treatment. Complementary results obtained by immunostaining in spheroids are presented in Figure 4C and related semi-quantification in Figure 4D,E. We can see that the quantity of CD26 (green) and TGF β RII (red) significantly decrease in TGF- β 1-treated KFs spheroids compared to control (0.62 vs. 1.01 for CD26, * $p = 0.0270$ and 0.55 vs. 1.00 for TGF β RII, $p = 0.1008$), while there is no impact of the culture conditions on NDFs regarding the expression of both proteins.

Overexpression of ECM related genes discontinues when KFs are cultured from 2D to 3D. At the protein level, fibronectin expression (Figure 5A) is upregulated by TGF- β 1 both in KFs and NDFs monolayers. In 3D, fibroblast sensitivity to TGF- β 1 remains in both cell lines. However, protein quantity decreases in KFs spheroid compared to 2D culture (0.035 vs. 0.219 in Control, $p = 0.9914$ and 0.312 vs. 1.434 in TGF- β 1, ** $p = 0.0037$). The same tendency was observed in NDFs spheroids compared to monolayers. The same tendencies were observed at mRNA level, as shown in Figure 5B. Our results showed that COL1A1 transcription is upregulated by TGF- β 1 in 2D both in NDFs and KFs. When cells are cultured in 3D, this effect is interrupted, as seen in Figure 5C. COL3A1 mRNA transcription was also upregulated by TGF- β 1 treatment in NDFs cultured either in monolayers or in 3D spheroids (Figure 5D). Surprisingly, we observed that culturing keloid fibroblasts in 3D leads to an 11-times increase in fold ratio (** $p = 0.0057$), and that TGF- β 1 effect is reversed compared to monolayer culture. We calculated COL1A1/COL3A1 ratio as a fibrogenesis marker in fibroblasts (Figure 5E). We showed that this ratio is strongly increased in KFs compared to NDFs in 2D culture (3.222 vs. 1.000 in Control, $p = 0.1092$). This upregulation is even higher in TGF- β 1-treated keloid fibroblasts (5.177 vs. 1.092 in TGF- β 1, *** $p = 0.0001$). However, COL1A1/COL3A1 is strongly reduced in KFs 3D culture compared to monolayers, in both control and treatment condition (0.320 vs. 3.222 in Control, *** $p = 0.0001$ and 1.023 vs. 5.177, **** $p < 0.0001$).

4. Discussion

Keloids are a fibro-proliferative skin disorder which can seriously affect a patient's quality of life. The lack of highly efficient treatment is strongly related to the absence of a reference model for the development of novel therapies. Nevertheless, as recently reviewed by Limandjaja et al. and Supp et al., numerous *in silico*, *in vivo*, and *in vitro* models have recently been proposed to investigate keloid [5,33]. Among them, full-skin equivalent or explant (also called organoids) are very useful tools as an *in vitro* platform for experimentations and anti-fibrotic drug screening [34–36]. However, these two models aim to reproduce or maintain keloid tissue *in vitro* and mimic an already established fibrotic tissue. Of course, explants retain the main characteristics of fibrotic tissue (i.e., TGF- β 1 expression and collagen content) [23–25], but they do not address dynamic evolution of keloid after wounding. In consequence, we hypothesized that spheroids made from keloid fibroblasts (KFs) could be relevant for fibrogenesis research. To this aim, we qualified spheroids made from keloid fibroblasts (KFs) and cultured in a pro-fibrotic micro-environment (TGF- β 1) in comparison to normal dermal fibroblasts (NDFs).

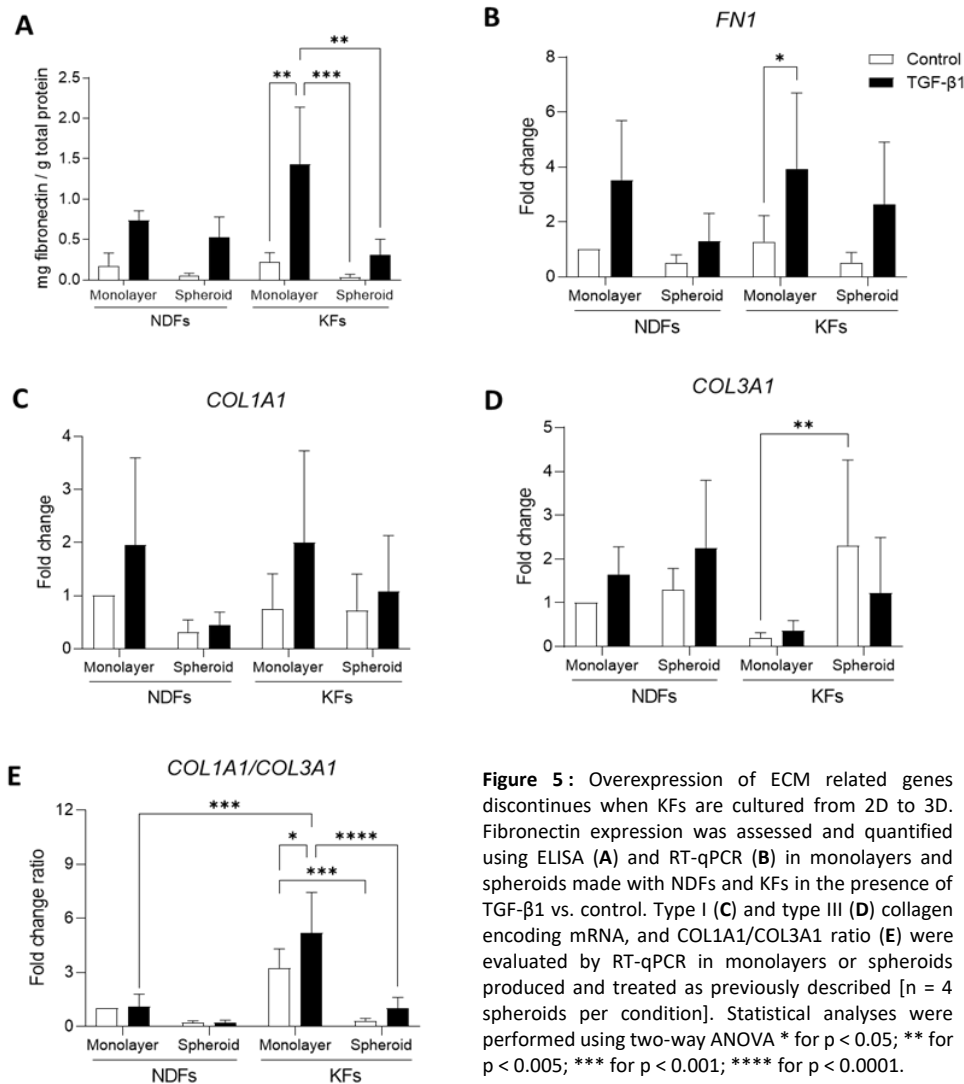


Figure 5: Overexpression of ECM related genes discontinues when KFs are cultured from 2D to 3D. Fibronectin expression was assessed and quantified using ELISA (A) and RT-qPCR (B) in monolayers and spheroids made with NDFs and KFs in the presence of TGF-β1 vs. control. Type I (C) and type III (D) collagen encoding mRNA, and COL1A1/COL3A1 ratio (E) were evaluated by RT-qPCR in monolayers or spheroids produced and treated as previously described [n = 4 spheroids per condition]. Statistical analyses were performed using two-way ANOVA * for p < 0.05; ** for p < 0.005; *** for p < 0.001; **** for p < 0.0001.

Cancer spheroids usually overgrow over time as a consequence of the pathological cell phenotype [37–39]. In our study, we did not observe such overgrowth, but we measured a decrease in the spheroid size during the culture period. While keloid is described as a pseudo-cancer pathology, keloid fibroblasts do not share pathological specificities with cancer cells leading to continuous overproliferation *in vitro*. Spheroid surface evolution was linked to self-contraction of the 3D construct, mediated by cell–cell interaction and contractile capacity [40], as previously shown in normal dermal fibroblasts by another team [31,41]. Our results showed that spheroid compaction was similar with NDFs and KFs either cultured in basal or profibrotic conditions. After spheroid maturation (plateau of contraction), NDFs showed a higher apoptosis rate in spheroids than KFs. In addition, TGF-β1 treatment decreased even more in both NDFs and KFs. These 3D observations are in accordance with *in vivo* and *in vitro* descriptions of the KFs refractory status to apoptosis compared to normal cells [13,42–44]. Such specificity can be related to autocrine TGF-β1 stimulation [43] and upregulation of the NF-κB pathway [42] in KFs. Due to spheroid architecture, we can also assume that hypoxia could modulate apoptosis in such 3D culture. Indeed, Lei et al. [45] previously mentioned that hypoxia could decrease apoptosis and mediate proliferation in KFs but not in NDFs. As hypoxia in KFs is also associated with an increase in collagen synthesis [46], the role of oxygen starvation on KFs in such specific 3D spheroids could further be addressed in our model.

Fibrogenic markers of fibroblasts were studied by measuring fibroblast-to-myofibroblast transition, ECM deposition, TGF β RII, and CD26 expression as well. CD26 has been lately proposed as a novel fibroblast activation marker [47,48]. Recent studies highlighted that CD26+ fibroblasts expressed higher collagen rate, fibronectin and TGF- β 1 compared to CD26- cells [47,49]. In association with FAP (Fibroblast Activation Protein), CD26 expression would mediate ECM synthesis toward the TGF- β /Smad pathway [48]. We compared mRNA levels and/or protein expression between 2D and 3D cultures treated with TGF- β 1 or not. In 2D, our results confirmed previous data showing that KFs are more sensitive to TGF- β 1 in 2D than NDFs, regarding α -SMA expression and ECM deposition [7,18,50]. TGF β RII and CD26 level expression were lower in KFs than in NDFs. Moreover, TGF- β 1 reinforced this effect. Our observation on TGF β RII confirmed those of Smith et al. [51]. Despite low TGF β RII expression, KFs remained highly sensitive in 2D to TGF- β 1 regarding α -SMA expression. Concerning CD26 (DPP4) expression, our results are in accordance with those of Chen et al. [52], who showed that keloid fibroblasts were DPP4 $_{low}$ /TGF β -1 $_{high}$ compared with DPP4 $_{high}$ /TGF β -1 $_{low}$ fibroblasts in normal skin tissue. In 3D spheroids, basal levels of α -SMA and fibronectin expression, as well as COL1A1/COL3A1 ratio, were decreased in KFs compared to monolayers. In our model, TGF- β 1-treated KFs lost their ability to differentiate into myofibroblasts. Our data converge to those of Granato et al. [31] and Kunz-Schughart et al. [53], who cultured NDFs in spheroid models and observed the same deactivation effect on normal cells. We strongly believe that this fibrogenic deactivation effect is connected with growing keloid fibroblasts as multicellular aggregates. Indeed, in our model, keloid fibroblasts do not have any surface to adhere to apart from each other. In spheroids, the mechanical component (high rigidity of plastic surface) found in 2D cultures has disappeared, while matrix stiffness is strongly mandatory for keloid fibroblast activation [11], independently of TGF- β 1.

Our first objective was to produce a spheroid model to explore fibrogenesis in keloid fibroblasts. Beyond our first expectations, we demonstrated that such a model is advantageous and an efficient tool to study the deactivation of fibrotic cells and offer new perspectives for keloid research. However, we identified some limitations that should be overcome in further studies. Particularly, we propose to replicate our investigation with pre-activated fibroblasts (with TGF- β 1) to see if the deactivation effect is still active on pre-differentiated cells. We also propose to follow spheroid behavior when KFs are co-cultured with immune cells (i.e., macrophages) in order to address cell-cell interaction in this context. Because our model lacks a surrounding matrix, we could also further study cell outgrowth and invasion in KFs spheroids surrounded by a specific ECM micro-environment (collagen, fibronectin, or Matrigel[®]).

5. Conclusion

At the beginning of our work, our first hypothesis was to succeed in producing a fibrotic model of keloids shaped as spheroids. Our study demonstrated that spheroids from human keloid fibroblasts can be generated and maintained in culture but trigger a deactivation effect of fibrotic cells. Fibrogenic features of KFs were strongly downregulated when cells were cultured in such 3D structures. Even if our spheroid is not the expected relevant model to address fibrogenesis upregulation, our work highlights new aspects of turnover in keloid cells. Keloid spheroids constitute an efficient tool for studying the deactivation of fibrotic cells and offer new perspectives for keloid research.

Author Contributions

Z.D., M.T., B.C., C.V. and G.R. Experiment realization: Z.D. and M.T.; formal analysis: Z.D.; writing—original draft preparation, Z.D. and G.R.; supervision: G.R. and C.V.; funding acquisition: G.R. and B.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research was funded by the Région Bourgogne Franche-Comté under the project Fibrolution [Envergure grant, CONV 2019-0059], by the CHU de Besançon under the project “Scar Wars” [APICHU, 2017-ID-RCB 2016-A01579-42], and the Agence National de la Recherche (ANR) under the project “S-Keloid” [ANR-21-CE45-0025-03].

Institutional Review Board Statement

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of the French Regulatory Agency (ANSM, code 2016-A01579-42) and ethic committee (CPP Sud-Ouest and Outre-Mer I, code 1-17-08).

Informed Consent Statement

Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. The clinical study was registered on clinicaltrial.gov as “SCAR WARS” (NCT03312166).

Data Availability Statement

The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments

Authors are thankful to the UMR 1098 RIGHT ATI team for fruitful scientific debate and discussion. The team warmly thanks all patients who enrolled in the ‘Scar Wars’ clinical study. We also thank DimaCell Imaging Platform (Université de Franche-Comté, UMR1098 RIGHT, 25000 Besançon, France) for technical support during Incucyte S3 and confocal microscopy experimentations.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO. ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics. Available online: <https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http%3a%2f%2fid.who.int%2f%2fid%2f%2f%2f831995767> (accessed on 27 July 2023).
2. Ogawa, R. Keloid and Hypertrophic Scars Are the Result of Chronic Inflammation in the Reticular Dermis. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 3. <https://doi.org/10.3390/ijms18030606>.
3. Tan, S.; Khumalo, N.; Bayat, A. Understanding Keloid Pathobiology from a Quasi-Neoplastic Perspective: Less of a Scar and More of a Chronic Inflammatory Disease with Cancer-Like Tendencies. *Front. Immunol.* 2019, 10, 1810. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01810>.
4. Betarbet, U.; Blalock, T.W. Keloids: A Review of Etiology, Prevention, and Treatment. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 2020, 13, 33–43.
5. Supp, D.M. Animal Models for Studies of Keloid Scarring. *Adv. Wound Care* 2019, 8, 77–89. <https://doi.org/10.1089/wound.2018.0828>.

6. Lebeko, M.; Khumalo, N.P.; Bayat, A. Multi-dimensional models for functional testing of keloid scars: In silico, in vitro, organoid, organotypic, ex vivo organ culture, and in vivo models. *Wound Repair Regen.* 2019, 27, 298–308. <https://doi.org/10.1111/wrr.12705>.
7. Marty, P.; Chatelain, B.; Lihoreau, T.; Tissot, M.; Dirand, Z.; Humbert, P.; Senez, C.; Secomandi, E.; Isidoro, C.; Rolin, G. Halofuginone regulates keloid fibroblast fibrotic response to TGF- β induction. *Biomed. Pharmacother.* 2021, 135, 111182. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111182>.
8. Feng, C.; Shan, M.; Xia, Y.; Zheng, Z.; He, K.; Wei, Y.; Song, K.; Meng, T.; Liu, H.; Hao, Y.; et al. Single-cell RNA sequencing reveals distinct immunology profiles in human keloid. *Front. Immunol.* 2022, 13, 940645. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.940645>.
9. DeLeon-Pennell, K.Y.; Barker, T.H.; Lindsey, M.L. Fibroblasts: The arbiters of extracellular matrix remodeling. *Matrix Biol.* 2020, 91–92, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2020.05.006>.
10. Shaker, S.A.; Ayuob, N.N.; Hajrah, N.H. Cell talk: A phenomenon observed in the keloid scar by immunohistochemical study. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2011, 19, 153–159. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e3181efa2ef>.
11. Deng, Z.; Subilia, M.; Chin, I.L.; Hortin, N.; Stevenson, A.W.; Wood, F.M.; Prêlle, C.M.; Choi, Y.S.; Fear, M.W. Keloid fibroblasts have elevated and dysfunctional mechanotransduction signaling that is independent of TGF- β . *J. Dermatol. Sci.* 2021, 104, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2021.09.002>.
12. Chipev, C.C.; Simman, R.; Hatch, G.; Katz, A.E.; Siegel, D.M.; Simon, M. Myofibroblast phenotype and apoptosis in keloid and palmar fibroblasts in vitro. *Cell Death. Differ.* 2000, 7, 166–176. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400605>.
13. Zhang, M.Z.; Dong, X.H.; Guan, E.L.; Si, L.B.; Zhuge, R.Q.; Zhao, P.X.; Zhang, X.; Liu, M.Y.; Adzavon, Y.M.; Long, X.; et al. A comparison of apoptosis levels in keloid tissue, physiological scars and normal skin. *Am. J. Transl. Res.* 2017, 9, 5548–5557.
14. Tsuchihashi, H.; Hasegawa, T.; Sumiyoshi, K.; Ikeda, S.; Ando, T.; Nakao, A.; Okumura, K.; Ogawa, H. TWEAK inhibits TGF-beta-induced contraction of normal and keloid fibroblast-embedded collagen gel. *J. Dermatol. Sci.* 2007, 45, 216–218. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2006.11.005>.
15. Hasegawa, T.; Nakao, A.; Sumiyoshi, K.; Tsuchihashi, H.; Ogawa, H. SB-431542 inhibits TGF-beta-induced contraction of collagen gel by normal and keloid fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 2005, 39, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2005.01.013>.
16. Bock, O.; Yu, H.; Zitron, S.; Bayat, A.; Ferguson, M.; Mrowietz, U. Studies of Transforming Growth Factors Beta 1–3 and their Receptors I and II in Fibroblast of Keloids and Hypertrophic Scars. *Acta. Dermato. Venereol.* 2005, 85, 216–220. <https://doi.org/10.1080/00015550410025453>.
17. Babu, M.; Diegelmann, R.; Oliver, N. Keloid fibroblasts exhibit an altered response to TGF-beta. *J. Invest. Dermatol.* 1992, 99, 650–655. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12668146>.
18. Bettinger, D.A.; Yager, D.R.; Diegelmann, R.F.; Cohen, I.K. The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis. *Plast. Reconstr. Surg.* 1996, 98, 827–833. <https://doi.org/10.1097/00006534-199610000-00012>.
19. Haisa, M.; Okochi, H.; Grotendorst, G.R. Elevated levels of PDGF alpha receptors in keloid fibroblasts contribute to an enhanced response to PDGF. *J. Invest. Dermatol.* 1994, 103, 560–563. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12396856>.
20. Jagadeesan, J.; Bayat, A. Transforming growth factor beta (TGF β) and keloid disease. *Int. J. Surg.* 2007, 5, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2006.04.007>.
21. Deng, C.-C.; Hu, Y.-F.; Zhu, D.-H.; Cheng, Q.; Gu, J.-J.; Feng, Q.-L.; Zhang, L.-X.; Xu, Y.-P.; Wang, D.; Rong, Z.; et al. Single-cell RNA-seq reveals fibroblast heterogeneity and increased mesenchymal fibroblasts in human fibrotic skin diseases. *Nat. Commun.* 2021, 12, 3709. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24110-y>.
22. Lim, K.H.; Itinteang, T.; Davis, P.F.; Tan, S.T. Stem Cells in Keloid Lesions: A Review. *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open* 2019, 7, e2228. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000002228>.
23. Lee, W.J.; Choi, I.-K.; Lee, J.H.; Kim, Y.O.; Yun, C.-O. A novel three-dimensional model system for keloid study: Organotypic multicellular scar model. *Wound Repair Regen.* 2013, 21, 155–165. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2012.00869.x>.
24. Lee, W.J.; Ahn, H.M.; Na, Y.; Wadhwa, R.; Hong, J.; Yun, C.-O. Mortalin deficiency suppresses fibrosis and induces apoptosis in keloid spheroids. *Sci. Rep.* 2017, 7, 12957. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13485-y>.
25. Lee, W.J.; Ahn, H.M.; Roh, H.; Na, Y.; Choi, I.-K.; Lee, J.H.; Kim, Y.O.; Lew, D.H.; Yun, C.-O. Decorin-expressing adenovirus decreases collagen synthesis and upregulates MMP expression in keloid fibroblasts and keloid spheroids. *Exp. Dermatol.* 2015, 24, 591–597. <https://doi.org/10.1111/exd.12719>.
26. Białkowska, K.; Komorowski, P.; Bryszewska, M.; Miłowska, K. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures-Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 6225. <https://doi.org/10.3390/ijms21176225>.
27. Ryu, N.-E.; Lee, S.-H.; Park, H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells* 2019, 8, 1620. <https://doi.org/10.3390/cells8121620>.
28. Nath, S.; Devi, G.R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol. Ther.* 2016, 163, 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013>.
29. Lee, N.-H.; Bayaraa, O.; Zechu, Z.; Kim, H.S. Biomaterials-assisted spheroid engineering for regenerative therapy. *BMB Rep.* 2021, 54, 356–367. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2021.54.7.059>.

30. Tan, Y.; Suarez, A.; Garza, M.; Khan, A.A.; Elisseeff, J.; Coon, D. Human fibroblast-macrophage tissue spheroids demonstrate ratio-dependent fibrotic activity for in vitro fibrogenesis model development. *Biomater. Sci.* 2020, 8, 1951–1960. <https://doi.org/10.1039/c9bm00900k>.
31. Granato, G.; Ruocco, M.R.; Iaccarino, A.; Masone, S.; Cali, G.; Avagliano, A.; Russo, V.; Bellevicine, C.; Di Spigna, G.; Fiume, G.; et al. Generation and analysis of spheroids from human primary skin myofibroblasts: An experimental system to study myofibroblasts deactivation. *Cell Death Discov.* 2017, 3, 17038. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.38>.
32. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001, 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
33. Limandjaja, G.C.; Niessen, F.B.; Scheper, R.J.; Gibbs, S. The Keloid Disorder: Heterogeneity, Histopathology, Mechanisms and Models. *Front Cell Dev. Biol.* 2020, 8, 360. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00360>.
34. Supp, D.M.; Hahn, J.M.; Glaser, K.; McFarland, K.L.; Boyce, S.T. Deep and superficial keloid fibroblasts contribute differentially to tissue phenotype in a novel in vivo model of keloid scar. *Plast. Reconstr. Surg.* 2012, 129, 1259–1271. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31824ecaa9>.
35. Duong, H.S.; Zhang, Q.; Kobi, A.; Le, A.; Messadi, D.V. Assessment of morphological and immunohistological alterations in long-term keloid skin explants. *Cells Tissues Organs* 2005, 181, 89–102. <https://doi.org/10.1159/000091098>.
36. Bagabir, R.; Syed, F.; Paus, R.; Bayat, A. Long-term organ culture of keloid disease tissue. *Exp. Dermatol.* 2012, 21, 376–381. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01476.x>.
37. Alzeeb, G.; Arzur, D.; Trichet, V.; Talagas, M.; Corcos, L.; Le Jossic-Corcoc, C. Gastric cancer cell death analyzed by live cell imaging of spheroids. *Sci. Rep.* 2022, 12, 1488. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05426-1>.
38. Chen, G.; Liu, W.; Yan, B. Breast Cancer MCF-7 Cell Spheroid Culture for Drug Discovery and Development. *J. Cancer Ther.* 2022, 13, 117–130. <https://doi.org/10.4236/jct.2022.133009>.
39. Gallegos-Martínez, S.; Lara-Mayorga, I.M.; Samandari, M.; Mendoza-Buenrostro, C.; Flores-Garza, B.G.; Reyes-Cortés, L.M.; Segoviano-Ramírez, J.C.; Zhang, Y.S.; Santiago, G.T.-D.; Álvarez, M.M. Culture of cancer spheroids and evaluation of anti-cancer drugs in 3D-printed miniaturized continuous stirred tank reactors (mCSTRs). *Biofabrication* 2022, 14, 035007. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ac61a4>.
40. Bochaton-Piallat, M.-L.; Gabbiani, G.; Hinz, B. The myofibroblast in wound healing and fibrosis: Answered and unanswered questions. *F1000Res* 2016, 5, 752. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8190.1>.
41. Salmenperä, P.; Karhemo, P.-R.; Räsänen, K.; Laakkonen, P.; Vaheri, A. Fibroblast spheroids as a model to study sustained fibroblast quiescence and their crosstalk with tumor cells. *Exp. Cell Res.* 2016, 345, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.05.005>.
42. Messadi, D.V.; Doung, H.S.; Zhang, Q.; Kelly, A.P.; Tuan, T.-L.; Reichenberger, E.; Le, A.D. Activation of NFκB signal pathways in keloid fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.* 2004, 296, 125–133. <https://doi.org/10.1007/s00403-004-0487-y>.
43. Chodon, T.; Sugihara, T.; Igawa, H.H.; Funayama, E.; Furukawa, H. Keloid-derived fibroblasts are refractory to Fas-mediated apoptosis and neutralization of autocrine transforming growth factor-beta1 can abrogate this resistance. *Am. J. Pathol.* 2000, 157, 1661–1669. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64803-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64803-1).
44. Ishihara, H.; Yoshimoto, H.; Fujioka, M.; Murakami, R.; Hirano, A.; Fujii, T.; Ohtsuru, A.; Namba, H.; Yamashita, S. Keloid Fibroblasts Resist Ceramide-Induced Apoptosis by Overexpression of Insulin-Like Growth Factor I Receptor. *J. Invest. Dermatol.* 2000, 115, 1065–1071. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00180.x>.
45. Lei, R.; Li, J.; Liu, F.; Li, W.; Zhang, S.; Wang, Y.; Chu, X.; Xu, J. HIF-1α promotes the keloid development through the activation of TGF-β/Smad and TLR4/MyD88/NF-κB pathways. *Cell Cycle* 2019, 18, 3239–3250. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1670508>.
46. Kang, Y.; Roh, M.R.; Rajadurai, S.; Rajadurai, A.; Kumar, R.; Njauw, C.-N.; Zheng, Z.; Tsao, H. Hypoxia and HIF-1α Regulate Collagen Production in Keloids. *J. Invest. Dermatol.* 2020, 140, 2157–2165. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.01.036>.
47. Xin, Y.; Wang, X.; Zhu, M.; Qu, M.; Bogari, M.; Lin, L.; Aung, Z.M.; Chen, W.; Chen, X.; Chai, G.; et al. Expansion of CD26 positive fibroblast population promotes keloid progression. *Exp. Cell Res.* 2017, 356, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.04.021>.
48. Ohm, B.; Moneke, I.; Jungraithmayr, W. Targeting cluster of differentiation 26 / dipeptidyl peptidase 4 (CD26/DPP4) in organ fibrosis. *Br. J. Pharmacol.* 2022. <https://doi.org/10.1111/bph.15967>.
49. Huang, X.; Khoong, Y.; Han, C.; Su, D.; Ma, H.; Gu, S.; Li, Q.; Zan, T. Targeting Dermal Fibroblast Subtypes in Antifibrotic Therapy: Surface Marker as a Cellular Identity or a Functional Entity? *Front. Physiol.* 2022, 12, 694605. Available online: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2021.694605> (accessed on 30 May 2022).
50. Lu, Y.-Y.; Fang, C.-C.; Hong, C.-H.; Wu, C.-H.; Lin, Y.-H.; Chang, K.-L.; Lee, C.-H. Nonmuscle Myosin II Activation Regulates Cell Proliferation, Cell Contraction, and Myofibroblast Differentiation in Keloid-Derived Fibroblasts. *Adv. Wound Care* 2020, 9, 491–501. <https://doi.org/10.1089/wound.2019.0944>.
51. Smith, J.C.; Boone, B.E.; Opalenik, S.R.; Williams, S.M.; Russell, S.B. Gene profiling of keloid fibroblasts shows altered expression in multiple fibrosis-associated pathways. *J. Invest. Dermatol.* 2008, 128, 1298–1310. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701149>.
52. Chen, Z.; Gao, Z.; Xia, L.; Wang, X.; Lu, L.; Wu, X. Dysregulation of DPP4-CXCL12 Balance by TGF-β1/SMAD Pathway Promotes CXCR4+ Inflammatory Cell Infiltration in Keloid Scars. *J. Inflamm. Res.* 2021, 14, 4169–4180. <https://doi.org/10.2147/JIR.S326385>.

53. Kunz-Schughart, L.A.; Wenninger, S.; Neumeier, T.; Seidl, P.; Knuechel, R. Three-dimensional tissue structure affects sensitivity of fibroblasts to TGF- β 1. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2003, 284, C209–C219. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00557.2001>.
-

2.3. Conclusion de l'étude

Au cours de ce travail, nous avons posé la question de la pertinence de cultiver des sphéroïdes de fibroblastes chéloïdiens comme modèle fibrotique *in vivo*. Nous avons tout d'abord montré la faisabilité de la construction de sphéroïdes à partir de fibroblastes chéloïdiens. Après formation, ces sphéroïdes étaient capables de se rétracter au cours du temps jusqu'à un maximum de diminution de taille obtenu 3 jours après ensemencement. Le taux d'apoptose au sein des sphéroïdes était plus faible dans ceux composés de FC comparativement à ceux composés de FDS. En outre, un environnement pro-fibrotique induisait une diminution des taux d'apoptose dans les deux modèles de sphéroïdes.

De façon surprenante, nous avons montré que la majorité des marqueurs de fibrose investigués (α -SMA, collagène, TGF- β RII et de la protéine marqueur de fibrose CD26), étaient régulés négativement dans les sphéroïdes comparativement aux cultures en monocouches. L'activation myofibroblastique habituellement induite dans les FC en présence de TGF- β 1 était même totalement perdue lorsque les cellules étaient cultivées en 3 dimensions sous forme de sphéroïdes. Nous pensons donc que cette désactivation du profil fibrogénique de nos fibroblastes est fortement liée à la perte de surface plastique d'adhérence lorsque les cellules forment les sphéroïdes. En effet, dans les sphéroïdes, la composante mécanique (rigidité élevée de la surface plastique) présente dans les cultures 2D a disparu, alors que l'on sait que ce type de signal impacte fortement la physiologie des fibroblastes via notamment les mécanismes de mécano-transduction. A l'initiation de ce travail sur les sphéroïdes, notre première hypothèse était de produire un modèle fibrotique mimant les chéloïdes sous forme de sphéroïdes constitués de fibroblastes pathologiques. Notre étude a démontré que ces sphéroïdes pouvaient être générés et maintenus en culture, se rétractaient au cours du temps, mais entraînaient une diminution du potentiel fibrogénique de nos cellules.

Même si notre modèle ne permet pas de modéliser la fibrogénèse chéloïdienne, il permettrait d'étudier les mécanismes d'activation/désactivation myofibroblastique mécano-dépendants. Ainsi, notre modèle sphéroïdes n'a pas été utilisé pour la suite des travaux présentés ici. Nous avons décidé d'étudier le rôle de la polarisation des macrophages dans la fibrogénèse chéloïdienne en utilisant notre arsenal expérimental de modèle de culture en 2 dimensions. Ce travail, en cours de publication, est présenté dans la section suivante.

3. Le phénotype des macrophages est déterminant au cours du développement de la fibrose dans les chéloïdes

3.1. Rationnel de l'étude

Durant les dernières années, les études *in vitro* visant à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la formation des chéloïdes étaient principalement centrées sur les fibroblastes dermiques chéloïdiens. Cependant, il a depuis largement été montré que le développement des chéloïdes résulte d'une interaction complexe entre les FC et leur environnement, notamment immunitaire. Les macrophages sont des cellules phagocytaires de l'immunité innée, dont le haut niveau de plasticité leur permet d'acquérir différents phénotypes. Recrutés dès les premiers instants de la phase inflammatoire de la cicatrisation, ils jouent un rôle majeur dans la régulation de ce processus physiologique, ou de son pendant pathologique durant le développement de la fibrose⁴⁷⁵. La transition des macrophages d'un phénotype pro-inflammatoire (M1) vers un profil pro-cicatriciel (M2) est en effet primordiale dans l'orchestration de la phase de remodelage, dont la résolution permet d'aboutir à la réparation complète du tissu cutané.

Le rôle des macrophages dans la formation des chéloïdes a été de plus en plus suggéré depuis ces dernières années, en particulier dans des études histologiques montrant la présence d'un fort infiltrat de macrophages de type M2 au sein du tissu^{297,362,476}. En revanche, même si des récentes études de *Single cell RNA sequencing* ont mis en avant leur impact dans le développement des chéloïdes, très peu de données *in vitro* et *in vivo* sont actuellement disponibles quant à la compréhension du rôle des macrophages dans la pathologie. Ainsi, notre étude avait pour objectif d'évaluer pour la première fois *in vitro* le rôle des macrophages de type M1 [M(LPS)] et de type M2 [M(IL-4, IL-13)] dans la modulation du profil fibrogénique des fibroblastes de chéloïdes. Pour ce faire, nous avons dans premier temps produit des macrophages à partir de monocytes polarisés et activés à l'aide des facteurs d'induction classiquement décrits dans la littérature. Après avoir qualifié et validé le phénotype de nos macrophages, nous avons généré du milieu induit (« CM » *Conditioned-Medium* dans l'article), contenant le sécrétome de chacun des sous-types de macrophages [M(LPS) et M(IL-4, IL-13)]. Ces sécrétomes ont ensuite été utilisés pour « traiter » nos fibroblastes de chéloïdes, pour lesquels nous avons étudié leurs propriétés de prolifération, de migration, de différenciation myofibroblastique, ainsi que leurs capacités de synthèse et de remodelage de la matrice extracellulaire.

Macrophage phenotype is determinant for fibrosis development in keloid disease

DIRAND Zélie¹, MARAUX Mélissa¹, TISSOT Marion¹, CHATELAIN Brice², SUPP Dorothy^{3,4}, VIENNET Céline¹, PERRUICHE Sylvain^{1,5}, ROLIN Gwenaël^{6*}

¹ Université de Franche-Comté, Sciences Médicales et Pharmaceutiques, EFS, INSERM, UMR RIGHT, 25000 Besançon, France

² Service de Chirurgie Maxillo-Faciale, Stomatologie et Odontologie Hospitalière, CHU Besançon, 25000 Besançon, France

³ Department of Surgery, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio, USA

⁴ Scientific Staff, Shriners Children's Ohio, Dayton, Ohio, USA

⁵ MED'INN'Pharma, F-25000 Besançon, France

⁶ Université de Franche-Comté, Sciences Médicales et Pharmaceutiques, CHU Besançon, EFS, INSERM, UMR RIGHT, 25000

* Correspondence: gwenael.rolin@univ-fcomte.fr

Abstract: Keloid refers to a fibroproliferative disorder characterized by an accumulation of extracellular matrix (ECM) components at the dermis level, overgrowth beyond initial wound, and formation of tumor-like nodule areas. Treating keloid is still an unmet clinical need and the lack of an efficient therapy is clearly related to limited knowledge about keloid etiology, despite the growing interest of the scientific community in this pathology. In past decades, keloids were often studied in vitro through the sole prism of fibroblasts considered as the major effector of ECM deposition. Nevertheless, development of keloids results from cross-interactions of keloid fibroblasts (KFs) and their surrounding microenvironment, including immune cells such as macrophages. Our study aimed to evaluate the effect of M1 and M2 monocyte-derived macrophages on KFs in vitro. We focused on the effects of the macrophage secretome on fibrosis-related criteria in KFs, including proliferation, migration, differentiation, and ECM synthesis. First, we demonstrated that M2-like macrophages enhanced the fibrogenic profile of KFs in culture. Then, we surprisingly founded that M1-like macrophages can have an anti-fibrogenic effect on KFs, even in a pro-fibrotic environment. These results demonstrate, for the first time, that M1 and M2 macrophage subsets differentially impact the fibrotic fate of KFs in vitro, and suggest that restoring the M1/M2 balance to favor M1 in keloids could be an efficient therapeutic lever to prevent or treat keloid fibrosis.

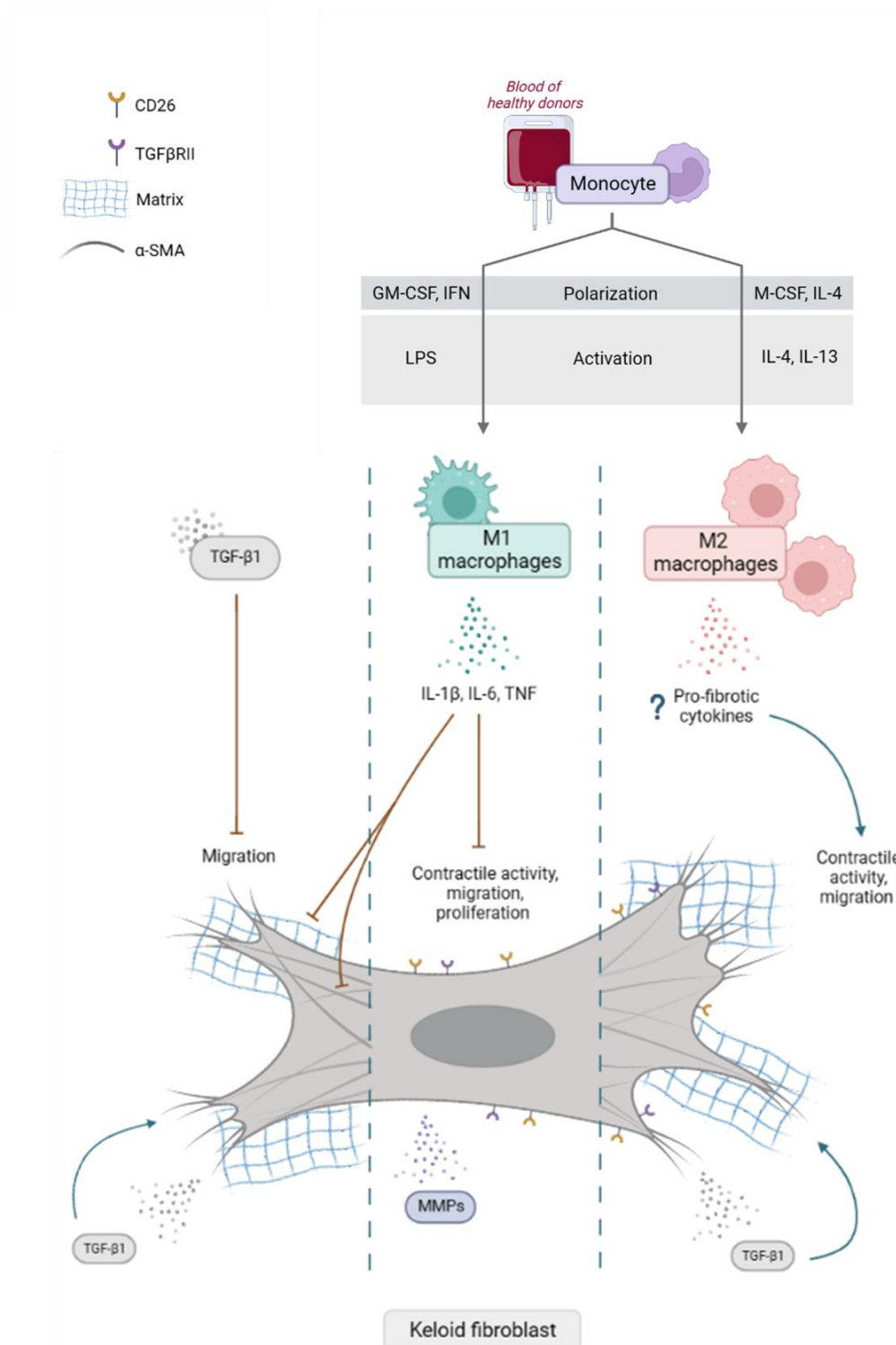
Keywords : keloid, fibroblast, fibrosis, macrophage, M1, M2, TGF- β 1

Abbreviations: CC1, Cell Conditioning Solution 1 ; ECM, Extracellular matrix ; EDTA, Ethylene diamine tetra acetic acid ; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay ; FCS, Foetal Calf Serum ; iNOS, Inducible Nitric Oxide Synthase ; IL, Interleukin ; KFs, Keloid fibroblast ; M(LPS), Macrophages induced by LPS ; M(IL-4, IL-13), Macrophages induced by IL-4 and IL-13 ; MMP, Matrix Metalloprotease ; NDFs, Normal Dermal Fibroblasts ; PBS, Phosphate Buffered Saline ; PS, Penicillin, Streptomycin ; TGF- β 1, Transforming Growth Factor beta-1 ; TIMP, Tissue Inhibitor of Metalloprotease ; TNF, Tumor Necrosis Factor ; α -SMA, Alpha-Smooth Muscle Actin.

Highlights :

- Secretome from M1 and M2 macrophages were generated to treat keloid fibroblasts
- M2 secretome enhances the fibrogenic profile of keloid fibroblasts
- M1 secretome attenuates the fibrogenic profile of keloid fibroblasts
- M1 secretome prevents from profibrotic effect of TGF- β 1 in keloid fibroblasts
- First demonstration that M1/M2 macrophages differentially impact fibrogenesis in keloid

Graphical abstract :



1. Introduction

Keloid refers to a fibroproliferative disorder characterized by an accumulation of extracellular matrix (ECM) components at the dermis level, overgrowth beyond initial wound, and formation of tumor-like nodules [1]. Whatever the trauma, keloids always start from skin lesion and are the consequence of a dysregulated healing process. Experts now consider keloids as a chronic inflammatory disease [2] which shares close similarities with cancer [3]. Clinically, keloids are benign, but seriously impair the patient's quality of life [4,5], especially when they are located on the face and joints. Moreover, keloids can cause itching, pain, and discomfort in patients. Unfortunately, treating keloid is still an unmet clinical need [6] and the lack of an efficient therapy is clearly related to limited knowledge about keloid etiology, despite the increasing number of publications on the subject.

At the tissue level, keloid dermis is highly rich in type I and type III collagen, fibronectin, and periostin [7,8] compared to normal skin. In keloid, collagen fibers are thicker and forms large fibrotic nodules [9] spreading into the deep dermis, as the consequence of disorganized ECM deposition. During normal healing, collagen deposition is finely regulated by the balance between synthesis and degradation mediated by matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (tissue inhibitors of metalloproteinases "TIMPs"). But, in keloids, levels of MMP-1, MMP-2, MMP-13, TIMP-1 and TIMP-2 are increased whereas MMP-3 level decreases, compared to normal scars [10–12].

At the cellular level, fibroblasts are present in higher concentrations in keloids compared to normal tissues [13]. Keloid fibroblasts (KFs) express higher levels of α -Smooth Muscle Actin (α -SMA), collagen [14], CD26 [15] and fibronectin [7] than normal dermal fibroblasts (NDFs). KFs also have a higher proliferation rate [16] and are able to develop higher contraction forces [15,17]. In addition, KFs are more sensitive to their biological microenvironment, as they express more receptors to transforming growth factor beta (TGF- β) and platelet-derived growth factor (PDGF) than NDFs [18–20]. Moreover, KFs are more responsive to such growth factors, resulting in amplified collagen and ECM synthesis and deposition [21].

At the microenvironment level, KFs are in close contact with many immune cells, such as memory T lymphocytes [22], mast cells [23], and macrophages [24]. All of these cells highly infiltrate and persist in the dermal compartment [13,25,26] during the inflammatory phase of wound healing. Macrophages, the main human phagocytic cells, exhibit a high degree of plasticity and form a heterogeneous population composed of classically activated M1 macrophages, which are known to be pro-inflammatory cells through their secretion of interleukins IL-1 β , IL-6 and IL-8, and alternatively activated M2 macrophages, which are considered to be anti-inflammatory and pro-remodeling cells [27]. During the early phase of normal wound healing, M1 macrophages produce inflammatory cytokines, such as IL-6 or tumor necrosis factor alpha (TNF α) [28], which are mandatory for orchestration of normal wound healing [29–31]. At the end of the inflammatory phase, M1 macrophages phagocytize cellular debris, bacteria, and apoptotic neutrophils at the wound site. This phagocytic activity, combined with cytokine signaling from T lymphocytes (IL-4, IL-13), induces M1 polarization towards an M2 phenotype [32]. On the one hand, M2 macrophages are responsible for decreasing inflammation and angiogenesis. On the other hand, they promote tissue remodeling by secreting TGF- β , leading to fibroblast-to-myofibroblast differentiation and ECM synthesis [33]. Recently, Lis-Lopez et al. discussed whether macrophage phenotype is a determinant in the development of fibrosis in the lung, liver, heart, kidney, and intestine [34]. Recently, an elegant review of Bhattacharya and Ramachandran also detailed the determinant implication of macrophages in

fibrogenesis [35]. In keloid, a significantly increased number of M2-like macrophages was observed by Bagabir et al. [36] in intralesional and perilesional keloid sites compared with normal skin and physiological scars. The involvement of macrophages in keloid pathogenesis was also recently addressed by cutting-edge single cell RNA sequencing technology [37]. Feng et al. showed that the M2/M1 ratio is elevated in keloids compared to normal skin [37]. These novel data show that there is potentially a macrophage-centric cellular communication network within keloids. In line with this hypothesis, Shaker et al. performed a histological study to characterize macrophages content in keloid tissue, and showed that CD206+ (M2) macrophages persist in keloids [13]. These observations were confirmed by Li et al. [24] and Seoudy et al. [38] who reported that both total macrophages (CD68+) and M2-like macrophages (CD163+) were enriched significantly in keloids. Despite this body of evidence, the role of macrophages in keloid formation has not yet been fully deciphered. Historically, keloids were often studied *in vitro* through the sole prism of fibroblasts as the major effector of ECM deposition in many tissues [39]. Nevertheless, development of keloids results from interactions between keloid fibroblasts and surrounding immune cells [40]. Limandjaja et al. highlighted the importance of such interactions by showing that the secretome of KFs is able to induce M2 polarization of human monocytes [41]. To our knowledge, the differential role of M1 and M2 macrophages on keloid fibroblasts has not yet been widely investigated *in vitro*.

To fill this gap, we evaluated the effect of M1 and M2 monocyte-derived macrophages on KFs *in vitro*. We focused on the effects of the secretome of macrophages on fibrotic-related features of KFs: proliferation, migration, differentiation, and ECM synthesis. Our results demonstrate that M2-like macrophages enhance the fibrotic profile of KFs in culture. These data are consistent with previous *in vivo* observations about M2 involvement in keloid formation [13,24,33,38]. Further, we surprisingly found that the secretome of M1-like macrophages can have an anti-fibrotic effect on KFs, even in a pro-fibrotic environment.

Beyond supporting, for the first time, that M1 and M2 macrophages subsets differentially impact the fibrotic fate of KFs *in vitro*, the results of this study suggest that restoring the M1/M2 balance in favor of M1 in keloid could be an efficient therapeutic lever to prevent or treat keloid fibrosis.

2. Material and methods

All reagents, references, and concentration are available in Supp. Table I.

2.1. Clinical study approval

For fibroblasts extraction, keloid samples were collected from surgical resection performed on patients from the Maxillo-Facial Surgery Department of the University Hospital of Besançon, France (Supp. Table 2.). Details about our clinical study ["SCAR WARS" (NCT03312166)] are available on clinicaltrials.gov. All donors provided informed consent and the study was conducted in respect of ethical standards of the Declaration of Helsinki. Locally, keloid collection was ethically authorized by the French Regulatory Agency (ANSM) and ethic committee (CPP Sud-Ouest and Outre-Mer I). Leukocyte-platelet concentrates were obtained from healthy volunteers at the French Blood Establishment (EFS Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France) after informed consent was

obtained (authorization number #AC-2015-2408) (Supp. Table II.). Immunohistochemistry was performed at the Pathology laboratory for histological diagnosis (CHU de Besançon, France) on 7 keloid samples from tissue bank (procedure 022 TUM 210 PC04 XXX) (Supp. Table II.).

2.2. Immunohistochemistry

Immunostaining on keloid tissue (listed in Supp. Table II.) was performed on the Ventana Benchmark ULTRA automated slide stainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). Briefly, 3 μm paraffin sections were dewaxed in xylene and rehydrated using decreasing concentration of alcohol. Antigen retrieval was carried out by incubating slides in CC1 buffer (pH=8.4) at 100°C. Sections were then incubated at 37°C with primary antibodies targeting CD68 [42], considered a pan-macrophage marker, and CD206 [43], a marker expressed by M2 alternatively activated macrophages. The chromogenic staining was visualized using the Ventana OptiView DAB Detection System. Slides were counterstained with hematoxylin. Stained slides were scanned using a slide scanner (NanoZoomer 2.0-HT, Hamamatsu Photonics), and staining quantification was performed using QuPath-0.2.3. For each sample, staining quantification was performed from 5 areas (800 x 200 μm). On histogram, each dot represents the average marker-positive area for each sample.

2.3. Macrophage generation and conditioned-medium production

Human monocytes were isolated from leukocyte-platelet concentrates on a Ficoll-density gradient followed by positive CD14⁺ cell sorting [44]. CD14⁺ magnetic separation was performed according to manufacturer's instructions (Miltenyi). CD14⁺ cells were then suspended at 1.106/mL in complete medium [RPMI 1640, 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin (1% PS)], and seeded at 0.25 x 10⁶ cells per cm² in culture flasks. Monocytes were polarized in two distinct macrophages subsets. M1-like macrophages were generated from monocyte by treating them during 7 days with granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF; 50 ng/mL) and interferon gamma (IFN γ ; 50 ng/mL), followed by a 24h treatment with 100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS). Herein, these M1-like macrophages will be referred to as M(LPS). M2-like macrophages were generated from monocytes by treating them for 7 days with GM-CSF and IL-4 at 50 ng/mL, followed by a 24h treatment with IL-4 (20 ng/mL) and IL-13 (20 ng/mL). Herein, we refer to these M2-like macrophages as M(IL-4, IL-13). After polarization, both M(LPS) and M(IL-4, IL-13) were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) and cultured in complete DMEM ("DMEMc", supplemented with 5% FCS, 1% PS) during 24h to produce conditioned-medium (CM), respectively referred to as M(LPS)-CM and M(IL-4, IL-13)-CM. Conditioned-media obtained from cells of 3 different patients were pooled to limit variability. Mixed M(LPS)-CM and M(IL-4, IL-13)-CM were stored at -80°C for a maximum of 3 months before use in experiments.

2.4. Cytokine quantification in macrophage-conditioned medium

IL12-p70, IL-10, IL-6, TNF- α , IL-8 and IL-1 β levels in M(LPS) and M(IL-4, IL-13)-CM were quantified using the Human Inflammatory Cytokine Cytometric Bead Array (Becton Dickinson) following manufacturer's instructions. Measurements were performed using LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson) and concentrations were calculated using FlowJo_V10[®] software. For TGF- β 1, levels were quantified using Human anti-TGF- β 1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (R&D Systems), following manufacturer's instructions. A minimum of 6 conditioned-medium batches were analyzed for each macrophage subset.

2.5. Macrophage qualification by immunofluorescence

CD14⁺ monocytes were seeded on sterile glass coverslips, polarized and activated as described in section 2.3. After activation period, cells were fixed (PFA 4%), permeabilized in Triton X100 (0.1% in PBS), and incubated in blocking solution (PBS, 3% bovine serum albumen, 10% sheep serum). Appropriate dilutions of primary antibodies (see Supp. Table I) were added on samples before an overnight incubation. The next day, cells were rinsed in PBS and incubated for 1h with appropriate secondary antibody, targeting iNOS (see Supp. Table I). Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (15 min, room temp.). Negative controls were performed by omitting primary antibodies. Images were obtained using a LSM800 confocal microscope and Zen V3.7 software (Carl Zeiss).

2.6. Macrophages qualification by flow cytometry

Flow cytometry was used to evaluate the expression of CD14, CD80, CD206, CD163, and MerTK in M(LPS) and M(IL-4, IL-13) macrophages. Briefly, cells were gently removed from flasks after incubation with PBS + 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Cells were then centrifuged at 120g for 5 min at 4°C, rinsed one time with PBS, and suspended in 100 µL of flow cytometry buffer (PBS, 2 mM EDTA, 3% FCS) containing Fc block CD16/32. After incubation (10 min, room temp.), M(LPS) and M(IL-4, IL-13) macrophages were centrifuged and suspended in flow cytometry buffer containing labeled antibodies targeting CD14, CD80, CD206, CD163 and MerTK markers (listed in Supp. Table I.). After incubation (15 min, 4°C), cells were rinsed twice with PBS and suspended in 300 µL of flow cytometry buffer. Cell staining was analyzed by flow cytometry using a SP6800 spectral cytometer and associated software (Sony Biotechnology). Results are expressed as the relative fluorescent intensity (RFI) of stained cells compared to unstained ones.

2.7. Human keloid fibroblast collection and treatment

Keloids samples (Listed in Supp. Table II.) were processed for explant culture as previously described [45]. After outgrowth, KFs were subcultured in DMEMc and used between the third and eighth passage for all experiments. Seeding ratios are specified below for each experiment (sections 2.9 to 2.16). Post-seeding, cells were starved for 24h in FCS-free DMEM. KFs were then treated with M(LPS)-CM and M(IL-4, IL-13)-CM supplemented or not with TGF-β1 (10 ng/mL). KFs were cultured in DMEMc as control (Ctrl) condition or with TGF-β1 (10 ng/mL) to induce fibrotic activation. Each experiment was performed on at least three keloid fibroblast lines cultured with one or two different pooled M(LPS)-CM or M(IL-4, IL-13)-CM.

2.8. Human keloid fibroblast characterization

Flow cytometry was used to evaluate the expression level of alpha Smooth Muscle Actin (α-SMA) in KFs. Cell were seeded at 200 000 cells/well in 6-well plates, and treated as described in section 2.7 during 96h. After treatment, cells were collected by trypsinization and processed for flow cytometry as described in section 2.6. KFs were labelled with anti-human-α-SMA antibody after permeabilization. Materials and antibody concentration are listed in Supp. Table I. Cell marker was analyzed by flow cytometry using a SP6800 spectral cytometer and associated software (Sony biotechnology). Results are expressed as the relative fluorescent intensity (RFI) of stained cells compared to unstained ones. α-SMA expression was also assessed by immunostaining in KFs cultured on glass coverslip (20 000 cells per slide) and treated as described in section 2.7. After 96h, fixed cells (PFA, 4%) were processed as previously described [45]. Briefly, after permeabilization and saturation step, KFs were incubated

overnight with primary antibody at 4°C then with secondary antibody during 1h at room temperature. DAPI was used for nucleus counterstaining and positive α -SMA staining was validated compare to negative control. Fluorescent images were obtained using a LSM800 confocal microscope and Zen V3.7 software (Carl Zeiss). Bright field images were obtained using a real-time microscope (IncuCyte S3TM, Sartorius). Materials and antibody concentration are listed in Supp. Table I.

2.9. Proliferation assay

Fibroblasts proliferation was evaluated by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation using the Cell proliferation ELISA BrdU kit (Roche) following the manufacturer's instructions. KFs were seeded at 3000 cells/well in 96-well plates, and treated as described in section 2.7 for 48h. Optical density at 450 nm was quantified using a microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific). Raw data were generated from independent tests performed with three different primary cell strains, treated with one mix of CM (n=4 per condition). Results are expressed as a proliferation ratio compared to KFs grown in control condition (Ctrl).

2.10. Analysis of gene expression

Gene expression in KFs was analyzed using real-time quantitative PCR (RT-qPCR). KFs were seeded at 50 000 cells/wells in 12-wells plate, and treated as described in section 2.7 during 96h. RNA extraction was performed using RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions, and RNA samples were reverse-transcribed using High capacity RNA to cDNA kit (ThermoFisher) according to manufacturer's instructions. Then, specific TaqMan probes from Thermo Fisher Scientific (TaqMan Gene Expression Assays) were used for qPCR amplification (listed in Supp. Table III.). All samples were analyzed in duplicate. A normalization of the RNA level was performed against the GAPDH gene. Data were analyzed using the $\Delta\Delta$ CT technique [46], and are represented as a relative expression compared to the control condition (Ctrl). Raw data were obtained from independent experiments performed with four different primary cell lines, treated with one CM.

2.11. Scratch wound assay

KFs were seeded at 15 000 cells/wells in ImageLock 96-well plates (Sartorius). After 24h adhesion, cell proliferation was blocked using mitomycin C at 5 μ g/mL in DMEMc for 24h. Monolayers were wounded using WoundMaker™ device (Sartorius). After wounding, cells were rinsed twice with PBS before cell treatment (section 2.7). Wound filling was documented every 2 hours for 96h with a real-time microscope (IncuCyte S3TM, Sartorius). Image analysis was performed with IncuCyte™ Scratch Wound Cell Migration Software Module (Sartorius). Results are expressed as the Relative Wound Density (RWD) of the initial injury, which corresponds to the percentage of the initial injury that is filled by cells at each time point. Raw data were generated from independent tests performed with three different primary cell strains, treated with one CM (n=4 per condition).

2.12. Boyden Chamber migration assay

Macrophages were seeded in the lower part of the chamber and cultured for 8 days as previously described (section 2.3) to activate them into M(LPS) or M(IL-4, IL-13). KFs were seeded on 8- μ m pore size ThinCert™ culture insert (upper chamber) in DMEMc After 72h, KFs were fixed on the porous membrane using 4% paraformaldehyde. Unattracted KFs were removed from upper side of the membrane using a swab. Attracted cells present on the lower side of the membrane were stained with DAPI. Membranes were then mounted on glass slides with cover slips, and images were taken using

an Axioskop40TM epifluorescence microscope (Zeiss). The number of attracted cells was counted and normalized by the membrane surface. Raw data were obtained from independent experiments performed with three to five different primary cell lines of KFs. The number of attracted cells was counted from five images of 0.038 mm² per conditions. Each point represent the mean of these five images per sample.

2.13. Protein quantitation via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

KFs were seeded at 50 000 cells per well into 12 well culture plates, and treated as described in section 2.7. After 96h of treatment, α -SMA and fibronectin were quantified in cell lysate using the Human α -SMA ELISA[®] kit and Human fibronectin ELISA[®] kit (Abcam), respectively, according to manufacturer's instructions. After 72h of treatment, secreted collagen type I was quantified using procollagen type I quantification ELISA kit[®] (R&D system) according to manufacturer's instructions. Raw data were obtained from independent experiments performed with four different primary cell lines treated with one mix of conditioned medium. Data were normalized to the amount of total proteins in samples (determined using Pierce bicinchoninic acid reaction).

2.14. Collagen gel contraction assay

KFs contractile activity was studied using free contractile collagen gel [47]. First, a cooled solution was prepared by mixing DMEM (0.8 X), FCS (9% v/v), NaOH (0.005 N), NaHCO₃ (0.3%), Penicillin (200 U/mL) and Streptomycin (0.2 mg/mL). Then, rat tail type I collagen (0.6 mg/mL) and KFs (8.104 cell/mL) were added. 500 μ l of this second mixture was added per well in a 24-wells plate and then warmed for 3D gel formation (37°C, 1h). After collagen polymerization, gels were gently detached from plastic and treated with DMEMc, M(LPS)-CM or M(IL-4, IL-13)-CM, containing or not 10 ng/mL TGF- β 1. Culture plates were pictured daily and gel diameters were determined from ImageJ software analysis. Results were expressed as a contraction percentage of the initial area. Collagen gels were performed in duplicates, with three different primary cell lines treated with one batch of pooled conditioned medium.

2.15. Sirius red assay

Total secreted collagen by KFs was quantified using a quantitative method based on Sirius red coloration. KFs were seeded at 5000 cells/well in 96-well culture plates, and treated as previously described in section 2.7. After 7 days of treatment by renewing the media every 3 days, cells were stained with Sirius red as previously described [48]. Briefly, KFs were fixed using Bouin's solution, stained with Sirius Red, and carefully washed in 0.01 N HCl. Bounded dye was then eluted in 100 μ L NaOH per well. Absorbance at 550 nm was read using a Synergy H1 microplate reader (Biotek Instruments). Results are expressed as a percentage of collagen synthesis compared to the control condition. Raw data were obtained from independent experiments performed with three different primary cell lines treated with one mix of conditioned medium (n=5 per condition).

2.16. Collagenase activity – Zymography assay

KFs were seeded at 200 000 cells per well into 6 wells culture plate, and treated according section 2.7. After 96h, cells were lysed in the supplied lysis buffer. 1 mM p-aminophenylmercuric acetate was added to cell lysates to activate inactive forms of collagenase. Enzymatic activity was measured with a Collagen Degradation/Zymography Assay Kit (Abcam) according to manufacturer's instruction. Collagenase activity (U/mg) was normalized by total protein concentration in supernatant (determined

using Pierce BCA reaction). Raw data were generated with four different primary cell strains treated with one batch of pooled conditioned medium.

2.17. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunn's posttest for multiple comparisons, or using two-way repeated measures ANOVA. All analyses were performed using GraphPad Prism 9 software. Differences were considered as statistically significant at $p < 0.05$. Significance values in data plots are indicated by asterisks: * for $p < 0.05$; ** for $p < 0.01$; *** for $p < 0.001$; **** for $p < 0.0001$.

3. Results

Keloids contain more CD206+ and CD68+ expressing macrophages than normal skin. Quantitative analysis of macrophage biomarkers showed that CD206+ (Figure 1A) and CD68+ (Figure 1B) cells are present at higher levels in keloids compared to normal skin. Whether in normal skin or in keloid, M2 macrophages seem to be concentrated in the papillary dermis (PD) as shown in Figure 1C. Histologically, H&E staining confirmed structural differences between normal and pathological tissue (Figure 1C). Compared with normal skin, keloid epidermis is thicker, the papillary dermis looks more compacted and disorganized, and the deep reticular dermis is composed of large collagen bundles.

M(IL-4, IL-13) are M2-like macrophages and M(LPS) are M1-like pro-inflammatory macrophages. We confirmed the correct polarization of M(LPS) and M(IL-4, IL-13) macrophages by investigating their morphology after activation and by analyzing their secretomes as well. Their expression of M1 and M2 classical biomarkers was also investigated and presented in Supp. Data. I. Compared to naïve monocytes, M(LPS) are spindle shaped (characteristic of M1 macrophages), while M(IL-4, IL-13) morphology is more heterogeneous, from round to elongated shape (Figure 2A). The secretome characterization of macrophages (Figure 2B) showed that M(LPS) synthesized high amounts of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and IL-8) compared to M(IL-4, IL-13) macrophages. There were no significant differences in pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-12, anti-inflammatory cytokine IL-10, or pro-fibrotic factor TGF- β 1 between M(LPS) and M(IL-4, IL-13).

M(IL-4, IL-13) macrophages recruit significantly more keloid fibroblasts than M(LPS). A Boyden chamber assay was used to analyze chemoattraction of KFs by macrophages (Figure 3A-B). Even though differences were not statistically significant, the quantification of attracted cells (Figure 3B) showed that M(IL-4, IL-13) seems to recruit more cells than M(LPS) or controls ($p=0.1174$). No tendency to chemoattraction was observed for M(LPS).

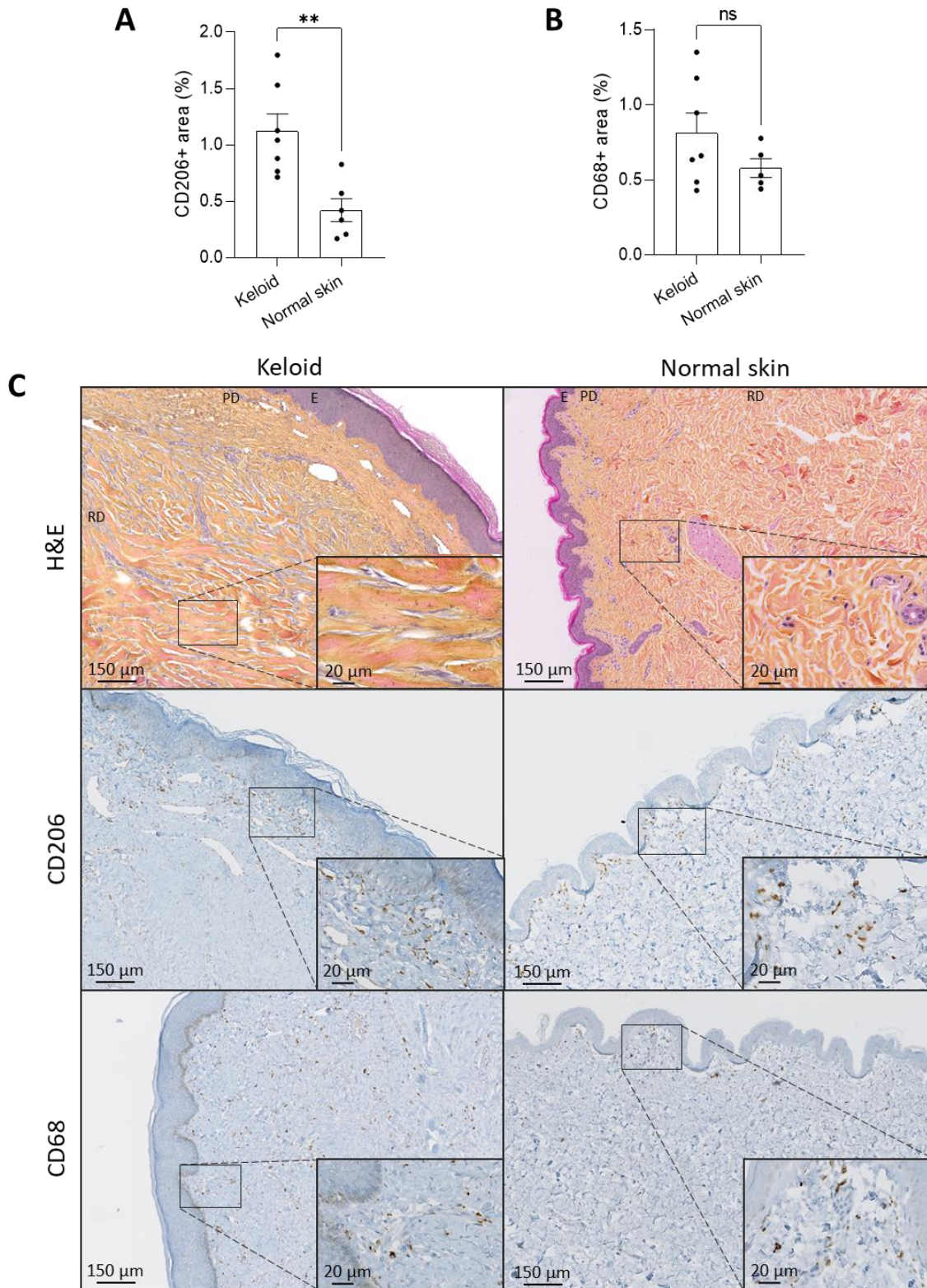


Figure 1. Keloids contain more CD206+ and CD68+ macrophages than normal skin. Semi-quantitative analysis of CD206 and CD68 biomarkers was performed from immunostained keloid and normal skin sections. Quantification was performed on 5 non-overlapping regions (800 x 200 μ m) per sample [n = 7 samples for keloid and 6 for normal skin], and the area staining positive for CD206 (A) or CD68 (B) in each region was calculated. Results are expressed as the mean percentage of positive zone \pm SEM. Statistical analysis was performed using t test, and significance is indicated by asterisks: ** for $p < 0.01$. Representative images are presented in (C). E = Epidermis, RD = Reticular Dermis, PD = Papillary Dermis.

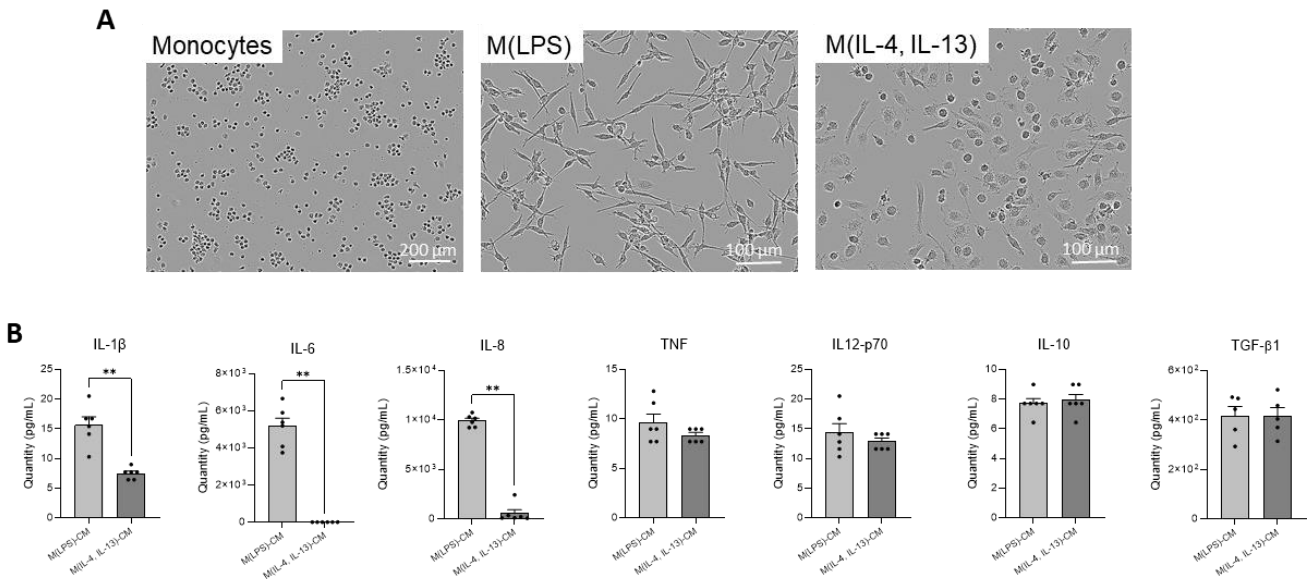


Figure 2. M(LPS) resemble M1-like pro-inflammatory macrophages and M(IL-4, IL-13) resemble M2-like macrophages. (A) M(LPS) (M1-like) and M(IL-4, IL-13) (M2-like) macrophages were obtained from healthy human monocytes after polarization and activation with GM-CSF, IFN γ , and LPS, or M-CSF, IL-4, and IL-13, respectively. (B) Macrophages-secreted cytokines were assayed in macrophage-conditioned medium (CM) using Human inflammatory CBA kit (Becton Dickinson), and anti-TGF- β 1 ELISA (R&D Systems) [at least n=5 per cytokine]. For each cytokines, results are expressed as the mean concentration \pm SEM. Statistical analyses were performed using t test, and significance is indicated by asterisks: * for $p < 0.05$; ** for $p < 0.01$; *** for $p < 0.001$.

M(LPS)-CM has a strong anti-migration effect on KFs in pro-fibrotic microenvironment. During in vitro scratch wound healing assay, KFs migration was quantified through relative wound density (RWD) over time (Figure 3C-D). Quantitative analysis of KFs migration (Figure 3D) demonstrated that M(LPS)-CM significantly impaired KFs migration compared to controls. In fibrotic conditions, created by treatment of cells with the pro-fibrotic cytokine TGF- β 1, the inhibitory effect of M(LPS)-CM is maintained and slightly reinforced, whereas TGF- β 1 treatment alone reduced the migration rate. M(IL-4, IL-13)-CM slightly increased migration rates. Conversely, the effect of M(IL-4, IL-13)-CM on KFs migration faded in the presence of TGF- β 1, as maximum RWD of [M(IL-4, IL-13)-CM + TGF] returned to control levels.

M(LPS) and M(IL-4, IL-13) differ in their effects on KFs proliferation in basal and fibrotic environments. The effects of M(LPS)-CM and M(IL-4, IL-13)-CM on KFs proliferation status, in a pro-fibrotic environment (+ TGF- β 1) or not, is presented in Figure 3E. TGF- β 1 alone did not significantly impact KFs proliferation rates. After treatment with conditioned medium, we observed the differential effects of M(LPS)-CM and M(IL-4, IL-13) on KFs. We found that M(LPS)-CM significantly decreased KFs proliferation compared to control, and that this effect was tightly maintained in the presence of TGF- β 1. M(IL-4, IL-13)-CM alone had no significant effect on KFs proliferation, whereas the combination of M(IL-4, IL-13)-CM and TGF- β 1 led to a significant reduction of KFs proliferation (Figure 3E).

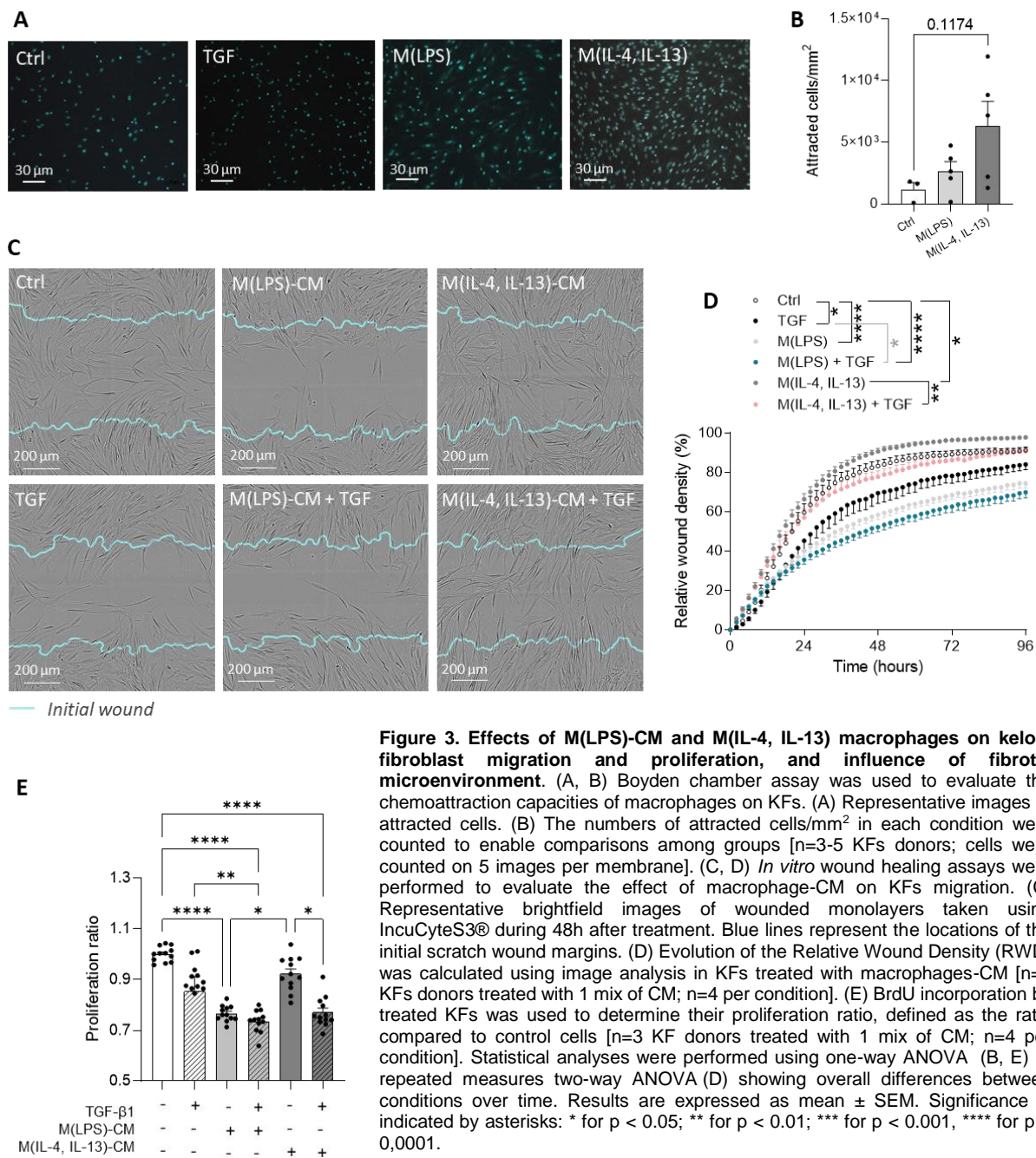


Figure 3. Effects of M(LPS)-CM and M(IL-4, IL-13) macrophages on keloid fibroblast migration and proliferation, and influence of fibrotic microenvironment. (A, B) Boyden chamber assay was used to evaluate the chemoattraction capacities of macrophages on KFs. (A) Representative images of attracted cells. (B) The numbers of attracted cells/mm² in each condition were counted to enable comparisons among groups [n=3-5 KFs donors; cells were counted on 5 images per membrane]. (C, D) *In vitro* wound healing assays were performed to evaluate the effect of macrophage-CM on KFs migration. (C) Representative brightfield images of wounded monolayers taken using IncuCyteS3® during 48h after treatment. Blue lines represent the locations of the initial scratch wound margins. (D) Evolution of the Relative Wound Density (RWD) was calculated using image analysis in KFs treated with macrophages-CM [n=3 KFs donors treated with 1 mix of CM; n=4 per condition]. (E) BrdU incorporation by treated KFs was used to determine their proliferation ratio, defined as the ratio compared to control cells [n=3 KF donors treated with 1 mix of CM; n=4 per condition]. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA (B, E) or repeated measures two-way ANOVA (D) showing overall differences between conditions over time. Results are expressed as mean \pm SEM. Significance is indicated by asterisks: * for p < 0.05; ** for p < 0.01; *** for p < 0.001, **** for p < 0.0001.

M(LPS) and M(IL-4, IL-13) ability to modify KFs contractile activity depends on the fibrotic microenvironment. In tested conditions, KFs contractile capacity was determined using a collagen gel contraction model (Figure 4A). Relative gel contraction was expressed as a ratio of treated gel surface normalized to control at each time point (Figure 4B). TGF- β 1 alone slightly increased KFs contractile activity overtime. On one side, we observed that M(LPS)-CM significantly decreased contraction capacity of KFs compared to control. However, this potential is lost in a pro-fibrotic environment (+TGF- β 1). On the other side, M(IL-4, IL-13)-CM, significantly increased KFs contractile activity and this effect was strongly reinforced in a pro-fibrotic environment (+ TGF- β 1).

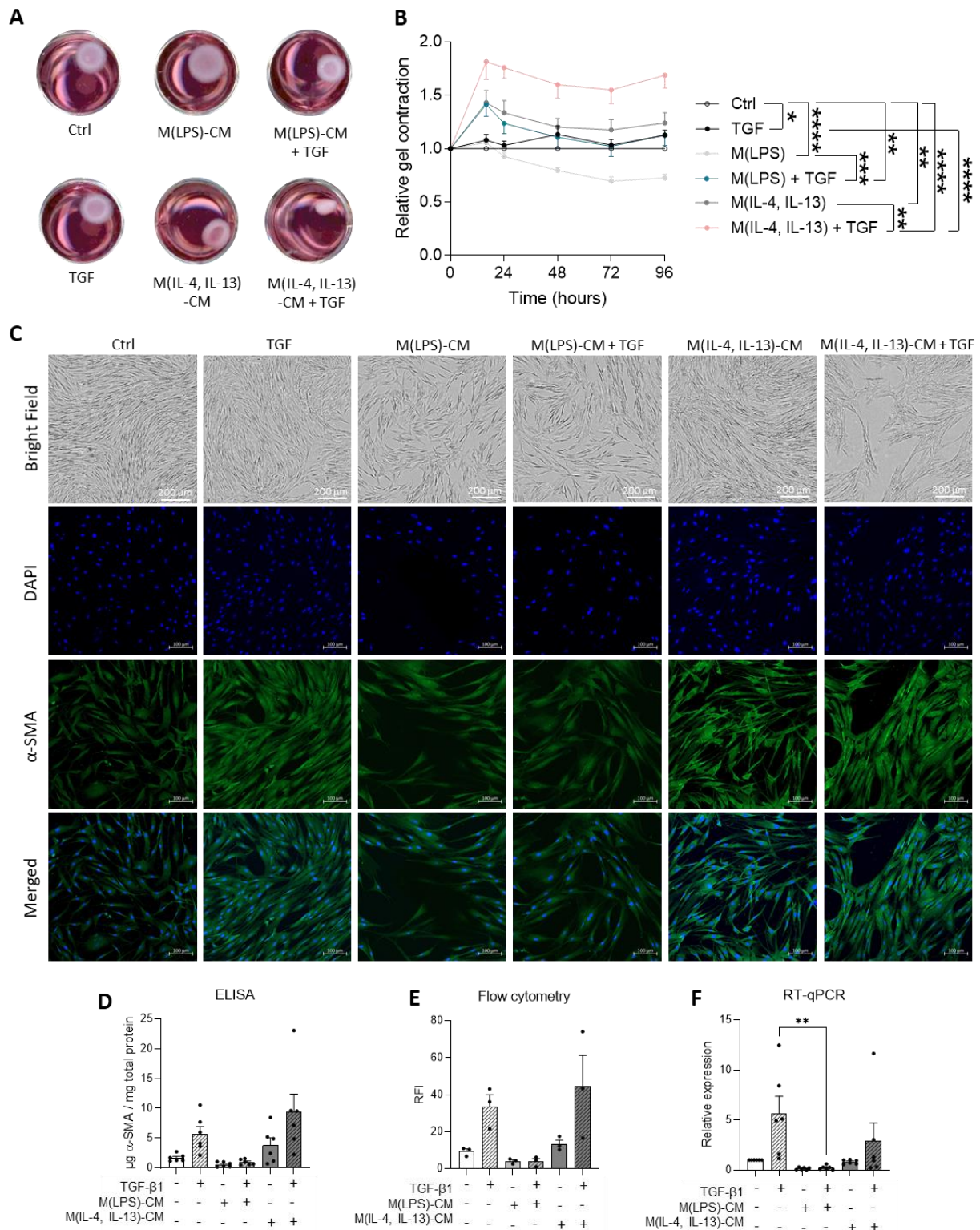


Figure 4. Effect of macrophages on fibroblast-to-myofibroblast transition depends on fibrotic microenvironment. (A-B) 3D collagen gels were used to evaluate the contractile activity of KFs treated with macrophage-CM. (A) Representative images of collagen gels after 96h of culture in tested conditions. (B) Relative gel contraction was expressed as a ratio of gel surface normalized to control at each time point [n=4 KF donors treated with 1 or 2 mix of CM, n=2 per condition]. (C-F) α -SMA expression was evaluated in treated KFs by immunostaining (C), ELISA (D), flow cytometry (E) and RT-qPCR (F) [n=3 KFs donors treated with 2 mix of CM for ELISA and RT-qPCR, and 1 mix for flow cytometry]. For immunofluorescence, cells were stained for α -SMA (green) and nuclei counterstained with DAPI (blue). Flow cytometry data are expressed as a relative fluorescent intensity (RFI) compared to unstained cells. Statistical analyses were performed using repeated measures two-way ANOVA showing overall differences between conditions over time (B) or with one-way ANOVA (C-F). Results are expressed as mean \pm SEM, and significance is indicated by asterisks: *for p<0.05; **for p<0.01; ***for p<0.001; ****for p<0.0001

M(IL-4, IL-13)-CM synergizes with TGF- β 1 to induce myofibroblast differentiation while M(LPS)-CM is able to block this differentiation. We analyzed the expression of α -SMA as a marker of fibroblast-to-myofibroblast differentiation by immunostaining, RT-qPCR, ELISA, and flow cytometry (Figure 4C-4F). The data revealed that KFs treated with TGF- β 1 or M(IL-4, IL-13)-CM + TGF- β 1 developed a myofibroblast-like morphology characterized by large stellate cells spreading in all directions (Figure 4C, top bright field images). α -SMA immunostaining showed an increase in protein expression when KFs were treated with TGF- β 1, M(IL-4, IL-13)-CM, or M(IL-4, IL-13)-CM + TGF- β 1. These observations were confirmed quantitatively by ELISA (Figure 4D). Interestingly, M(LPS)-CM was able to reverse α -SMA expression back to basal level in TGF- β 1-induced KFs (Figure 4D, 4E). These observations were confirmed at the mRNA levels by RT-qPCR (Figure 4F).

M(LPS)-CM attenuates TGF- β 1-induced matrix over accumulation in KFs. Quantitative analysis of Sirius red staining was used to evaluate the effect of M(LPS)-CM and M(IL-4, IL-13)-CM on total collagen deposition by KFs (Figure 5A-B). Our results showed that M(IL-4, IL-13)-CM significantly increased collagen content, whereas M(LPS)-CM had no effect compared to control condition. In a fibrotic environment, M(LPS)-CM maintained collagen deposition at basal levels, significantly counteracting the pro-fibrotic effects of TGF- β 1. M(IL-4, IL-13)-CM did not counteract the TGF- β 1-induced increase in collagen deposition, but increased the level of Sirius red-stained collagen compared to controls (Figure 5B). As shown in Figure 5C, TGF- β 1-activated KFs synthesized 2,5 times more procollagen on average than KFs cultured in control medium. However, there were no significant differences in soluble procollagen among the other conditions +/- TGF- β 1. At the transcriptional level (Figure 5D), we observed a trend for TGF- β 1 to upregulate COL1A1 gene transcription in KFs. This was also observed in M(IL-4, IL-13)-CM + TGF- β 1 treated KFs compared to controls. However, presumably due to variability among samples within each group, these observed differences did not reach statistical significance. M(LPS)-CM appeared to contribute to COL3A1 upregulation with or without TGF- β 1, but as with COL1A1, differences were not statistically significant due to intragroup variability. Moreover, our data show that M(LPS)-CM tends to decrease the COL1A1/COL3A1 ratio (Figure 5D). Assessment of fibronectin (FN1) protein synthesis or FN1 gene expression in KFs revealed that while TGF- β 1 was able to increase both gene and protein expression, neither M(LPS)-CM nor M(IL-4, IL-13)-CM modulates fibronectin expression, neither in basal nor pro-fibrotic (TGF- β 1) microenvironment (Figure 5E).

M(LPS)-CM orients KFs towards a fibrolytic phenotype. Collagenase activity, as well as the expression of genes coding for MMP-1, MMP-3 and TIMP-2 were assessed by zymography assay and RT-qPCR, respectively (Figure 6). Collagenase activity (Figure 6A) in KFs treated with M(LPS)-CM increased compared to untreated cells in pro-fibrotic conditions. This result was confirmed by a clear trend of MMP-1 and MMP-3 transcription to increase in M(LPS)-CM treated KFs (Figure 6B, 6C). M(IL-4, IL-13)-CM did not impact either collagenase activity or MMP gene expression. No significant differences in TIMP-2 mRNA expression were observed (Figure 6D).

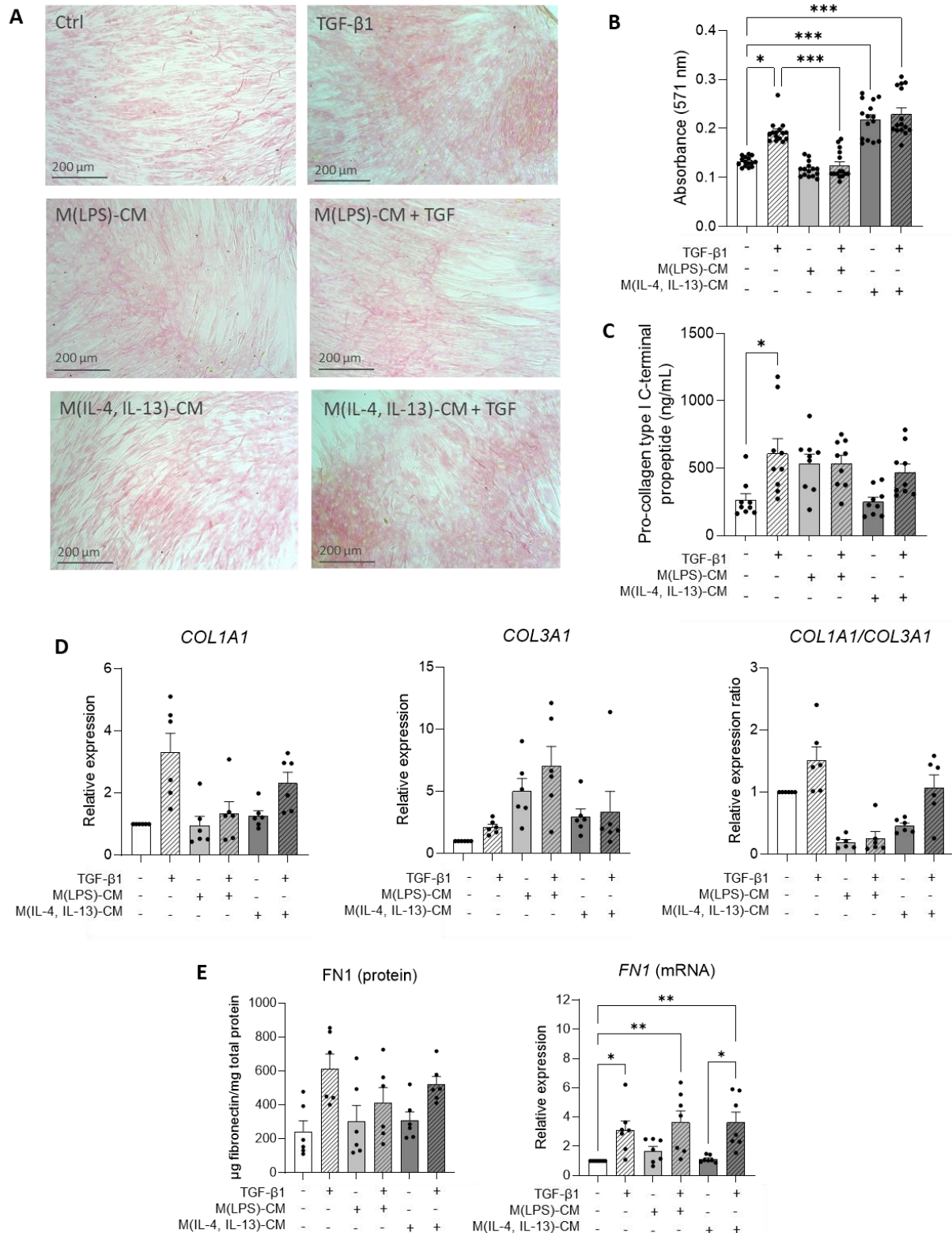


Figure 5. M(LPS)-CM attenuates TGF-β1-induced matrix over-accumulation in KFs. (A-B) Total deposited collagen by treated KFs was assessed by Sirius red staining and dye absorbance after elution (B) [n=3 KF donors treated with 1 mix of CM, n=5 per condition]. Representative images of stained ECM are presented (A). (C) Type I procollagen was quantified in the supernatant of treated KFs [n=4 KFs donors treated with 1 or 2 mix of CM, n=2 per condition]. (D) COL1A1 and COL3A1 mRNA transcription were quantified in 96h-treated-KFs [n=5 KF donors treated with 1 or 2 mix of CM] and data are presented independently or as COL1A1/COL3A1 ratio. (E) Fibronectin protein synthesis and mRNA expression were quantified in 96h-treated KFs using ELISA and RT-qPCR, respectively [n=5 KFs donors treated with 1 or 2 mix of CM]. Results are expressed as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA, and significance is indicated by asterisk: *for p<0.05; ***for p<0.001.

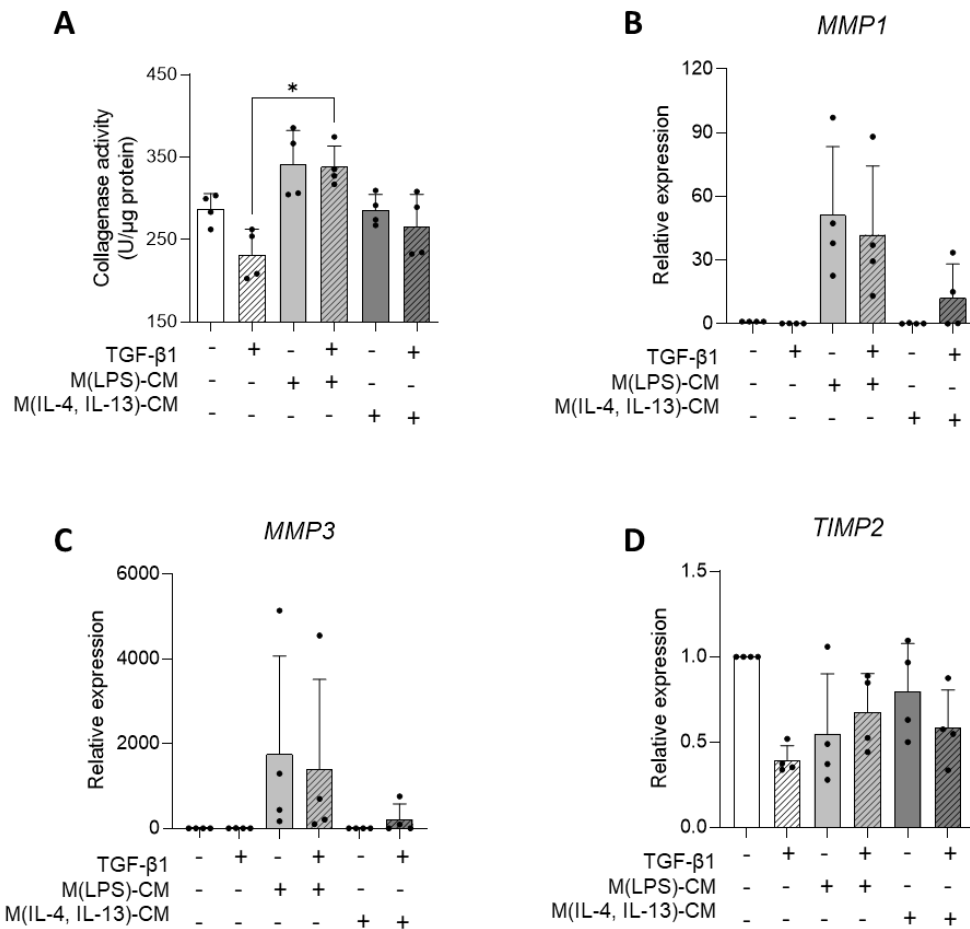


Figure 6. M(LPS)-CM orients KFs towards a fibrolytic phenotype. (A) Collagenase activity of treated-KFs was determined via zymography and is expressed as units of activity per μg total protein [n=4 KF donors treated with 1 mix of CM]. Relative expression of MMP1 (B) and MMP3 (C) and TIMP2 (D) mRNA in CM-treated KFs was assessed by RT-qPCR [n=4 KF donors treated with 1 mix of CM]. Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA, and significance is indicated by an asterisk: * for $p < 0.05$.

4. Discussion

Macrophages are versatile phagocytic cells that demonstrate a high degree of plasticity. Under the control of their microenvironment, macrophages can be polarized into distinct subsets, namely classically activated M1 (pro-inflammatory) and alternatively activated M2 (anti-inflammatory) macrophages. During the early phase of normal wound healing, M1 macrophages produce inflammatory cytokines, clean the wound by phagocytosis, and then switch towards an M2 phenotype. Mandatory for proper wound healing process, macrophages are also involved in fibrosis induction [49]. In response to a recently published hypothesis about the involvement of macrophages in fibrosis formation [35], we evaluated in vitro the effects of monocyte-derived M1- and M2-like macrophages on keloid fibroblasts. To this aim, we focused on the effect of the macrophages' secretome on fibrosis-related criteria in KFs (i.e., proliferation, migration, differentiation, ECM synthesis, and ECM remodeling), corresponding to key steps of the wound healing process that are dysregulated during keloid formation [50–52].

Prior to *in vitro* analysis, we confirmed histologically the persistence of type 2 macrophages in keloid tissue through the expression of CD206 and CD68, which are markers for M2 macrophages. Our results confirmed those already published by other researchers who demonstrated the high level of M2-type macrophages (CD206+, CD163+, and CD301b+) in keloid [13,24,36,37,53,54]. In line with previous works, we strongly suggest that an imbalance between M1 and M2 macrophage subset may contribute to keloid persistence.

To investigate the effects of differential macrophage microenvironments on the phenotype of keloid fibroblasts, we first generated M1 and M2 cells from human monocytes. We confirmed the efficiency of the production process of M1-like cells [M(LPS)] and M2-like cells [M(IL-4, IL-13)] by characterizing the cells' phenotypes and secretomes. We demonstrated that our M(LPS) have a pro-inflammatory profile, as they markedly synthesize pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8 and IL-1 β) and express high amounts of CD80 and iNOS markers [55–57]. We also observed that our M(IL-4, IL-13) are M2-like macrophages, as they express high level of CD206, CD163, and MerTK compared to M(LPS) macrophages [58,59], even though classical marker CCL1 was low expressed [58]. Surprisingly, we were not able to measure increased levels of TGF- β 1 in M(IL-4, IL-13)-CM. Although this result was somewhat unexpected, similar studies by other investigators have also shown relatively low levels of TGF- β 1 synthesized *in vitro* by M2 macrophages [60,61]. Consequently, our M(IL-4, IL-13) macrophages could be considered M2-like, although they are unable to be definitely assigned to any precise sub-phenotype (M2a, M2b, M2c, or M2d). However, our M(IL-4, IL-13) are most similar to the M2a macrophage subtype due to elevated expression of the mannose receptor CD206 in comparison to M1-like cells [62].

To investigate the secretome of our M1 and M2 macrophages, we treated keloid fibroblasts in cell culture with M(LPS) and M(IL-4, IL13) conditioned medium (CM) and investigated the effects on key features of wound healing: proliferation, migration, differentiation, ECM synthesis, and ECM remodeling. Moreover, we enriched our culture environment with TGF- β 1 to create a pro-fibrotic environment similar to those found in keloid tissue *in vivo*. On the one hand, we demonstrated that the fibrogenic profile of keloid fibroblasts is down regulated by the secretome of M1-like macrophages. We showed that M(LPS) interferes with KFs migration and proliferation, even under fibrotic conditions (TGF- β 1). Moreover, M(LPS)-CM was able to block fibroblast-to-myofibroblast differentiation as shown by analysis of α -SMA expression. The ability of KFs to remodel ECM, assessed using a gel contraction assay, was also reduced by M(LPS)-CM. M(LPS)-CM also attenuated TGF- β 1-induced matrix overaccumulation in KFs and orients KFs towards a fibrolytic phenotype by upregulating MMP-1 and -3 expression. On the other hand, we confirmed the pro-fibrogenic effect of our M2-like macrophages, which upregulated typical fibrosis-associated parameters in KFs. Indeed, we showed that M(IL-4, IL-13) macrophages exert a high chemoattractant activity on KFs and increase their migration capacities. In addition, M(IL-4, IL-13)-CM increased collagen synthesis and contractile activity, in KFs and synergized with TGF- β 1 to upregulate KFs myofibroblast differentiation. Combining these *in vitro* results with our histological observations suggests that the persistence of M2 macrophages could be responsible for KFs over-recruitment by chemo-attraction leading to excessive ECM deposition *in vivo*.

Song et al. explored the influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human lung fibroblasts [63]. They concluded that alternatively activated macrophages (M2) enhance fibrogenesis of fibroblasts, while classically activated macrophages (M1)

inhibit it. These observations were attributed to TGF- β and TNF- α release, respectively, by M2 and M1 macrophages. Recently, Sapudom et al. [64] focused on the effect of M2a and M2c macrophages in normal dermal fibroblasts (NDFs) and concluded that M2a macrophages could promote ECM synthesis and remodeling by induction of myofibroblast differentiation. Our results demonstrating the pro-fibrotic role of M(IL-4, IL-13) (M2-like macrophages) are also in accordance with previous work from Zhu et al. [65] who showed that alternatively activated M2 macrophages increased collagen synthesis in NDFs.

Our results seem somewhat contrary to those of Kurachi et al. [66], who reported that CD206+ macrophages were able to decrease collagen I and MMP-1 expression in NDFs through IL-6 production. While we agree with Kurachi et al. regarding the anti-fibrotic effect of IL-6, which was also demonstrated in our study, we are somewhat skeptical about their assumption regarding the identity of CD206+ cells. As shown in the current study, M1-like macrophages express CD206 but to a lesser degree than M2-like macrophages. Analysis of this single marker CD206, without direct comparison to other type(s) of macrophages, is not specific enough to conclusively define the polarization state of macrophages. We believe that the CD206+ cells described by Kurachi et al. [66] could actually be most similar to M(LPS) (M1-like macrophages) we generated here, given the similar profile in terms of IL-6 expression. Moreover, numerous publications support the anti-fibrogenic effect of M1-like macrophages on fibroblasts. Kähäri et al. showed that IL-1 β decreased NDF proliferation [67] and was able to limit or reverse TGF- β 1-induced fibroblast-to-myofibroblast differentiation in vitro [68]. Mia et al. showed that IL-1 β could decrease TGF- β 1-induced collagen I synthesis in NDFs and lung fibroblasts and inhibit lysyl oxidase production. In addition, IL-1 β was described favoring ECM degradation through the induction of MMP-1 and MMP-3 expression in lung and dermal fibroblasts [68–70]. According to other published studies, IL-6 is also able to decrease the proliferation of NDFs and lung fibroblasts in vitro [71,72], as well as fibroblasts from rheumatoid arthritis patients [73]. A similar effect was observed in vitro with IL-8 [71], which also increased the migration capacity of fibroblasts [74].

Broadly deciphering the contribution to keloid fibrogenesis of each cytokine detected in our conditioned media remains a challenge, especially considering data published about cytokines taken one by one. That is even more difficult knowing that no agreement is currently accepted about the anti- or pro-fibrotic profile of macrophages generated in vitro. Such effects are highly dependent on the cell origin as well as the differentiation protocol. That is why we defined here our macrophages with their differentiation inductors more than with classical M1/M2 nomenclature. Many previous publications focused on one or other cytokines without taking into account the whole complexity of the inflammatory or fibrotic keloid environment where many molecules are in synergistic or antagonistic interaction. For example, our study here demonstrated in vitro that M(LPS)-CM contains high IL-6 level but also exhibits anti-fibrotic abilities. However, in several studies, this cytokine has been described as pro-fibrotic, and the use of anti-IL-6 blocking antibodies has even been suggested as a therapeutic strategy [75]. Similarly, the IL-10 widely secreted by pro-fibrotic M2 macrophages has actually been shown to possess anti-fibrotic abilities. IL-10 is able to decrease α -SMA synthesis in NDFs and hypertrophic scars fibroblasts [76–78] by interfering in PI3K/AKT and STAT3 signaling pathways [79]. IL-10 also decreases KFs proliferation in vitro [80] and limits hypertrophic scars fibroblasts migration [81]. IL-10 also increased MMP-1 and MMP-8 expression on NDFs in vitro [78]. In contrast, our study demonstrated that secretome generated from M(IL-4, IL-13) has a pro-fibrogenetic effect even if IL-10 content is not higher than in M(LPS) one.

We identified some limitations to the current study that should be addressed. Although we performed extensive analyses of the monocyte-derived macrophages, future studies should include a wider panel of macrophage biomarkers to better identify immune cell subsets, in particular M2 macrophages (2a, 2b, 2c, 2d). Deeper immunohistological investigations in future studies would enable us to spatially correlate distribution of macrophages with respect to fibrotic ECM and activated fibroblasts, in keloids compared to physiological scars. Another limitation of the current study is that the tissue samples were collected from mature keloids. The ideal but hard-to-reach standard should be to collect tissue from keloids at different stages and time points during pathological development. However, this has been ethically challenging to perform, as any wounding to a keloid (including a collection of a tissue biopsy) can exacerbate the keloid's severity. Thus, most keloid research involves tissue excised during elective surgical procedures, which tend to involve more mature keloids. Although beyond the scope of the current study, proteomic analyses of the macrophage conditioned medium will be required to fully understand the relevant components and molecular interactions. Analyzing extracellular vesicles secreted by macrophages, and their contents should also help to identify bioactive agents and associated pathways involved in keloid fibroblast regulation [82]. Finally, we generated and polarized macrophages from monocytes obtained from healthy donors, rather than patients with keloids. In our study, we reduced the allogenic bias related to macrophage-fibroblast mismatch by using the macrophages' secretome rather than direct co-culture. However, we cannot discard the hypothesis that macrophages from keloid patients could present differences from their normal counterparts. Ideally, further investigations should utilize paired macrophages and fibroblasts, and compare macrophage functionalities from keloid patients with those isolated from non-affected patients.

The clinical relevance of our findings. In opposition to the M(IL-4,IL-13) pro-fibrotic effect on KFs we demonstrated here, the anti-fibrotic effect of M(LPS) macrophages could be transferred to the clinic as a potential novel therapeutic option in fibrosis prevention or treatment. Previous studies demonstrated an imbalance in type 1 and type 2 macrophage populations in keloid compared to normal tissue or physiological scars [13,24,38]. Although data on the subject are still incomplete, our work agrees with that of other groups and strongly suggests that keloid incidence might be related to a decrease in M1 populations and to an increase in M2 macrophage subsets (43). The histological results presented here are consistent with this hypothesis. Solving the problem of macrophage dysfunction could be an effective lever for the treatment of keloids by regulating the development of excessive fibrosis from the inflammation stage. Indeed, macrophages are the main immune cells involved in cutaneous wound healing and many studies have already addressed macrophage reprogramming in various pathologies, such as cancer and autoimmune diseases, as reviewed by Bart et al. [83]. For example, we propose intralesional injection of exosomes for local macrophage reprogramming [84]. Indeed, Kim et al. showed that M2 derived exosomes were able to induce a conversion of M1 to M2 macrophages that improved wound healing by enhancing angiogenesis, re-epithelialization, and collagen deposition in physiological conditions. Inversely, we therefore hypothesize that we could convert outnumbered M2 to M1 macrophages in keloid tissue using M1 derived exosomes to regulate the balance between pro- and anti-fibrotic macrophages.

For a long time, keloid fibroblasts (KFs) were solely studied as the main effectors of matrix deposition, although it is becoming increasingly clear that macrophages also have a determinant role in keloid pathogenesis. This role depends on their polarization, ranging from pro-inflammatory to pro-fibrotic effects. To our knowledge, we deciphered here for the first time the differential role of

macrophages in keloid formation through fibroblast regulation. We demonstrated the pro-fibrotic effect of M2-like macrophages on keloid fibroblasts, especially regarding ECM deposition. Interestingly, M1-like macrophages have an anti-fibrotic effect and the ability to attenuate TGF- β 1 activities in KFs. In conclusion, our study demonstrates how M1/M2 imbalance impacts keloid formation, and suggests pathways for translation of this knowledge for utilization of the M1 macrophage secretome as a biological agent to prevent or reverse fibrosis in keloid tissue.

Acknowledgements

Authors are thankful to the UMR 1098 RIGHT ATI team for fruitful scientific debate and discussion. The team warmly thank all patients who enrolled in the 'Scar Wars' clinical study. We also thank DimaCell Imaging Platform (University of Franche-Comté, UMR1098 RIGHT, 25000 Besançon, France) for technical support during Incucyte S3 and confocal microscopy experimentations. We thank the pathology laboratory for histological diagnosis (CHU de Besançon, France), specially Franck MONNIEN, for his kind help and extreme availability.

Founding sources

This research was funded by the Région Bourgogne Franche-Comté under the project Fibrolution [Envergure grant], by the CHU de Besançon under the project "Scar Wars" [APICHU, 2017 - ID-RCB 2016-A01579-42], and the Agence National de la Recherche (ANR) under the project "S-Keloid" [ANR-21-CE45-0025-03].

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- [1] ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics, (2023). <https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http%3a%2f%2fid.who.int%2fcd%2fentify%2f831995767> (accessed July 27, 2023).
- [2] R. Ogawa, Keloid and Hypertrophic Scars Are the Result of Chronic Inflammation in the Reticular Dermis, *Int J Mol Sci* 18 (2017) 606. <https://doi.org/10.3390/ijms18030606>.
- [3] S. Tan, N. Khumalo, A. Bayat, Understanding Keloid Pathobiology From a Quasi-Neoplastic Perspective: Less of a Scar and More of a Chronic Inflammatory Disease With Cancer-Like Tendencies, *Front Immunol* 10 (2019) 1810. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01810>.
- [4] S. Sitaniya, D. Subramani, A. Jadhav, Y.K. Sharma, M.S. Deora, A. Gupta, Quality-of-life of people with keloids and its correlation with clinical severity and demographic profiles, *Wound Repair Regen* 30 (2022) 409–416. <https://doi.org/10.1111/wrr.13015>.
- [5] W. Lu, H. Chu, X. Zheng, Effects on quality of life and psychosocial wellbeing in Chinese patients with keloids, *Am J Transl Res* 13 (2021) 1636–1642.
- [6] U. Betarbet, T.W. Blalock, Keloids: A Review of Etiology, Prevention, and Treatment, *J Clin Aesthet Dermatol* 13 (2020) 33–43.
- [7] G.C. Limandjaja, F.B. Niessen, R.J. Scheper, S. Gibbs, The Keloid Disorder: Heterogeneity, Histopathology, Mechanisms and Models, *Front Cell Dev Biol* 8 (2020) 360. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00360>.
- [8] M. Xue, C.J. Jackson, Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring, *Advances in Wound Care* 4 (2015) 119–136. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0485>.
- [9] P.D.H.M. Verhaegen, P.P.M. van Zuijlen, N.M. Pennings, J. van Marle, F.B. Niessen, C.M.A.M. van der Horst, E. Middelkoop, Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis, *Wound Repair Regen* 17 (2009) 649–656. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00533.x>.
- [10] D. Ulrich, F. Ulrich, F. Unglaub, A. Piatkowski, N. Pallua, Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with different types of scars and keloids, *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 63 (2010) 1015–1021. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2009.04.021>.

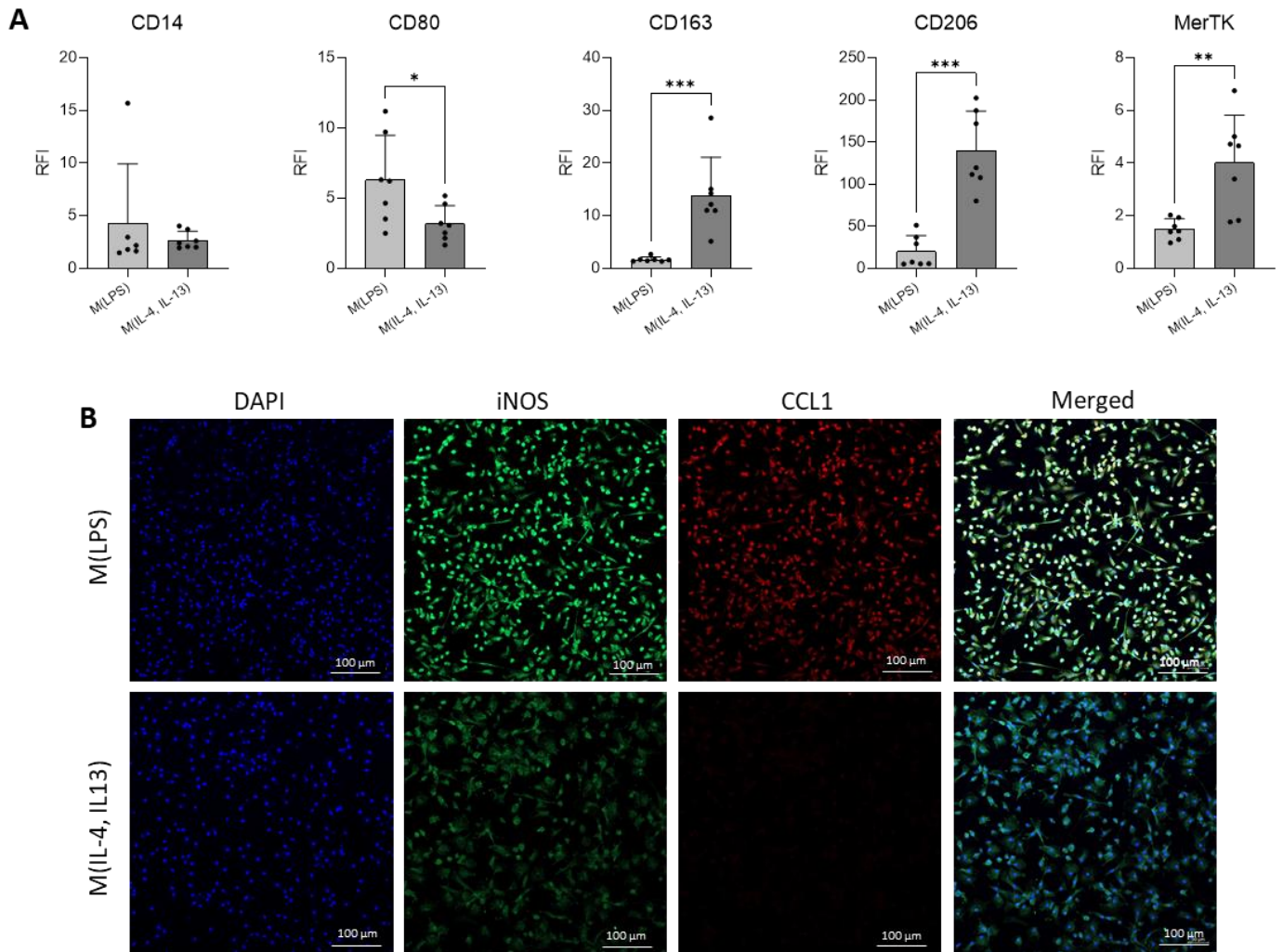
- [11] E.A. Kogan, V.V. Andreeva, I.V. Reshetov, T.A. Demura, N.V. Zharkov, [Morphogenetic and pathogenetic features of hypertrophic and keloid scars of the head and neck], *Arkh Patol* 84 (2022) 23–31. <https://doi.org/10.17116/patol20228406123>.
- [12] S. Tanriverdi-Akhisaroglu, A. Menderes, G. Oktay, Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities in human keloids, hypertrophic and atrophic scars: a pilot study, *Cell Biochem Funct* 27 (2009) 81–87. <https://doi.org/10.1002/cbf.1537>.
- [13] S.A. Shaker, N.N. Ayuob, N.H. Hajrah, Cell talk: a phenomenon observed in the keloid scar by immunohistochemical study, *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 19 (2011) 153–159. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e3181efa2ef>.
- [14] C.C. Chipev, R. Simman, G. Hatch, A.E. Katz, D.M. Siegel, M. Simon, Myofibroblast phenotype and apoptosis in keloid and palmar fibroblasts in vitro, *Cell Death Differ* 7 (2000) 166–176. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400605>.
- [15] Y. Xin, X. Wang, M. Zhu, M. Qu, M. Bogari, L. Lin, Z. Mar Aung, W. Chen, X. Chen, G. Chai, Y. Zhang, Expansion of CD26 positive fibroblast population promotes keloid progression, *Exp Cell Res* 356 (2017) 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.04.021>.
- [16] M.-Z. Zhang, X.-H. Dong, E.-L. Guan, L.-B. Si, R.-Q. Zhuge, P.-X. Zhao, X. Zhang, M.-Y. Liu, Y.M. Adzavon, X. Long, Z. Qi, X. Wang, A comparison of apoptosis levels in keloid tissue, physiological scars and normal skin, *Am J Transl Res* 9 (2017) 5548–5557.
- [17] C.C. Chipev, M. Simon, Phenotypic differences between dermal fibroblasts from different body sites determine their responses to tension and TGF β 1, *BMC Dermatology* 2 (2002) 13. <https://doi.org/10.1186/1471-5945-2-13>.
- [18] A. Biernacka, M. Dobaczewski, N.G. Frangogiannis, TGF- β signaling in fibrosis, *Growth Factors* 29 (2011) 196–202. <https://doi.org/10.3109/08977194.2011.595714>.
- [19] J.P. Andrews, J. Marttala, E. Macarak, J. Rosenbloom, J. Uitto, Keloids: The paradigm of skin fibrosis - Pathomechanisms and treatment, *Matrix Biol* 51 (2016) 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.01.013>.
- [20] G.S. Chin, W. Liu, Z. Peled, T.Y. Lee, D.S. Steinbrech, M. Hsu, M.T. Longaker, Differential expression of transforming growth factor-beta receptors I and II and activation of Smad 3 in keloid fibroblasts, *Plast Reconstr Surg* 108 (2001) 423–429. <https://doi.org/10.1097/00006534-200108000-00022>.
- [21] K.J. Ashcroft, F. Syed, A. Bayat, Site-specific keloid fibroblasts alter the behaviour of normal skin and normal scar fibroblasts through paracrine signalling, *PLoS One* 8 (2013) e75600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075600>.
- [22] Z. Chen, L. Zhou, T. Won, Z. Gao, X. Wu, L. Lu, Characterization of CD45RO+ memory T lymphocytes in keloid disease, *Br J Dermatol* 178 (2018) 940–950. <https://doi.org/10.1111/bjd.16173>.
- [23] S.S. Craig, G. DeBlois, L.B. Schwartz, Mast cells in human keloid, small intestine, and lung by an immunoperoxidase technique using a murine monoclonal antibody against tryptase, *Am J Pathol* 124 (1986) 427–435.
- [24] X. Li, Y. Wang, B. Yuan, H. Yang, L. Qiao, Status of M1 and M2 type macrophages in keloid, *Int J Clin Exp Pathol* 10 (2017) 11098–11105.
- [25] H. Jiao, J. Fan, J. Cai, B. Pan, L. Yan, P. Dong, X. Zong, C. Gan, R. Xiao, Analysis of Characteristics Similar to Autoimmune Disease in Keloid Patients, *Aesthetic Plast Surg* 39 (2015) 818–825. <https://doi.org/10.1007/s00266-015-0542-4>.
- [26] N. Jumper, R. Paus, A. Bayat, Functional histopathology of keloid disease, *Histol Histopathol* 30 (2015) 1033–1057. <https://doi.org/10.14670/HH-11-624>.
- [27] T.A. Wynn, L. Barron, Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis, *Semin Liver Dis* 30 (2010) 245–257. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1255354>.
- [28] T.T. Braga, J.S.H. Agudelo, N.O.S. Camara, Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe, *Frontiers in Immunology* 6 (2015). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00602> (accessed September 27, 2022).
- [29] Z.-C. Wang, W.-Y. Zhao, Y. Cao, Y.-Q. Liu, Q. Sun, P. Shi, J.-Q. Cai, X.Z. Shen, W.-Q. Tan, The Roles of Inflammation in Keloid and Hypertrophic Scars, *Front Immunol* 11 (2020) 603187. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.603187>.
- [30] Z.-Q. Lin, T. Kondo, Y. Ishida, T. Takayasu, N. Mukaida, Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice, *J Leukoc Biol* 73 (2003) 713–721. <https://doi.org/10.1189/jlb.0802397>.
- [31] G.S. Ashcroft, M.-J. Jeong, J.J. Ashworth, M. Hardman, W. Jin, N. Moutsopoulos, T. Wild, N. McCartney-Francis, D. Sim, G. McGrady, X. Song, S.M. Wahl, TNF α is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing, *Wound Repair Regen* 20 (2012) 38–49. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2011.00748.x>.
- [32] M.C. Greenlee-Wacker, Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation, *Immunol Rev* 273 (2016) 357–370. <https://doi.org/10.1111/imr.12453>.
- [33] S.Y. Kim, M.G. Nair, Macrophages in wound healing: activation and plasticity, *Immunol Cell Biol* 97 (2019) 258–267. <https://doi.org/10.1111/imcb.12236>.
- [34] L. Lis-López, C. Bauset, M. Seco-Cervera, J. Cosín-Roger, Is the Macrophage Phenotype Determinant for Fibrosis Development?, *Biomedicines* 9 (2021) 1747. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121747>.
- [35] M. Bhattacharya, P. Ramachandran, Immunology of human fibrosis, *Nat Immunol* (2023). <https://doi.org/10.1038/s41590-023-01551-9>.
- [36] R. Bagabir, R.J. Byers, I.H. Chaudhry, W. Müller, R. Paus, A. Bayat, Site-specific immunophenotyping of keloid disease demonstrates immune upregulation and the presence of lymphoid aggregates, *Br J Dermatol* 167 (2012) 1053–1066. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.11190.x>.
- [37] C. Feng, M. Shan, Y. Xia, Z. Zheng, K. He, Y. Wei, K. Song, T. Meng, H. Liu, Y. Hao, Z. Liang, Y. Wang, Y. Huang, Single-cell RNA sequencing reveals distinct immunology profiles in human keloid, *Front Immunol* 13 (2022) 940645. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.940645>.

- [38] W.M. Seoudy, S.M. Mohy El Dien, T.A. Abdel Reheem, M.M. Elfangary, M.A. Erfan, Macrophages of the M1 and M2 types play a role in keloids pathogenesis, *International Wound Journal* n/a (n.d.). <https://doi.org/10.1111/iwj.13834>.
- [39] K.Y. DeLeon-Pennell, T.H. Barker, M.L. Lindsey, Fibroblasts: The arbiters of extracellular matrix remodeling, *Matrix Biol* 91–92 (2020) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2020.05.006>.
- [40] M. Shan, Y. Wang, Viewing keloids within the immune microenvironment, *Am J Transl Res* 14 (2022) 718–727.
- [41] G.C. Limandjaja, T. Waaijman, S. Roffel, F.B. Niessen, S. Gibbs, Monocytes co-cultured with reconstructed keloid and normal skin models skew towards M2 macrophage phenotype, *Arch Dermatol Res* 311 (2019) 615–627. <https://doi.org/10.1007/s00403-019-01942-9>.
- [42] A. Frafjord, R. Skarshaug, C. Hammarström, B. Stankovic, L.T. Dorg, H. Aamodt, P.R. Woldbaek, Å. Helland, O.T. Brustugun, I. Øynebråten, A. Corthay, Antibody combinations for optimized staining of macrophages in human lung tumours, *Scand J Immunol* 92 (2020) e12889. <https://doi.org/10.1111/sji.12889>.
- [43] Z.-J. Xu, Y. Gu, C.-Z. Wang, Y. Jin, X.-M. Wen, J.-C. Ma, L.-J. Tang, Z.-W. Mao, J. Qian, J. Lin, The M2 macrophage marker CD206: a novel prognostic indicator for acute myeloid leukemia, *Oncoimmunology* 9 (2020) 1683347. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1683347>.
- [44] M. Maraux, A. Gaillardet, A. Gally, P. Saas, T. Cherrier, Human primary neutrophil mRNA does not contaminate human resolving macrophage mRNA after efferocytosis, *J Immunol Methods* 483 (2020) 112810. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2020.112810>.
- [45] P. Marty, B. Chatelain, T. Lihoreau, M. Tissot, Z. Dirand, P. Humbert, C. Senez, E. Secomandi, C. Isidoro, G. Rolin, Halofuginone regulates keloid fibroblast fibrotic response to TGF- β induction, *Biomed Pharmacother* 135 (2021) 111182. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111182>.
- [46] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods* 25 (2001) 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [47] D. Suttho, S. Mankhetkorn, D. Binda, L. Pazart, P. Humbert, G. Rolin, 3D modeling of keloid scars in vitro by cell and tissue engineering, *Arch Dermatol Res* 309 (2017) 55–62. <https://doi.org/10.1007/s00403-016-1703-2>.
- [48] P.C. Trackman, D. Saxena, M.V. Bais, TGF- β 1- and CCN2-Stimulated Sirius Red Assay for Collagen Accumulation in Cultured Cells, *Methods Mol Biol* 1489 (2017) 481–485. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6430-7_39.
- [49] P. Krzyszczyk, R. Schloss, A. Palmer, F. Berthiaume, The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes, *Front Physiol* 9 (2018) 419. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00419>.
- [50] J.P. Andrews, J. Marttala, E. Macarak, J. Rosenbloom, J. Uitto, Keloids: The paradigm of skin fibrosis – pathomechanisms and treatment, *Matrix Biol* 51 (2016) 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.01.013>.
- [51] A.J. Cohen, N. Nikbakht, J. Uitto, Keloid Disorder: Genetic Basis, Gene Expression Profiles, and Immunological Modulation of the Fibrotic Processes in the Skin, *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2022) a041245. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041245>.
- [52] M.-L. Bochaton-Piallat, G. Gabbiani, B. Hinz, The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions, *F1000Res* 5 (2016) F1000 Faculty Rev-752. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8190.1>.
- [53] H. Chao, L. Zheng, P. Hsu, J. He, R. Wu, S. Xu, R. Zeng, Y. Zhou, H. Ma, H. Liu, Q. Tang, IL-13RA2 downregulation in fibroblasts promotes keloid fibrosis via JAK/STAT6 activation, *JCI Insight* 8 (2023) e157091. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.157091>.
- [54] B.A. Shook, R.R. Wasko, G.C. Rivera-Gonzalez, E. Salazar-Gatzimas, F. López-Giráldez, B.C. Dash, A.R. Muñoz-Rojas, K.D. Aultman, R.K. Zwick, V. Lei, J.L. Arbiser, K. Miller-Jensen, D.A. Clark, H.C. Hsia, V. Horsley, Myofibroblast proliferation and heterogeneity are supported by macrophages during skin repair, *Science* 362 (2018) eaar2971. <https://doi.org/10.1126/science.aar2971>.
- [55] A. Khan, K. Zhang, V.K. Singh, A. Mishra, P. Kachroo, T. Bing, J.H. Won, A. Mani, R. Papanna, L.K. Mann, E. Ledezma-Campos, G. Aguillon-Duran, D.H. Canaday, S.A. David, B.I. Restrepo, N.N. Viet, H. Phan, E.A. Graviss, J.M. Musser, D. Kaushal, M.C. Gauduin, C. Jagannath, Human M1 macrophages express unique innate immune response genes after mycobacterial infection to defend against tuberculosis, *Commun Biol* 5 (2022) 1–19. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03387-9>.
- [56] Y.-C. Liu, X.-B. Zou, Y.-F. Chai, Y.-M. Yao, Macrophage polarization in inflammatory diseases, *Int J Biol Sci* 10 (2014) 520–529. <https://doi.org/10.7150/ijbs.8879>.
- [57] M. Sioud, S. Pettersen, I. Ailte, Y. Fløisand, Targeted Killing of Monocytes/Macrophages and Myeloid Leukemia Cells with Pro-Apoptotic Peptides, *Cancers (Basel)* 11 (2019) 1088. <https://doi.org/10.3390/cancers11081088>.
- [58] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, M. Locati, The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization, *Trends Immunol* 25 (2004) 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>.
- [59] M.L. Novak, T.J. Koh, Macrophage phenotypes during tissue repair, *J Leukoc Biol* 93 (2013) 875–881. <https://doi.org/10.1189/jlb.1012512>.
- [60] Z. Liu, W. Kuang, Q. Zhou, Y. Zhang, TGF- β 1 secreted by M2 phenotype macrophages enhances the stemness and migration of glioma cells via the SMAD2/3 signalling pathway, *International Journal of Molecular Medicine* 42 (2018) 3395–3403. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3923>.
- [61] X. Song, Y. Shi, J. You, Z. Wang, L. Xie, C. Zhang, J. Xiong, D-4F, an apolipoprotein A-I mimetic, suppresses IL-4 induced macrophage alternative activation and pro-fibrotic TGF- β 1 expression, *Pharm Biol* 57 (2019) 470–476. <https://doi.org/10.1080/13880209.2019.1640747>.

- [62] L. Martinez-Pomares, The mannose receptor, *J Leukoc Biol* 92 (2012) 1177–1186. <https://doi.org/10.1189/jlb.0512231>.
- [63] E. Song, N. Ouyang, M. Hörbelt, B. Antus, M. Wang, M.S. Exton, Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts, *Cell. Immunol.* 204 (2000) 19–28. <https://doi.org/10.1006/cimm.2000.1687>.
- [64] J. Sapudom, S. Karaman, W.K.E. Mohamed, A. Garcia-Sabaté, B.C. Quartey, J.C.M. Teo, 3D in vitro M2 macrophage model to mimic modulation of tissue repair, *Npj Regen Med* 6 (2021) 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00193-5>.
- [65] Z. Zhu, J. Ding, Z. Ma, T. Iwashina, E.E. Tredget, Alternatively activated macrophages derived from THP-1 cells promote the fibrogenic activities of human dermal fibroblasts, *Wound Repair Regen* 25 (2017) 377–388. <https://doi.org/10.1111/wrr.12532>.
- [66] I. Kurachi, E. Kurita, A. Takushima, H. Suga, Human CD206+ Macrophages Show Antifibrotic Effects on Human Fibroblasts via an IL-6-Dependent Mechanism In Vitro, *Plast Reconstr Surg* (2020). <https://doi.org/10.1097/PRS.00000000000007563>.
- [67] V.M. Kähäri, J. Heino, E. Vuorio, Interleukin-1 increases collagen production and mRNA levels in cultured skin fibroblasts, *Biochim Biophys Acta* 929 (1987) 142–147. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(87\)90169-8](https://doi.org/10.1016/0167-4889(87)90169-8).
- [68] M.M. Mia, M. Boersema, R.A. Bank, Interleukin-1 β Attenuates Myofibroblast Formation and Extracellular Matrix Production in Dermal and Lung Fibroblasts Exposed to Transforming Growth Factor- β 1, *PLOS ONE* 9 (2014) e91559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091559>.
- [69] D.T. Ploeger, N.A. Hosper, M. Schipper, J.A. Koerts, S. de Rond, R.A. Bank, Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts, *Cell Commun. Signal* 11 (2013) 29. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-29>.
- [70] M. Sasaki, M. Kashima, T. Ito, A. Watanabe, N. Izumiyama, M. Sano, M. Kagaya, T. Shioya, M. Miura, Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human lung fibroblasts by PDGF, interleukin-1beta and TNF-alpha, *Mediators Inflamm* 9 (2000) 155–160. <https://doi.org/10.1080/09629350020002895>.
- [71] J. Zhang, L. Wu, J.-M. Qu, Inhibited proliferation of human lung fibroblasts by LPS is through IL-6 and IL-8 release, *Cytokine* 54 (2011) 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.02.018>.
- [72] M. Mihara, Y. Moriya, Y. Ohsugi, IL-6-soluble IL-6 receptor complex inhibits the proliferation of dermal fibroblasts, *Int J Immunopharmacol* 18 (1996) 89–94. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(95\)00106-9](https://doi.org/10.1016/0192-0561(95)00106-9).
- [73] N. Nishimoto, A. Ito, M. Ono, H. Tagoh, T. Matsumoto, T. Tomita, T. Ochi, K. Yoshizaki, IL-6 inhibits the proliferation of fibroblastic synovial cells from rheumatoid arthritis patients in the presence of soluble IL-6 receptor, *Int Immunol* 12 (2000) 187–193. <https://doi.org/10.1093/intimm/12.2.187>.
- [74] C. Ling, K. Nishimoto, Z. Rolfs, L.M. Smith, B.L. Frey, N.V. Welham, Differentiated fibrocytes assume a functional mesenchymal phenotype with regenerative potential, *Sci Adv* 5 (2019) eaav7384. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav7384>.
- [75] M. Ghazizadeh, Essential role of IL-6 signaling pathway in keloid pathogenesis, *J Nippon Med Sch* 74 (2007) 11–22. <https://doi.org/10.1272/jnms.74.11>.
- [76] K. Yamane, H. Ihn, Y. Asano, M. Jinnin, K. Tamaki, Antagonistic effects of TNF-alpha on TGF-beta signaling through down-regulation of TGF-beta receptor type II in human dermal fibroblasts, *J Immunol* 171 (2003) 3855–3862. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.7.3855>.
- [77] M.T. Goldberg, Y.-P. Han, C. Yan, M.C. Shaw, W.L. Garner, TNF- α Suppresses α -Smooth Muscle Actin Expression in Human Dermal Fibroblasts: An Implication for Abnormal Wound Healing, *J Invest Dermatol* 127 (2007) 2645–2655. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700890>.
- [78] J.-H. Shi, H. Guan, S. Shi, W.-X. Cai, X.-Z. Bai, X.-L. Hu, X.-B. Fang, J.-Q. Liu, K. Tao, X.-X. Zhu, C.-W. Tang, D.-H. Hu, Protection against TGF- β 1-induced fibrosis effects of IL-10 on dermal fibroblasts and its potential therapeutics for the reduction of skin scarring, *Arch Dermatol Res* 305 (2013) 341–352. <https://doi.org/10.1007/s00403-013-1314-0>.
- [79] J. Shi, J. Li, H. Guan, W. Cai, X. Bai, X. Fang, X. Hu, Y. Wang, H. Wang, Z. Zheng, L. Su, D. Hu, X. Zhu, Anti-Fibrotic Actions of Interleukin-10 against Hypertrophic Scarring by Activation of PI3K/AKT and STAT3 Signaling Pathways in Scar-Forming Fibroblasts, *PLoS One* 9 (2014) e98228. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098228>.
- [80] C.-K. Shi, Y.-P. Zhao, P. Ge, G.-B. Huang, Therapeutic effect of interleukin-10 in keloid fibroblasts by suppression of TGF- β /Smad pathway, *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23 (2019) 9085–9092. https://doi.org/10.26355/eurrev_201910_19311.
- [81] R. Zhou, C. Wang, D. Lv, Y. Sun, Y. Liang, TNF- α inhibits fibrosis and migration of fibroblasts in hypertrophic scar by miR-141-3p, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 53 (2021) 1106–1108. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmab086>.
- [82] Y. Wang, M. Zhao, S. Liu, J. Guo, Y. Lu, J. Cheng, J. Liu, Macrophage-derived extracellular vesicles: diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases, *Cell Death Dis* 11 (2020) 924. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03127-z>.
- [83] V.M.T. Bart, R.J. Pickering, P.R. Taylor, N. Ipseiz, Macrophage reprogramming for therapy, *Immunology* 163 (2021) 128–144. <https://doi.org/10.1111/imm.13300>.
- [84] H. Kim, S.Y. Wang, G. Kwak, Y. Yang, I.C. Kwon, S.H. Kim, Exosome-Guided Phenotypic Switch of M1 to M2 Macrophages for Cutaneous Wound Healing, *Advanced Science* 6 (2019) 1900513. <https://doi.org/10.1002/advs.201900513>.
-

SUPPLEMENTARY TABLES

Supp. Data I. Macrophages phenotype characterization



(A) Macrophages surface biomarkers were characterized by flow cytometry and levels of expression were expressed as RFI (Relative Fluorescent Intensity, in arbitrary units) compared to unstained cells [n=7 monocyte donors]. Statistical analyses were performed using t test, and significance is indicated by asterisks: * for $p < 0.05$; ** for $p < 0.01$; *** for $p < 0.001$. **(B)** Macrophage phenotypes were confirmed using immunofluorescence targeting iNOS (green) and CCL1 (red). Nuclei were counterstained with DAPI (blue).

Supp. Table I. List of reagents

	Reference	Supplier	Working concentration
Macrophages generation and differentiation			
CD14 beads	130-050-201	Miltenyi	
LS columns	130-042-401	Miltenyi	
Human recombinant GM-CSF	130-093-866	Miltenyi	50 ng/mL
Human recombinant IFN γ	130-096-481	Miltenyi	50 ng/mL
Human recombinant IL-4	130-093-922	Miltenyi	50 ng/mL
Human recombinant M-CSF	130-096-492	Miltenyi	50 ng/mL
Human recombinant IL-13	130-112-411	Miltenyi	20 ng/mL
Lipopolysaccharide from <i>e.coli</i> O55:B5	L6529	Sigma	100 ng/mL
Fibroblast culture			
Trypsin-EDTA	P10-023100	Dutscher	
Dulbecco Modified Eagle's Medium	P04-05540	Dutscher	
Phosphate Buffer Saline	P04-36500	Dutscher	
Foetal Calf Serum	S1810-500	Dutscher	5 %
Human recombinant TGF- β 1	240-B-002	R&D Systems	10 ng/mL
Immunostaining			
4% Paraformaldehyde	1.00496.0700	Sigma	
Triton X100	T9284	Sigma	0,1-1 %
Bovine Serum Albumin	A3294	Sigma	1-10 %
Goat serum	S26	Sigma	10 %
Mouse anti-human α -SMA	A2547	Sigma	1/100 ^e
Mouse anti-human iNOS	MA5-17139	Invitrogen	1/200 ^e
Rabbit anti-human CD206	PA5-82136	Invitrogen	1/500 ^e
Mouse anti-human CD68	IR613	Agilent	pure
Goat anti-Mouse IgG (Fab specific) F(ab') ₂ fragment-FITC antibody	F8521	Sigma	1/100 ^e
Goat anti-Rabbit IgG (Fab specific) F(ab') ₂ fragment-rhodamine antibody	AP307R	Sigma	1/100 ^e
DAPI	D9542	Sigma	1/100 ^e
CC1 (<i>Cell Conditioning solution</i>) buffer	950-124	BenchMark Series	
Flow cytometry staining			
Human Fc block CD16/32	553141	Becton Dickinson	1/100 ^e
BB515 anti-human CD206	564668	Becton Dickinson	1/100 ^e
PE-CF594 anti-human CD14	562335	Becton Dickinson	1/100 ^e
Alexa Fluor 647 anti-human CD163	562669	Becton Dickinson	1/100 ^e
BV510 anti-human CD80	2126110	Sony	1/100 ^e
PE anti-human MerTK	2438040	Sony	1/100 ^e
FITC anti-human α -SMA	F3777	Sigma	1/100 ^e

PE-CF594 anti-human CD26	565158	Becton Dickinson	1/100 ^e
PE-Cy7 anti-human CD90	561558	Becton Dickinson	1/100 ^e
PE anti-human FAP	FAB3715P	R&D systems	1/100 ^e
PerCP-Cy5.5 anti-human TGF- β 1	562423	Becton Dickinson	1/100 ^e
APC anti-human TGF β RII	FAB241A	R&D systems	1/100 ^e
UltraPure 0,5M EDTA	15575-038	Invitrogen	
Fixation/Permeabilization Concentrate	2473657	Invitrogen	
Fix/Perm Diluent	2430406	Invitrogen	
Permeabilization Buffer 10X	2450734	Invitrogen	1X

Cytokine quantification

CBA Human Inflammatory Cytokines	551811	Becton Dickinson	
TGF- β 1 ELISA		R&D systems	

Cell proliferation and migration

Mitomycin C	M4287	Sigma	5 μ g/mL
BrDU proliferation kit	11647229001	Roche	

Fibroblast activation

α -SMA ELISA kit	ab240678	Abcam	
PICP ELISA	DY6220-05	R&D Systems	
Fibronectin ELISA	ab219046	Abcam	
Type I collagen from rat tail	207050257	Jacques Boy	
Direct Red 80 (Sirius Red)	365548	Sigma	1 mg/mL
Collagenase Zymography kit	ab234624	Abcam	
Pierce solution	C2284 and B9643	Sigma	

RT-qPCR

RNeasy mini kit	74104	Qiagen	
High capacity RNA to cDNA kit	4387406	ThermoFischer	
Taqman gene expression master mix	4369016	ThermoFischer	

Collagenase activity

Collagen Zymography Assay Kit	ab234624	Abcam	
-------------------------------	----------	-------	--

Supp. Table II. Details of human samples processed for cell extraction or immunohistochemical analysis

Sample type	Used for	Body location	Sex	Age
Keloid	KFs extraction	Earlobe	F	22
Keloid	KFs extraction	Earlobe	F	22
Keloid	KFs extraction	Earlobe	F	46
Keloid	KFs extraction	Earlobe	M	22
Keloid	KFs extraction	Earlobe	F	19
Keloid	Immunohistochemistry	Back	F	23
Keloid	Immunohistochemistry	Back of the ear	M	28
Keloid	Immunohistochemistry	Cheek	F	21
Keloid	Immunohistochemistry	Earlobe	F	42
Keloid	Immunohistochemistry	Back of the ear	M	50
Keloid	Immunohistochemistry	Back of the ear	F	7
Keloid	Immunohistochemistry	Earlobe	F	22
LPC	Macrophages generation	Blood	F	52
LPC	Macrophages generation	Blood	F	25
LPC	Macrophages generation	Blood	M	43
LPC	Macrophages generation	Blood	F	53
LPC	Macrophages generation	Blood	F	52
LPC	Macrophages generation	Blood	F	63
LPC	Macrophages generation	Blood	M	60
LPC	Macrophages generation	Blood	M	21
LPC	Macrophages generation	Blood	M	66

*LPC = Leukocyte-platelet concentrates

Supp. Table III. List of TaqMan probes

	Gene	Reference
Myofibroblast marker		
α -Smooth Muscle Actin	<i>ACTA2</i>	Hs00426835_g1
ECM proteins		
Type I collagen	<i>COL1A1</i>	Hs00164004_m1
Type III collagen	<i>COL3A1</i>	Hs00164103_m1
Fibronectin	<i>FN1</i>	Hs01549976_m1
Matrix remodeling enzymes		
MMP1	<i>MMP1</i>	Hs00899658_m1
MMP3	<i>MMP3</i>	Hs00968305_m1
TIMP2	<i>TIMP2</i>	Hs00234278_m1

3.3. Conclusion de l'étude

Les travaux présentés ci-dessus nous ont permis de démontrer l'impact du phénotype des macrophages sur le profil fibrogénique du fibroblaste dans le développement de la fibrose chéloïdienne. Nous avons en effet montré *in vitro* que les macrophages de type M2-like [M(IL-4, IL-13)] sont capables d'induire le profil fibrogénique des FC en favorisant leur capacité de migration, leur activité contractile, ainsi que la synthèse et le dépôt de collagène. Concernant les macrophages de type M1-like [M(LPS)], ceux-ci se sont révélés posséder un fort effet anti-fibrotique sur les FC, et ce même dans un environnement pro-fibrotique simulé par l'apport de TGF- β 1 dans l'environnement de culture cellulaire. Le sécrétome de nos M1 était en outre capable de prévenir la synthèse d' α -SMA et de collagène pourtant fortement induite en conditions pro-fibrotiques dans les FC. Le sécrétome de M1 a également montré des capacités à diminuer la prolifération des fibroblastes, leurs fonctions migratoires et contractiles.

Bien que les effets des macrophages de type M1 et M2, respectivement anti- et pro-fibrotiques, aient déjà été décrits dans plusieurs maladies à composante fibreuse^{372,374,477}, notre étude est à notre connaissance la première à démontrer *in vitro* leur rôle dans le développement de la fibrose chéloïdienne. En nous appuyant sur les données de la littérature, nous suggérons de plus que le contenu moléculaire du sécrétome de M1 (IL-1 β , IL-8 et TNF- α) est en partie responsable de son activité anti-fibrotique. Une analyse plus poussée du contenu vésiculaire et protéomique des sécrétomes de macrophages serait néanmoins nécessaire afin de déterminer complètement le contenu de ces surnageants et les mécanismes impliqués dans la régulation du phénotype des FC. En mettant en parallèle nos données obtenues *in vitro* et les données *in vivo* disponibles dans la littérature, l'accumulation de macrophages de type M2 pro-fibrotiques au sein du tissu chéloïdien serait alors contributrice de l'activation excessive des FC et du dépôt de MEC qui en résulte. Utiliser le contenu du sécrétome des M1 comme produit biologique permettant de limiter ou reverser la polarisation des macrophages de type M2 pourraient être deux forts leviers thérapeutiques à envisager.

Sur la base de ces conclusions, et pour explorer cette hypothèse, nous avons poursuivi nos investigations en cherchant à évaluer les capacités du sécrétome de M1 à reprogrammer des macrophages de type M2. Ces expérimentations complémentaires ont été menées durant les derniers mois de ma thèse et sont présentées dans la section suivante.

4. Données complémentaires

Les données complémentaires présentées ci-dessous seront précédées d'une courte partie méthodologique, visant à décrire les conditions expérimentales utilisées pour chacun des résultats obtenus. Les macrophages, leurs milieux induits et les fibroblastes de chéloïdes ont respectivement été différenciés, produits et isolés comme décrit précédemment dans l'article présenté ci-dessus (Partie II. 3). De la même façon, les principales expérimentations visant à évaluer le phénotype fibrotique des FC et à caractériser les macrophages, notamment l'ELISA α -SMA, la RT-qPCR, la quantification du collagène au Sirius Red, ainsi que la cytométrie, ont eux aussi déjà été détaillés dans l'article précédent.

4.1. Caractérisation des sous-types macrophagiques au sein des chéloïdes et de la peau saine

4.1.1. Méthodologie

Dans un premier temps, nous souhaitons caractériser la population macrophagique dans les chéloïdes et la peau saine, de façon plus détaillée que dans les données d'immunohistochimie présentées dans le troisième article. Pour cela, trois échantillons de peau saine et trois échantillons de chéloïdes ont été digérés, puis la population macrophagique a été marquée avant analyse en cytométrie en flux.

Brièvement, les échantillons tissulaires ont été découpés en fragments de 2 à 3 mm de diamètre, puis placés dans une solution de collagénase A (Sigma) à 3 mg/mL et incubés sur la nuit. Le lendemain, les boîtes de pétri contenant les tissus ont été placés à 37°C durant 2h30. Après dissociation mécanique des tissus à l'aide du dispositif GentleMACS (Miltenyi), la suspension obtenue a été filtrée sur un tamis cellulaire à 70 μ m, puis les cellules ont été lavées à 2 reprises avec du PBS 1X. Les cellules ont été centrifugées 5 min à 300g, puis le marquage des populations macrophagiques a été réalisé selon le protocole décrit dans la partie *Matériel et méthodes* du troisième article, section 2.6.. Un marqueur de viabilité couplé à V500 et trois anticorps anti-CD45, anti-CD11b et anti-CD68 ont été ajoutés, afin de cibler la population lymphoïde, puis macrophagique, comme suggéré dans la stratégie de *gating* présentée en *Figure 15*. Brièvement, les cellules vivantes ont tout d'abord été sélectionnées, puis parmi elles les monocytes/macrophages CD45+/CD11b+, et enfin les cellules CD68+. Au sein de ces cellules CD45+/CD11b+/CD68+, le pourcentage de cellules positives aux marqueurs CD206,

CD163, CD80 et MerTK a été déterminé. Les seuils de positivité pour chaque marqueur ont été fixés grâce à des témoins négatifs FMO (*Fluorescent Minus One*) dans lesquels les cellules étaient marquées avec l'ensemble des anticorps, excepté l'anticorps d'intérêt.

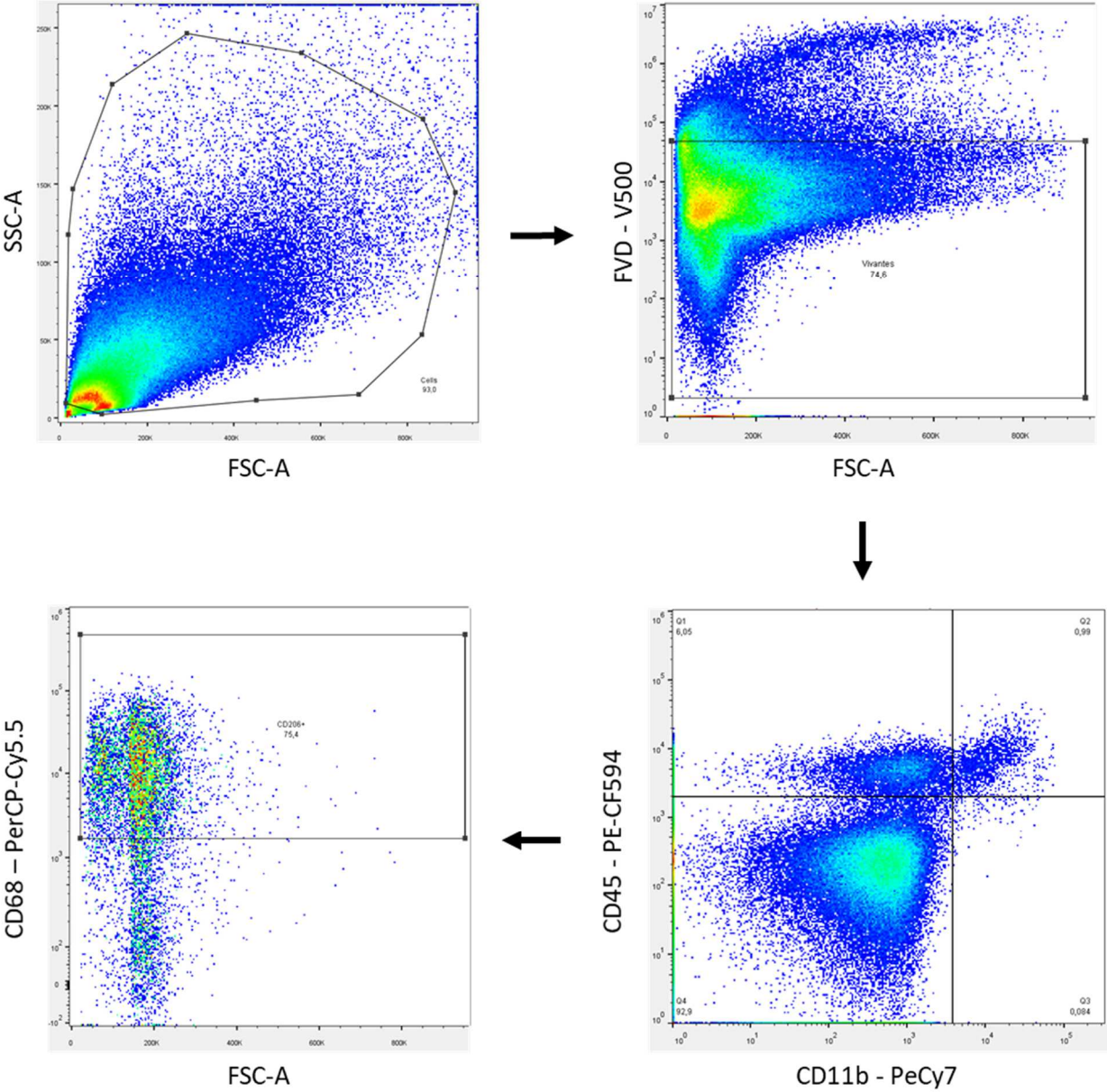


Figure 15 : Stratégie de gating permettant l'isolation de la lignée monocytes/macrophages et la caractérisation de leurs phénotype au sein du tissu cutané sain ou chéloïdien.

4.1.2. Résultats

La *Figure 16A* montre que les taux de monocytes/macrophages au sein de la peau saine et du tissu chéloïdien sont très proches, et représentent environ 0,45% des cellules au sein du tissu. De la même façon, les macrophages CD206⁺, CD163⁺ et MerTK⁺ sont présents à des taux similaires au sein de ces macrophages, respectivement à hauteur de 80%, 75% et 45% (*Figure 16B*). Bien que ces résultats ne soient pas significatifs au regard du faible nombre d'échantillons et de la variabilité inter-individuelle, les données obtenues laissent à penser que les chéloïdes contiendraient moins de macrophages CD80⁺ que la peau saine (6,51% vs 45,35%).

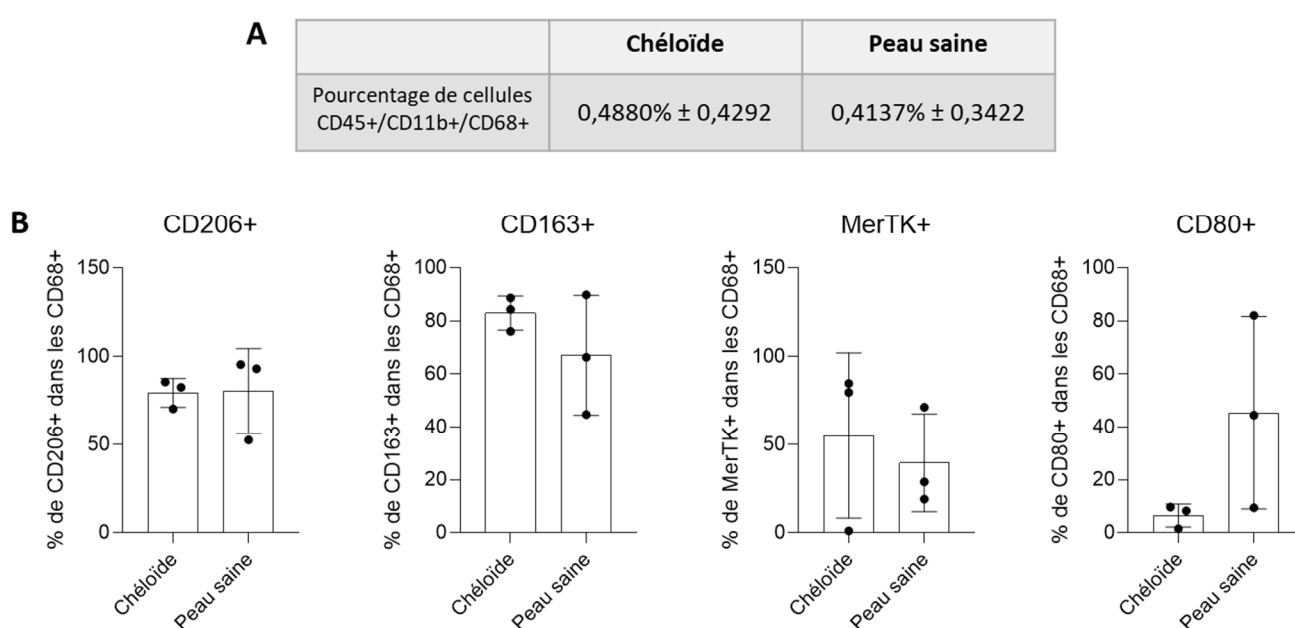


Figure 16 : Analyse des marqueurs exprimés par les macrophages au sein du tissu cutané sain ou des chéloïdes.

Des échantillons de peau saine et de tissu chéloïdien ont été découpés, digérés puis dissociés mécaniquement, avant marquage et analyse cytométrique visant à caractériser la population macrophagique au sein des tissus. **(A)** Le pourcentage de cellules CD45+/CD11b+/CD68+ a été déterminé dans chacun des tissus. **(B)** Au sein de cette population, le pourcentage de cellules positives pour les marqueurs CD206, CD163, MerTK et CD80 a été déterminée [$n = 3$ échantillons de peau saine et 3 échantillons de chéloïdes]. L'analyse statistique a été réalisée via un test t, sans résultats significatifs.

4.1.3. Conclusion

Il semblerait que les macrophages de type M1, qui expriment le marqueur de co-stimulation CD80, soient moins retrouvés au sein des chéloïdes que dans la peau saine. En revanche, concernant les macrophages de type M2, la persistance de la population CD206⁺ décrite en immunohistochimie n'a pas été confirmée ici.

4.2. Effet préventif et thérapeutique des sécrétomes de macrophages sur les fibroblastes de chéloïde

Dans la suite de ces expériences complémentaires, nous avons souhaité évaluer si les CM (*Conditioned Medium* – Milieu induits) de macrophages pourraient avoir un réel intérêt thérapeutique ou préventif sur le développement des chéloïdes. Pour cela, nous avons étudié leurs capacités à prévenir ou à traiter l'activation myofibroblastique des FC médiée par un environnement pro-fibrotique.

4.2.1. Méthodologie

Pour déterminer l'effet préventif des sécrétomes de macrophages, nous avons tout d'abord traité les FC durant 96h, avec du milieu contrôle (« Ctrl »), du TGF- β 1 à 10 ng/mL (« TGF »), ou avec les milieux induits de macrophages de type M1 (« M(LPS)-CM ») ou M2 (« M(IL-4, IL-13)-CM »). Une seconde stimulation de 96h a par la suite été réalisée sur les mêmes cellules, cette fois-ci avec du TGF- β 1, comme schématisé en *Figure 17A*. Pour déterminer l'effet thérapeutique des milieux de macrophages, les FC ont cette fois-ci été dans un premier temps traités durant 96h avec du TGF- β 1 à 10 ng/mL, puis avec les différents traitements décrits précédemment, comme récapitulé en *Figure 17B*. Afin d'évaluer le potentiel fibrogénique des FC après ces deux phases de traitement, nous avons évalué le niveau d'expression d' α SMA (ELISA, RT-qPCR) et de collagène (Sirius red) selon les méthodologies décrites précédemment dans l'article (Partie II. 3.).

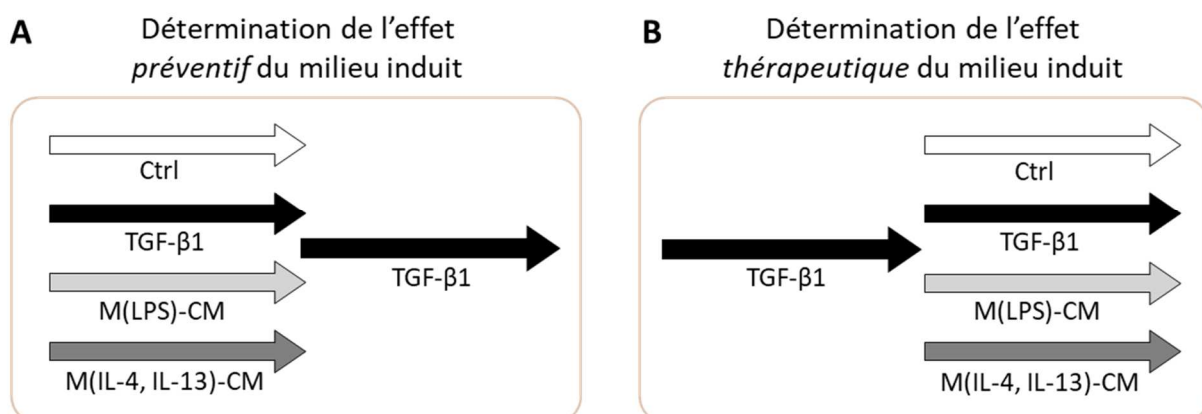


Figure 17 : Schéma synoptique des traitements réalisés sur les fibroblastes de chéloïdes afin de d'évaluer les potentiels effets préventifs (A) et thérapeutiques (B) des milieux induits de macrophages sur le développement de la fibrose.

4.2.2. Résultats - Evaluation des effets préventifs des sécrétomes de macrophages sur l'activation myofibroblastique

Dans un environnement pro-fibrotique (+ TGF- β 1), les fibroblastes de chéloïdes prétraités avec du sécrétome de macrophage de type M1 expriment moins d' α -SMA (*Figure 18A et B*). Il n'y a pas d'effet du pré-traitement au niveau du dépôt de collagène (*Figure 18C*).

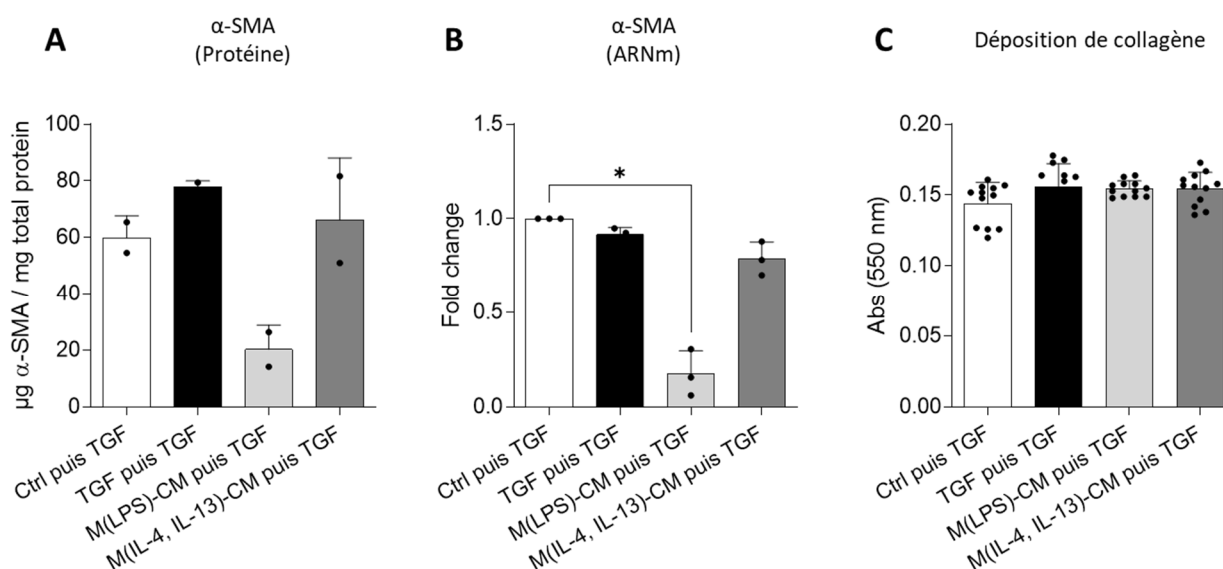


Figure 18 : Etude de l'effet préventif du sécrétome de macrophages sur l'induction du profil fibrotique des fibroblastes de chéloïde.

L'expression d' α -SMA (**A**), de son ARNm (**B**) et le dépôt de collagène total (**C**) a été quantifié dans des fibroblastes de chéloïdes prétraités durant 96h avec du milieu contrôle (« Ctrl puis TGF »), du TGF- β 1 (« TGF- β 1 puis TGF »), du milieu induit de macrophages M1 (« M(LPS)-CM puis TGF ») ou de M2 (« M(IL-4, IL-13)-CM puis TGF »), puis activés avec du TGF- β 1 à 10 ng/mL durant 96h [n = 3 souches de FC ; 1 (A, B) ou 4 (C) réplicas par conditions]. Les analyses statistiques ont été réalisées avec une ANOVA à un facteur, et la significativité est indiquée par les astérisques : * pour $p < 0,05$.

4.2.3. Résultats - Evaluation des effets thérapeutiques des sécrétomes de macrophages sur l'activation myofibroblastique

La *Figure 19* montre que le surnageant de M1 induit la désactivation des fibroblastes de chéloïdes ayant été préalablement activés, et ce de façon plus importante que le milieu contrôle. L'expression d'*ACTA2* est en effet 5 fois moins importante dans les fibroblastes activés au TGF- β 1 puis traités avec du M(LPS)-CM, que dans ceux activés puis traités avec du milieu contrôle (*Figure 18B*). Le dépôt de collagène total est lui aussi significativement diminué dans les FC traités avec du milieu de M1 (*Figure 18C*).

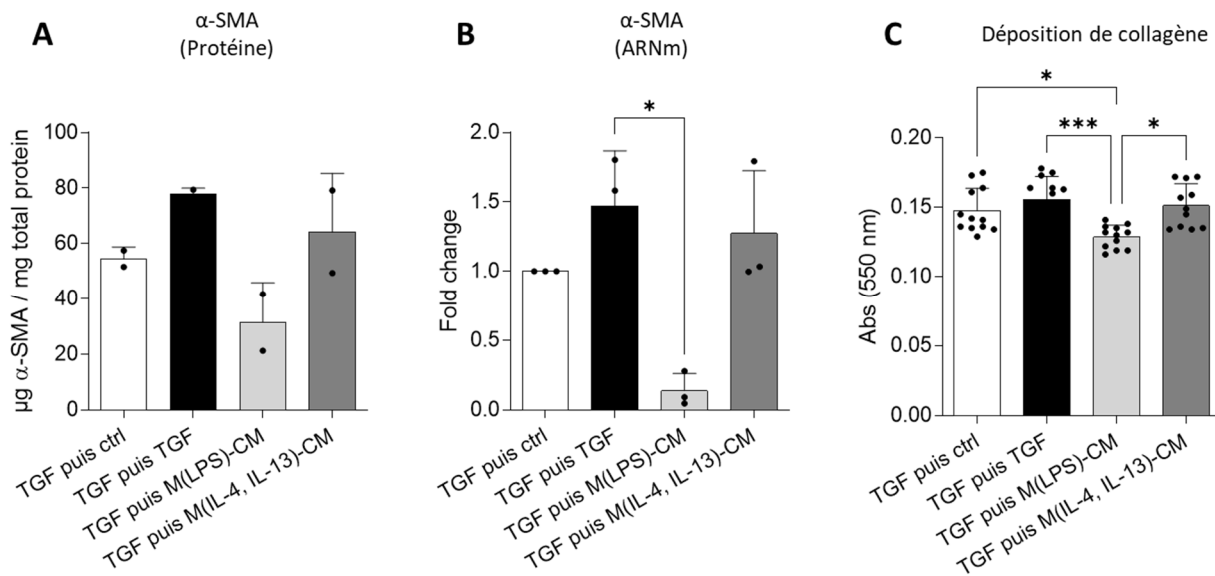


Figure 19 : Etude de l'effet thérapeutique du sécrétome de macrophages sur l'induction du profil fibrotique des fibroblastes de chéloïde.

L'expression d' α -SMA (**A**), de son ARNm (**B**) et le dépôt de collagène total (**C**) a été quantifié dans des fibroblastes de chéloïdes traités durant 96h avec du TGF- β 1 (10 ng/mL) puis durant à nouveau 96h avec du milieu contrôlé (« TGF puis ctrl »), du TGF- β 1 (« TGF puis TGF »), du milieu induit de macrophages M1 (« TGF puis M(LPS)-CM») ou de M2 (« TGF puis M(IL-4, IL-13)-CM ») [n = 3 souches de FC ; 1 (A, B) ou 4 (C) réplicas par conditions]. Les analyses statistiques ont été réalisées avec une ANOVA à un facteur, et la significativité est indiquée par les astérisques : * pour $p < 0,05$; *** pour $p < 0,001$.

4.2.4. Conclusion

Ces résultats ont permis de montrer que le sécrétome de macrophages de type M1 permet de réguler non seulement le phénotype fibrogénique des FC de façon basale, mais également lorsque la cellule est dans un environnement pro-fibrotique. Le sécrétome de M1 pourrait alors être considéré comme un outil thérapeutique visant à prévenir et/ou traiter la fibrose chéloïdienne.

4.3. Effet du sécrétome de fibroblastes de chéloïde sur la polarisation des macrophages

4.3.1. Méthodologie

Dans un troisième temps, nous avons voulu évaluer le potentiel des fibroblastes de chéloïdes à moduler la polarisation des macrophages *in vitro*. Pour cela, nous avons comme pour le sécrétome des macrophages réalisé du milieu induit de FC (« FC-CM » - *FC-Conditioned Medium*). Les FC ont étéensemencés à raison de $9,3 \cdot 10^3$ cellules/cm² dans du DMEMc, puis, après 24h d'adhérence, le milieu a été remplacé par du RPMIc, beaucoup plus approprié à la

culture de macrophages. Après 48h, permettant au milieu de s'enrichir du sécrétome des FC, le dit milieu a été récolté, puis congelé à -80°C jusqu'à la prochaine extraction de monocytes.

Une fois isolés, les monocytes ont alors été remis en suspension à raison de 1 million de cellules/mL dans le milieu induit par les FC, supplémenté avec du M-CSF à hauteur de 50 ng/mL (« FC-CM + M-CSF »). En parallèle, les mêmes cellules ont été ensemencées dans du RPMIc contenant (« RPMI + M-CSF ») ou non (« RPMI ») du M-CSF à la même concentration. Des macrophages M(LPS) et M(IL-4, IL-13) ont également été polarisés selon le protocole décrit dans l'article. Le milieu des macrophages a été renouvelé après 3 jours, puis l'expression des marqueurs de macrophages a été étudiée en cytométrie en flux après 7 jours de polarisation, selon le protocole décrit dans le troisième article. Les résultats sont exprimés en tant que RFI (*Relative Fluorescent Intensity* – Intensité de fluorescence relative), résultat du rapport entre la fluorescence des cellules marquées et non marquées pour chacun des marqueurs.

4.3.2. Résultats

Ces travaux nous ont dans un premier temps permis de confirmer le phénotype des macrophages M(LPS) et M(IL-4, IL-13) utilisés dans l'article, d'un point de vue morphologique (*Figure 20A et B*) et par leur expression de marqueurs membranaires (*Figure 20F*). Les M1-like [M(LPS)] présentaient en effet une morphologie très particulière, avec des cellules très allongées, tandis que les M2 [M(IL-4, IL-13)] exprimaient les marqueurs CD206, CD163 et MerTK à des taux plus élevés que les M1.

La *Figure 20D* montre que les monocytes traités avec le sécrétome de FC développent une morphologie à mi-chemin entre les macrophages de type M1 (*Figure 20A*) et les macrophages de type M2 (*Figure 20B*). Comparativement aux cellules cultivées avec du M-CSF seul (*Figure 20C*), d'avantage de cellules était allongées, prenant une forme presque myofibroblastique. Certaines cellules restaient néanmoins rondes et plus petites, comme les macrophages de type M2.

La *Figure 20F* suggère quant à elle que les macrophages polarisés par le milieu de FC expriment les marqueurs CD163, MerTK et CD14 à des taux plus importants que les M1, les M2, et les monocytes activés avec du M-CSF seulement.

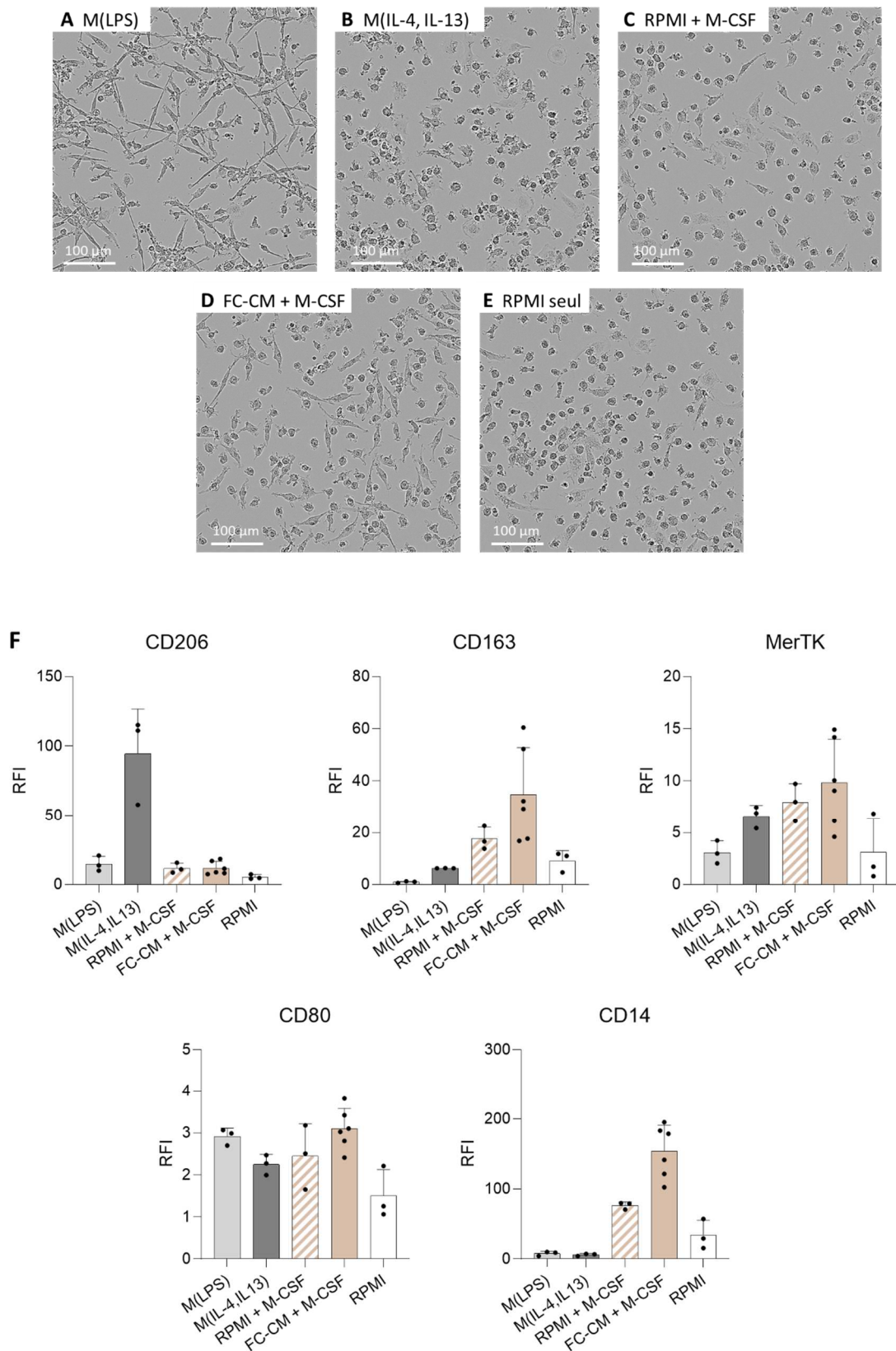


Figure 20 : Evaluation des capacités des fibroblastes de chéloïdes à moduler le phénotype des macrophages.

Des monocytes ont été cultivés dans du RPMI supplémenté en GM-CSF et IFN γ à 50 ng/mL ([M(LPS)], en M-CSF et IL-4 à 50 ng/mL [M(IL-4, IL-13)], en M-CSF seul à 50 ng/mL (RPMI + M-CSF), ou sans cytokines (RPMI) durant 7 jours. En parallèle, des monocytes ont été cultivés dans du sécrétome de FC supplémenté en M-CSF à 50 ng/mL (FC-CM + M-CSF). **(A-E)** Images des cellules après 7 jours de polarisation. **(F)** Après 7 jours, l'expression des marqueurs CD206, CD163, MerTK, CD80 et CD14 sur les cellules a été analysée en cytométrie en flux [n = 3 donneurs de monocytes, 2 donneurs de FC ; 1 réplica par conditions]. L'analyse statistique a été réalisée via une ANOVA à 1 facteur, sans résultats significatif.

4.3.3. Conclusion

Les résultats obtenus ici suggèrent que les macrophages polarisés avec du milieu induit de FC adopteraient un phénotype de macrophage de type M2 (CD163⁺, MerTK⁺), tout en conservant l'expression du récepteur au LPS (CD14) caractéristique des monocytes et macrophages pro-inflammatoires. Afin de confirmer ces effets, il serait nécessaire de reproduire ces expérimentations avec des sécrétomes d'autres souches de fibroblastes de chéloïde. La polarisation des macrophages pourrait également être étudiée plus en détail, notamment en se concentrant sur des marqueurs de macrophages de type M1, comme iNOS.

4.4. Reprogrammation des macrophages

L'étude présentée en Partie II. 3 nous a permis de montrer que les macrophages de type M1 pourraient avoir un réel intérêt thérapeutique dans le cadre des chéloïdes. En outre, les macrophages de type M2, qui sont présents en quantité abondante dans le tissu chéloïdien, seraient au contraire pro-fibrotiques et délétères dans la pathologie, comme le montre également les données de la littérature.

Ces résultats nous ont conduit à suggérer que la re-polarisation des macrophages de type M2 par des M1 au sein du tissu permettrait de reverser son état pro-fibrotique général, et de limiter le développement de la pathologie, voire de la reverser. Nous avons ainsi voulu proposer une méthode de « reprogrammation » des macrophages d'un phénotype M2 vers un phénotype M1, qui pourrait être applicable au tissu chéloïdien de façon ciblée. En ce sens, nous nous sommes basés sur une étude antérieure menée sur les plaies chroniques qui avait montré les capacités des exosomes de M2 à reprogrammer des M1 vers un profil pro-cicatriciel⁴⁷⁸. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que le sécrétome de M1 pourrait permettre la reprogrammation des M2 et être utilisé à des fins thérapeutiques.

4.4.1. Méthologie

Afin d'étudier cette théorie, nous avons tout d'abord généré des macrophages de type M1 [M(LPS)] et de type M2 [M(IL-4, IL-13)], comme décrit dans l'article (Partie II. 3.). Après 7 jours de polarisation, et comme schématisé en *Figure 20*, les macrophages ont été traités avec du milieu induit du type de macrophage opposé. Les macrophages de type M1 ont ainsi été traités avec du milieu induit de M2 [M(IL-4, IL-13)-CM], tandis que les M2 ont été traités avec

du milieu induit de M1 [M(LPS)-CM]. Après 24h, le phénotype des macrophages a été déterminé par cytométrie en flux, comme décrit dans l'article présenté en Partie II. 3.

4.4.2. Résultats

La *Figure 21A* suggère que la morphologie caractéristique des macrophages de type M1, très allongée et en forme d'épingle, était modifiée lorsqu'ils étaient traités avec le milieu induit de M2. Les M1 étaient alors beaucoup plus rond, même si certaines cellules présentant une forme allongée persistaient. Concernant les macrophages de type M2, leur morphologie changeait drastiquement après traitement par le surnageant de M1, et s'orientait vers une structure similaire à celle des M1.

Concernant l'expression des marqueurs membranaires, les macrophages de type M1, une fois traités avec du milieu de M2, semblaient exprimer d'avantage le marqueur CD163, mais moins de CD14 et de CD80 (*Figure 21B*). Les macrophages de type M2 traités avec du milieu de M1 semblaient quant à eux exprimer de façon plus importante les marqueurs CD163 et MerTK, et moins de CD206, CD14 et CD80 qu'avant traitement.

4.4.3. Conclusion

Les modifications phénotypiques induites par les sécrétomes de macrophages ont été plus mineures que celles qui étaient pressenties. Néanmoins, ces données sont encourageantes et nous ont permis de montrer que le sécrétome de macrophages pouvait avoir un impact sur leurs phénotypes. Afin d'obtenir des résultats plus marqués, il serait judicieux de concentrer ces sécrétomes ou d'en utiliser uniquement la partie vésiculaire. Ces expérimentations doivent également être reproduites avec un nombre de donneurs plus important.

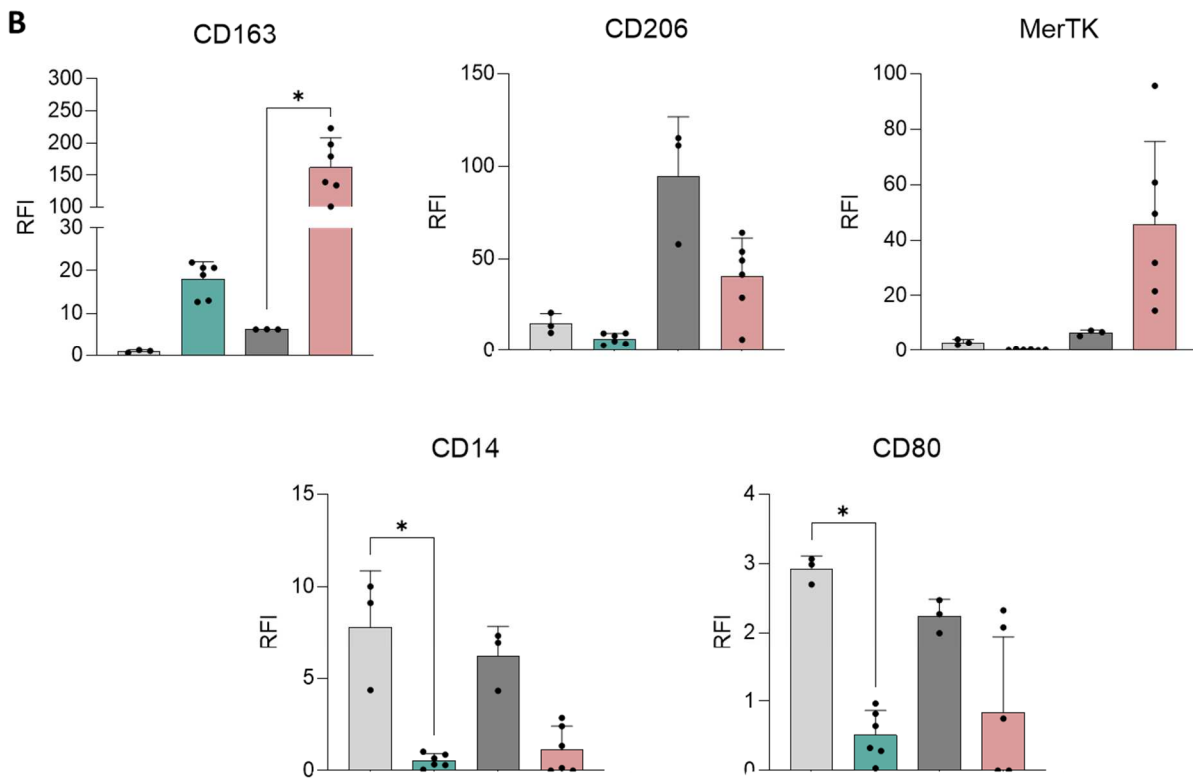
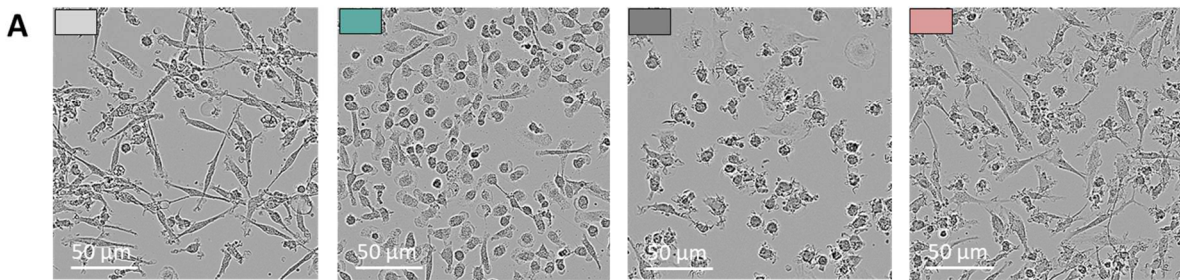
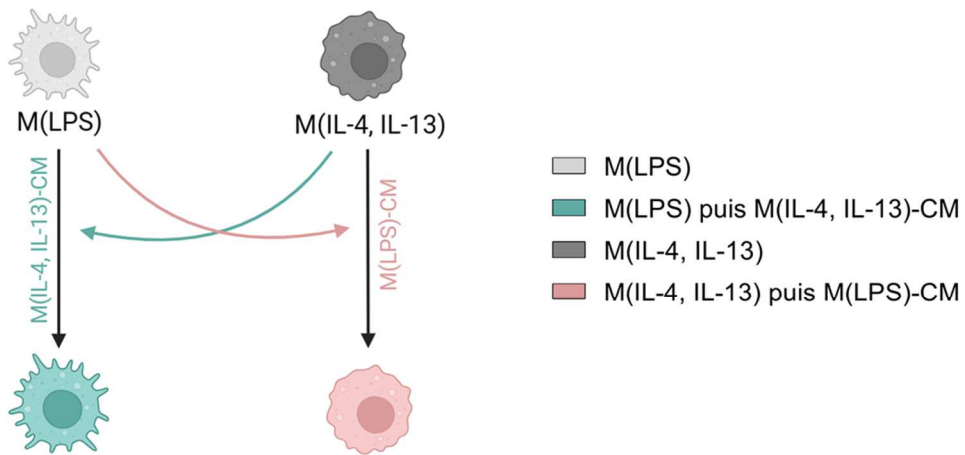


Figure 21 : Evaluation de la reprogrammation des macrophages par leurs sécrétomes

Des macrophages M(LPS) et M(IL-4, IL-13) ont été polarisés puis traités avec du RPMI, ou avec du milieu induit du second type de macrophages. **(A)** Images des macrophages après 24h de traitement. **(B)** Après 7 jours, l'expression des marqueurs CD206, CD163, MerTK, CD80 et CD14 sur les macrophages a été analysée en cytométrie en flux [n = 3 donneurs de monocytes, traités avec 2 milieux induits ; 1 réplica par conditions]. L'analyse statistique a été réalisée via une ANOVA à 1 facteur.

4.5. Analyse des vésicules extracellulaires au sein des sécrétomes de macrophages

Afin de mieux comprendre l'effet des sécrétomes de macrophages sur le phénotype fibrotique des fibroblastes de chéloïdes, nous avons initié une collaboration avec le Docteur Wilfrid Boireau, enseignant-chercheur à l'institut CNRS FEMTO ST de Besançon. Spécialisé dans l'analyse des vésicules extracellulaires, le Dr. Boireau et son équipe ont initié des travaux visant à caractériser et à comparer les populations vésiculaires au sein de nos deux sécrétomes de macrophages.

Les EVs (*Extracellular Vesicles* – Vésicules extracellulaires) sont des particules sécrétées par de nombreux types cellulaires, limitées par une membrane lipidique, et qui jouent un rôle de cargo pour de nombreuses protéines, acides nucléiques, lipides ou encore ARN interférants⁴⁷⁹. Leur rôle régulateur dans la mise en place de la fibrose a déjà été largement démontré dans de nombreuses pathologies fibrotiques touchant les poumons, les reins, le cœur ou encore le tissu cutané^{480,480}. Les EVs de macrophages de façon spécifique ayant été montrés comme impliqués dans de nombreuses pathologies⁴⁸¹, nous avons souhaité caractériser leur population au sein de nos sécrétomes.

4.5.1. Méthodologie

Afin de faciliter l'analyse des populations d'EVs au sein du sécrétome de macrophages, les mêmes milieux induits que décrits dans l'article en Partie V ont été générés, mais cette fois-ci en utilisant du DMEM dépourvu de SVF (Sérum de Veau Foetal). Ce dernier étant très riche en protéine et en vésicules, il aurait largement compliqué l'analyse des sécrétomes.

Après décongélation, les milieux induits ont été dilués au 1/3, avant analyse en SPRi (*Surface Plasmon Resonance imaging* – Imagerie par résonance plasmonique de surface).

4.5.2. Résultats

Les résultats présentés en *Figure 22A* montrent que le nombre de particules détectées en SPRi dans les milieux induits de macrophages est équivalent pour les macrophages de type M1 et M2, et s'élève à environ $1,3 \cdot 10^9$ particules/mL de milieu induit. Concernant le diamètre des vésicules, nous avons montré que celui des EVs dérivés de macrophages de type M1 est en moyenne 18% plus élevé que celui des EVs dérivés de M2 (*Figure 22B*).

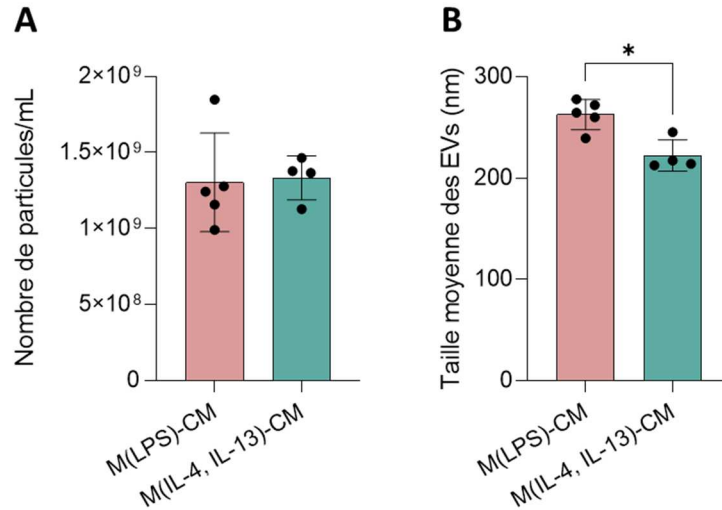


Figure 22 : Analyse de la population de vésicules extracellulaires au sein des milieux induits de macrophages

La concentration **(A)** et la taille **(B)** des vésicules extracellulaires présentes dans le milieu induit de M1 [M(LPS)-CM] et de M2 [M(IL-4, IL-13)-CM] a été analysé en imagerie par résonance plasmonique de surface [n = 5 donneurs de monocytes, ; 1 réplica par conditions]. Les analyses statistiques ont été réalisées avec un test t, et la significativité est indiquée par les astérisques : * pour $p < 0,05$.

4.5.3. Conclusion

Bien que ces résultats soient encore très préliminaires, nous avons mis en évidence une concentration suffisamment élevée d'EVs dans le surnageant des macrophages, qui nous permettra par la suite de pouvoir analyser cette population de façon plus poussée. La caractérisation de la taille des EVs nous a permis de mettre en avant la différence de taille entre EVs de M1 et EVs de M2, qui pourrait être un premier pas vers l'explication de l'effet différentiel des M1 et M2 sur les FC. La suite des expérimentations permettra de déterminer les marqueurs membranaires présents sur ces EVs, et ainsi de permettre la mise au point d'un dispositif de tri grâce à un panel de marqueurs permettant de différencier les EVs de macrophages « pro-fibrotiques » des EVs « anti-fibrotiques ».

PARTIE IV

-

Discussion générale

La faible compréhension des mécanismes inhérents à la formation des chéloïdes est encore aujourd'hui un problème majeur de santé publique, qui complique le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Bien que de nombreuses hypothèses génétiques, environnementales ou immunitaires aient été émises pour expliquer leur pathogénèse, aucun processus clairement établi ne suffit pour l'instant à expliquer le développement des chéloïdes. Durant ma thèse de sciences, nous avons engagé un ensemble de travaux qui visaient à mieux appréhender la physiopathologie des chéloïdes en faisant le focus sur l'axe macrophage-fibroblaste-fibrose dans la maladie, avec l'objectif de proposer à terme de nouveaux leviers thérapeutiques.

Dans cette discussion générale, nous reviendrons sur le faisceau de résultats obtenus dans les articles présentés dans les sections précédentes, puis apporterons des éléments de discussion globaux sur l'ensemble des travaux réalisés durant ma thèse.

1. Mise en place du modèle sphéroïde

L'étude présentée en Partie II. 2. suggère que les sphéroïdes, plutôt que d'induire l'activation des FC, entraînent leur désactivation et limitent leur sensibilité à un environnement pro-fibrotique. Nos travaux rejoignent ceux des équipes de Granato et Kunz-Schughart, qui avaient suggéré que la culture de fibroblastes dermiques sains (FDS) sous forme de sphéroïdes induisait leur désactivation^{482,483}. Malgré tout, les mécanismes moléculaires associés à cette désactivation des fibroblastes dermiques cultivés sous forme de sphéroïdes restent à décrire aujourd'hui.

Parmi les facteurs pouvant expliquer ce phénomène, l'environnement mécanique inhérent à la culture de sphéroïdes pourrait être une variable majeure. En effet, lorsque les cellules sont cultivées sous forme de sphéroïdes, la perte du support rigide normalement utilisé pour la culture des cellules pourrait moduler l'activation des FC. L'environnement mécanique des FC a en effet déjà été montré comme modulant leur activation, et ce de façon indépendante de leur microenvironnement^{285,484}. Afin d'évaluer le rôle de la variable mécanique dans la désactivation des FC, nous pourrions proposer un séquençage d'ARN comparant les cellules cultivées en monocouche et en sphéroïdes, avec ou sans présence de TGF- β 1. Cette approche permettrait de faire un screening général du profil transcriptomique des cellules. Nous pourrions ainsi cibler certaines voies décrites comme liées à la

mécanotransduction dans les FC, notamment la voie FAK et les voies impliquant les intégrines⁴⁸⁵. Ces dernières, qui sont des senseurs détectant les modifications de l'environnement mécanique⁴⁸⁶, semblent jouer un rôle important dans la formation des chéloïdes^{487,488}. Leur expression a en effet été décrite comme induite dans les FC comparativement aux FDS dans plusieurs études^{260,262}. De plus, au niveau clinique, il est maintenant largement admis que les chéloïdes se développent préférentiellement sur des zones exposées à de fortes tensions mécaniques¹⁵⁴. Ensembles, ces données suggèrent que la modulation de l'environnement mécanique dans le cadre de la formation des sphéroïdes pourrait, au moins partiellement, être responsable de la désactivation des FC.

Le séquençage d'ARN proposé ci-dessus pourrait également permettre d'étudier en détail la modulation de la signalisation du TGF- β 1 au sein des sphéroïdes. Nous avons en effet constaté que cette cytokine perdait son activité pro-fibrotique sur les sphéroïdes de FC. Le TGF- β 1 exerçant majoritairement son effet en activant la voie classique du TGF- β 1, des modulations au sein de cette voie pourraient expliquer la perte de sensibilité des FC. Bien que nos travaux aient montré que cet effet n'était pas médié par une diminution de l'expression du TGF- β RII, d'autres récepteurs ou protéines affiliées à la signalisation du TGF- β pourraient être exprimées de façon différentielle au sein des sphéroïdes. C'est notamment le cas des protéines Smad, qui conduisent le signal médié par la présence de TGF- β 1 jusqu'à entraîner une modulation de l'expression génique.

Même si ce modèle de sphéroïdes pourrait être utilisé en tant que tel afin d'étudier la désactivation des FC, il pourrait aussi évoluer vers un système d'étude 3D plus complexe. La présence d'une MEC autour des sphéroïdes ajouterait un environnement mécanique et matriciel au modèle, pouvant potentiellement restaurer le potentiel fibrotique des cellules initialement perdu dans nos sphéroïdes. Il a en effet déjà été suggéré que la rigidité de la matrice et sa composition pourraient contribuer à l'activation des fibroblastes sains vers un profil fibrotique^{285,489}. Parmi les protéines de la matrice ayant un rôle sur l'activation des fibroblastes, la fibronectine est suggérée comme un très bon candidat. Elle serait en effet indispensable à l'orchestration de la cicatrisation cutanée physiologique, en médiant la prolifération, la migration et la synthèse de collagène par les fibroblastes⁴⁹⁰⁻⁴⁹². La fibronectine a également été rapportée comme jouant un rôle crucial dans le développement de la fibrose⁴⁹³⁻⁴⁹⁵. La périostine, une protéine extracellulaire sécrétées par les cellules

mésenchymateuses et ligand de plusieurs intégrines, pourrait également être décrite comme un candidat potentiel permettant d'induire le caractère fibrotique du modèle sphéroïde. Cette protéine a en effet été montrée *in vitro* comme induisant la formation des chéloïdes, via l'activation de la voie RhoA dans les FC. L'activation de cette voie permettait alors d'induire la synthèse de TGF- β au sein des cellules, médiant leur caractère fibrotique³²⁵. Dans un second temps, afin d'induire les caractéristiques fibrotiques du modèle sphéroïde, nous pourrions envisager de former ces sphéroïdes avec des FC pré-activés par le TGF- β 1. Ce modèle mimerait ainsi l'environnement pro-fibrotique présent en amont de l'apparition des chéloïdes *in vivo*.

Enfin, l'étude publiée par Tan et ses collaborateurs en 2020 suggère que l'absence d'une composante immunitaire au sein de ce modèle *in vitro* pourrait être un frein au développement de la fibrose. Les auteurs avaient en effet montré que l'ajout de macrophages au sein d'un modèle sphéroïdes composé de FDS permettrait d'induire le caractère fibrotique des fibroblastes⁴⁹⁶. Nous envisageons donc d'ajouter une composante cellulaire à l'environnement mécano-matriciel des sphéroïdes chéloïdiens, par exemple via la présence de macrophage de type M1 et M2.

2. Les macrophages : régulateurs clés de la pathogénèse des chéloïdes

Les principaux travaux réalisés durant ma thèse visaient à étudier le rôle différentiel des macrophages de type M1 et M2 dans la pathogénèse de la maladie chéloïdienne.

La première partie de ces travaux visaient à confirmer les données histologiques décrites dans la littérature, qui décrivaient au sein du tissu chéloïdien un infiltrat de macrophages particulièrement important, et notamment de M2^{280,281,297,299,360}. Concernant les données d'immunohistochimie publiées dans l'article (Partie II. 3.), celles-ci ont permis de confirmer la présence de macrophages de type M2a (CD206⁺) au sein des chéloïdes. Les résultats obtenus par cytométrie en flux et présentés dans les données complémentaires n'avaient pas permis de confirmer cet élément. Pour autant, les données de cytométrie ont été obtenues à partir d'une suspension cellulaire provenant de la digestion de tissu cutané. Or, les difficultés techniques inhérentes à la dissociation du tissu chéloïdien sont nombreuses (taille, volume et densité matricielle des échantillons). Préparer l'échantillon pour la cytométrie demande plusieurs étapes de dissociation enzymatiques et mécaniques qui

pourraient altérer les cellules et leurs marqueurs membranaires, perturbant finalement l'analyse. Dans le futur, un raffinement de l'extraction cellulaire en vue d'une analyse par cytométrie sera nécessaire. Afin de compléter ces données sur la caractérisation des macrophages au sein du tissu chéloïdien, d'autres marqueurs spécifiques des macrophages de type M1 (iNOS, CD80) ou M2 (CD163, MerTK) pourraient être ciblés en immunohistochimie. Ces études complémentaires seraient également l'occasion d'investiguer l'expression de marqueurs de SAMacs au sein des chéloïdes. En effet, jusqu'à aujourd'hui, une seule étude a fait allusion à des macrophages exprimant un des marqueurs de SAMacs dans les chéloïdes. Cette protéine, l'ostéopontine (SPP1), avait alors été suggérée comme induisant l'activation des FC, leur expression d' α -SMA et de collagène de type I⁴⁹⁷.

L'article présenté en Partie II. 3. a permis de montrer pour la première fois *in vitro* le rôle respectivement anti- et pro-fibrotique des macrophages de type M1 et M2. Bien que des données similaires aient été décrites sur des fibroblastes dermiques sains (FDS)³⁷¹⁻³⁷⁵, nous en montrons et confirmons ici les effets pour la première fois sur des fibroblastes issus de chéloïdes. Afin de compléter ces données, il serait nécessaire d'investiguer quels facteurs retrouvés au sein des sécrétomes de macrophages expliqueraient les effets observés sur les FC. En ce sens, le dosage réalisé dans l'article des quelques cytokines inflammatoires et fibrotiques dans le milieu induit des macrophages pourrait être utilisé comme base de travail. Nous pourrions reproduire ce contenu cytokinique des sécrétomes avec des cytokines recombinantes, et ainsi mesurer leur effet sur les FC. Cette méthode serait néanmoins applicable uniquement au sécrétome de M1, dont les taux en IL-1 β , TNF- α et IL-6 se sont révélés relativement importants. Concernant le sécrétome de M2, les cytokines dosées n'ont été détectées qu'à de très faibles concentrations. Une analyse protéomique complète du contenu des deux surnageants permettrait de mieux caractériser ces sécrétomes, et d'ainsi définir des signatures cytokiniques à effet pro- ou anti-fibrotique. Enfin, comme pour la mise en place du modèle sphéroïde, un séquençage d'ARN sur les FC traités avec les sécrétomes de macrophages permettrait de mettre en avant les voies de signalisation impliquées dans la modulation de leur caractère fibrogénique. La voie classique du TGF- β 1, la voie JAK/Stat et leurs protéines associées pourraient notamment être des cibles de choix à investiguer.

2.1. Une boucle d'activation permanente entre fibroblastes et macrophages au sein des chéloïdes

Au regard des résultats obtenus dans l'article en Partie II.3., nous pouvons suggérer que l'accumulation de macrophages M2 pro-fibrotiques dans le tissu chéloïdien serait responsable de la formation des chéloïdes. Ces derniers pourraient en effet activer les FC et leur sécrétion de MEC, participant ainsi à la formation du tissu fibreux.

Par le biais des expérimentations complémentaires, nous avons également montré que les FC seraient capables d'induire sur des monocytes une polarisation plutôt M2 (CD163⁺, MerTK⁺), tout en induisant l'expression du récepteur au LPS (CD14) caractéristique des monocytes et macrophages pro-inflammatoires. Les récepteurs CD163 et MerTK, respectivement impliqués dans la capture des complexes heptaglobine/hémoglobine⁴⁹⁸ et dans le processus d'efferocytose⁴⁹⁹, ont tous les deux déjà été décrits comme possédant des capacités pro-fibrotiques dans le cadre de la fibrose pulmonaire⁵⁰⁰ ou hépatique⁵⁰¹. De la même façon, l'expression de CD14 a été récemment associée à une population de macrophages pro-fibrotiques dans la sclérose systémique⁵⁰² et dans la fibrose hépatique⁵⁰¹.

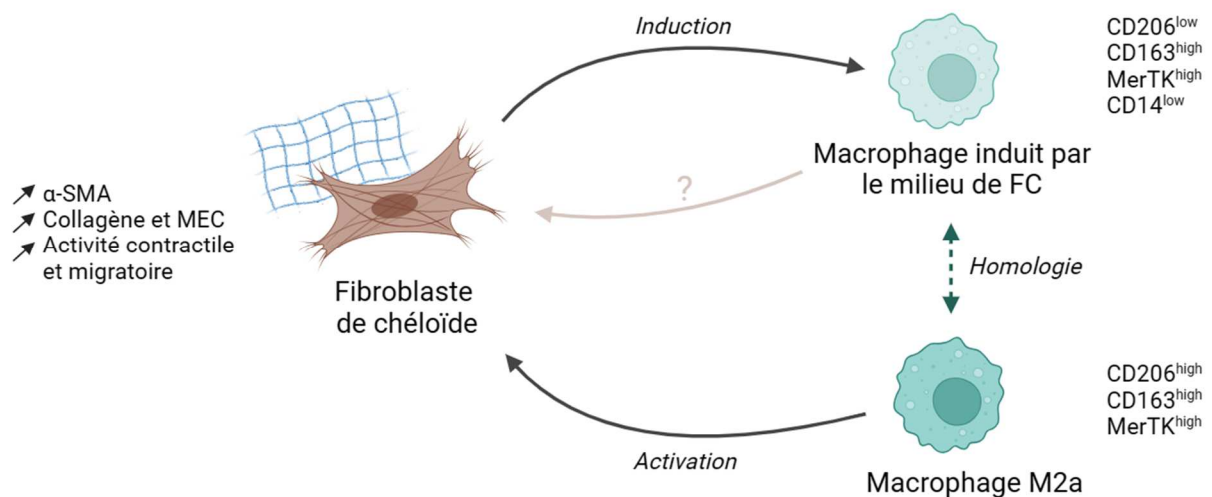


Figure 23 : Représentation schématique de la boucle d'activation pouvant induire le dépôt constant de MEC au sein des chéloïdes.

Schéma réalisé avec Biorender®.

Ainsi, en se basant sur leurs marqueurs d'expression et leur description dans la littérature, ces macrophages induits par les FC pourraient posséder des capacités pro-fibrotiques. L'ensemble de ces données nous permettent de suggérer qu'il pourrait exister au

sein des chéloïdes une boucle pro-fibrotique, dans laquelle les FC et les macrophages s'activeraient mutuellement, comme proposé en *Figure 23*.

Afin de confirmer l'existence de cette boucle pro-fibrotique au sein des chéloïdes, il serait nécessaire de produire du milieu induit par les macrophages polarisés par les FC, pour ensuite évaluer son effet sur le caractère fibrogénique des fibroblastes de chéloïde. En effet, bien que les macrophages induits par les FC aient un profil similaire à celui des M(IL-4, IL-13) produits *in vitro*, rien ne nous permet d'affirmer que leurs effets sur les fibroblastes de chéloïde seraient similaires. De plus, il serait judicieux de reproduire l'expérience visant à polariser des monocytes avec du sécrétome de FC, mais cette fois-ci sans ajouter de M-CSF. En effet, bien qu'il permette de s'assurer de la survie des monocytes, le M-CSF pourrait activer les macrophages à lui seul, biaisant les résultats obtenus.

2.2. Les macrophages pro-inflammatoires en tant que thérapie pour limiter le développement des chéloïdes

Les données obtenues dans l'article présenté en Partie II. 3. nous ont permis de proposer que les macrophages de type M1 pourraient être utilisés à des fins thérapeutiques, via leurs effets anti-fibrotiques sur les FC.

L'effet thérapeutique de sécrétome de M1 suggéré en Partie II. 3. a été confirmé par les expérimentations complémentaires, qui ont montré que le surnageant de M1 induisait une diminution des caractères fibrotiques des FC préalablement activés par le TGF- β 1. Nous avons également suggéré que le sécrétome de M1 pourrait être utilisé en tant que traitement préventif, pour limiter le développement de nouvelles chéloïdes. Afin de compléter ces données, il serait judicieux de traiter les FC avec du TGF- β 1, puis, lors d'une deuxième séquence de traitement, avec du sécrétome de M1 et du TGF- β 1. Nous pourrions ainsi évaluer les capacités du surnageant de M1 à limiter le profil fibrogénique des FC dans un environnement pro-fibrotique, comme ce serait le cas dans les chéloïdes *in vivo*.

Bien que nous ayons largement rapporté l'intérêt thérapeutique du milieu de M1 *in vitro*, il serait nécessaire de confirmer ces résultats sur un modèle *in vivo*, comme le modèle de souris humanisée décrit par Lee *et al* durant l'été 2023⁴⁶¹. La greffe d'explants de chéloïdes dans des souris humanisées nous permettrait alors de travailler sur un modèle au plus proche

de la pathologie. Nous pourrions ainsi évaluer l'effet du sécrétome de M1 en injection locale ou en application topique, au niveau du greffon. Ce protocole pourrait alors permettre d'induire un environnement anti-fibrotique local, qui limiterait le développement de la chéloïde. Une injection directe de macrophages de type M1 pourrait également être envisagée, mais nécessiterait de s'assurer de l'absence de réaction allogénique.

2.3. Vers une possible reprogrammation des macrophages en tant que thérapie contre les chéloïdes

Au cours des dernières années, une dysfonction de la polarisation des macrophages a été relevée dans de nombreuses maladies comme le cancer, les maladies neurodégénératives ou inflammatoires. Certains sous-types de macrophages étaient alors décrits comme étant de bon pronostic dans la maladie, tandis que d'autres sous-types étaient quant à eux délétères^{503,504}. En réponse à ce constat, plusieurs équipes ont initié le développement de protocoles de reprogrammation des macrophages, qui permettraient de moduler leur phénotype au sein même d'un tissu. Plusieurs techniques de reprogrammation ont ainsi été décrites durant ces dernières années, basées sur la thérapie génique, l'utilisation d'anticorps bloquants ou de cytokines recombinantes⁵⁰⁵.

Ces stratégies ont déjà fait leur preuve dans plusieurs pathologies, dont certaines impliquant une dérégulation du processus de cicatrisation cutané. Kim *et al* avaient notamment montré en 2018 que des exosomes de M2 pourraient permettre de reprogrammer des macrophages de type M1 vers un phénotype M2 au sein de plaies chroniques. La présence de ces macrophages pro-cicatriciels permettait alors de remettre en place un processus de cicatrisation physiologique sain⁴⁷⁸. Une étude *in vitro* publiée en 2018 avait également montré que la transition des macrophages de type M1 à M2 pourrait être induite par le blocage de l'IRF5 (*Interferon Regulatory Factor 5* – Facteur régulateur de l'interféron 5). Cette stratégie permettait de générer des M2 pro-cicatriciels, capables d'induire la migration des FDS⁵⁰⁶.

Dans le cadre des chéloïdes, l'importante population de macrophages présente au sein du tissu suggère que leur reprogrammation présenterait un réel potentiel thérapeutique⁵⁰⁷. Reprogrammer la population de M2 en macrophages de type M1 permettrait en effet de

reproduire un environnement anti-fibrotique au sein du tissu. Nous pourrions même envisager de modifier génétiquement des macrophages, afin qu'ils ciblent directement la MEC et induisent sa dégradation.

Plusieurs études suggèrent que les exosomes de macrophages pourraient être utilisés en tant qu'agent biologique permettant leur reprogrammation. Le contenu vésiculaire du surnageant de M1 pourrait ainsi induire la transition des M2 vers un phénotype M1, et inversement^{478,508}. Afin d'étudier cette possibilité de reprogrammation *in vitro*, nous avons dans un premier temps utilisé le sécrétome des macrophages, sans en extraire les exosomes. Bien qu'un léger effet sur la modulation du phénotype opposé ait été observé, nous ne pouvons pas conclure sur leurs capacités à reverser totalement la polarisation des macrophages. Pour obtenir des effets plus importants, nous suggérons l'utilisation de concentrations plus importantes de sécrétome, ou d'exosomes seuls.

En ce sens, nous avons durant les derniers mois de ces travaux entrepris d'étudier les populations d'EVs (*Extracellular Vesicles* – Vésicules extracellulaires) présentes dans les sécrétomes de macrophages. Nous nous sommes pour cela entourés du docteur Wilfrid Boireau, chercheur à l'institut CNRS FEMTO ST (Besançon), spécialiste des vésicules extracellulaires. Notre collaboration visait à caractériser le nombre et la tailles des EVs au sein des sécrétomes des deux sous-types de macrophages. Des analyses ultérieures permettront d'étudier les marqueurs exprimés par ces vésicules, et de pouvoir potentiellement en isoler une ou plusieurs populations. Ces EVs pourront par la suite être utilisés comme agent thérapeutique, afin de reverser la population des M2 au sein du tissu chéloïdien. Comme pour le sécrétome, une application topique des EVs de M1 ou des injections intra lésionnelles pourraient être envisagées chez l'Homme afin de limiter le développement des chéloïdes. Il sera bien évidemment au préalable nécessaire d'investiguer l'effet de ces EVs de M1 *in vitro* et *in vivo*.

Ces EVs, si elles s'avéraient incapables d'induire la polarisation des M2 en M1, pourraient être modifiées afin de cibler des cellules fibrotiques, comme suggéré en 2023 par Chen et ses collaborateurs⁵⁰⁹. Les auteurs avaient alors démontré que ces EVs de macrophages modifiées diminuaient la fibrose cardiaque, *in vitro* et chez la souris.

2.4. Limites de l'étude

Bien que l'étude présentée en Partie II.3. soit selon nous une avancée majeure dans la compréhension de l'interaction entre les fibroblastes et les macrophages dans les chéloïdes, plusieurs points peuvent être discutés. Le plus important concerne l'origine des macrophages utilisés durant ces expérimentations. En effet, nous aurions souhaité pouvoir réaliser ces expériences à partir de monocytes provenant de patients porteurs de chéloïdes, plutôt que de donneurs sains. L'ajout de prélèvements sanguins dans le cadre de l'étude clinique « Scar Wars » était cependant compliquée, et un volume de sang relativement important aurait été nécessaire afin d'obtenir des cellules en quantité suffisante. De plus, il aurait été compliqué de faire correspondre les cultures de FC et de macrophages provenant du même patient, de par la temporalité d'obtention des cellules (7 jours pour obtenir des macrophages polarisés, contre plusieurs semaines avant de pouvoir récolter les fibroblastes). Aujourd'hui, nous imaginons pouvoir générer des monocytes homologues aux fibroblastes de chéloïdes via la production d'iPS (*induced Pluripotent Cells* – Cellules pluripotentes induites) à partir des cellules déjà banquées.

Enfin, au-delà des M1 et M2 que nous avons utilisé, il serait intéressant d'évaluer l'effet d'autres sous-types de macrophages sur les fibroblastes de chéloïdes. En effet, les M2 utilisés au cours de nos expérimentations, de par les cytokines utilisées pour leur activation ainsi que par leur expression de CD206, peuvent être considérés comme des M2a. D'autres sous-types, notamment les M2c, qui sont décrits comme pro-cicatriciels mais peu étudiés dans la fibrose, pourraient avoir un effet sur les FC pourrait être notable. En parallèle de mes travaux de thèse, et grâce à la contribution à un travail de Master 2 mené au laboratoire, nous avons mis au point et validé la production de macrophage de type M2c. L'évaluation de leur sécrétome sur nos cellules chéloïdiennes est donc prévu à très court termes.

3. Contraintes expérimentales

3.1. Variabilité inter-patients

Au sein des différents travaux menés lors de cette thèse, nous avons parfois constaté des variations phénotypiques entre les différentes souches de fibroblastes utilisées, qu'elles proviennent de chéloïdes ou de tissus sains. Certaines souches de FC sont en effet plus sensibles que d'autres à la présence d'un microenvironnement pro-fibrotique, ce qui explique les écarts types parfois importants dans les données des 3 articles présentés ci-dessus. Ces cellules étaient cependant toutes extraites de zones similaires au sein des chéloïdes, selon le même protocole et par le même expérimentateur. Nous avons également essayé au maximum de faire correspondre les âges, sexes et phototypes des différents patients. Malgré tout, de nombreux facteurs difficiles à appréhender pourraient expliquer les différences que nous avons constatées. C'est notamment le cas des conditions environnementales dans lesquelles évoluent les patients, ou de leur fond génétique.

3.2. Phénotype des fibroblastes

Au delà de la variabilité des fibroblastes entre les patients, de plus en plus de travaux s'accordent aujourd'hui sur la présence de plusieurs sous-types fibroblastiques au sein du tissu chéloïdien²⁸⁰. Bien que la diversité fonctionnelle de ces fibroblastes n'ait pour l'instant pas été investiguée, elle serait susceptible d'impacter l'activité des fibroblastes et leur profil fibrotique. Afin de préciser les résultats obtenus au sein des études ci-dessus, il serait nécessaire de qualifier le profil de nos fibroblastes, notamment via leur expression de marqueurs de fibroblastes mésenchymateux (CD266⁺, CD9⁻, COL11⁺, POSTN⁺). Ce sous-type a en effet été rapporté comme ayant un rôle fibrotique au sein des chéloïdes²⁸⁰.

De plus, les fibroblastes utilisés dans cette étude sont extraits de chéloïdes installées depuis plusieurs mois. Nous pourrions supposer que le phénotype des fibroblastes au sein de ces chéloïdes serait différent de celui de fibroblastes présents dans des chéloïdes formées plus précocement, dans un environnement sûrement d'avantage inflammatoire. Avoir accès à des FC de chéloïdes « jeunes » pourrait nous permettre d'adresser l'effet thérapeutique du sécrétome de M1 de façon plus précoce. De plus, les fibroblastes que nous utilisons sont issus

du centre des chéloïdes. Il serait intéressant de reproduire ces expérimentations avec des fibroblastes du bord de la cicatrice, qui se veut être la partie la plus active de ces pseudo-tumeurs.

Enfin, concernant les fibroblastes sains, nous avons constaté qu'ils répondaient très peu à une stimulation pro-fibrotique induite par le TGF- β 1. Ces résultats étaient opposés à certaines données publiées dans la littérature, qui suggéraient que le TGF- β 1 induisait l'expression d' α -SMA au sein des FDS^{85,510}. Ces différences entre nos études pourraient être liées à la variabilité des cellules désignées sous le nom de fibroblastes dermiques « sains ». En effet, certaines des lignées de FDS commerciales et utilisées dans ces études ont une origine inconnue^{85,511}. Dans les études utilisant des fibroblastes primaires, l'origine des cellules est variable, allant de la peau du visage⁵¹², du prépuce⁵¹³, à la peau saine provenant des marges de résections de tissu cancéreux⁵¹⁴. Dans notre laboratoire, nous utilisons des fibroblastes sains extraits de dermoliplectomies abdominales. Les patients dont provient le tissu sont généralement des femmes, entre 35 et 60 ans.

PARTIE V

-

Conclusion générale

La maladie chéloïdienne est une maladie complexe, mal prise en charge, qui est encore aujourd'hui un réel problème de santé publique. Beaucoup de mécanismes moléculaires et cellulaires associés à leur pathogénèse restent à découvrir et à comprendre. En ce sens, les travaux engagés durant ma thèse visaient à mieux appréhender ces phénomènes centrés sur l'axe immunité-fibroblastes-fibrose au sein des chéloïdes. Nous avons ainsi contribué à décrire pour la première fois la régulation de la physiologie des fibroblastes de chéloïdes par les macrophages, et avons offert de nouvelles perspectives thérapeutique pour le traitement de la maladie chéloïdienne.

Notre modèle de sphéroïde *in vitro* s'est avéré incapable de reproduire l'état fibrotique des fibroblastes de chéloïde constaté *in vivo*. Nous avons en réponse utilisé un modèle plus classique, en 2 dimensions, afin de montrer l'intérêt de plusieurs thérapeutiques dans le contexte des chéloïdes. L'halofuginone a ainsi été suggéré comme pouvant posséder des capacités anti-fibrotiques qui pourraient être utilisées dans le traitement des chéloïdes. Notre étude a également montré que les macrophages étaient de puissants modulateurs de l'état fibrogénique des fibroblastes de chéloïdes. La description de l'effet anti-fibrotique des macrophages de type M1 est selon nous une réelle avancée pour la recherche fondamentale sur la maladie chéloïdienne. Durant les prochaines années, ces cellules pourraient être placées au cœur de nouveaux traitements innovants et permettraient de prévenir voir de reverser le développement des chéloïdes.

Ces trois années de thèse ont été une véritable aventure humaine, riche de rencontres avec des chercheurs de différents horizons, mais également avec le grand public. Au niveau scientifique, j'ai eu l'opportunité d'initier un travail prometteur avec le Docteur Wilfrid Boireau sur les Evs, qui nous l'espérons servira de tremplin à un nouveau travail de thèse. J'ai également participé à la réalisation des expérimentations publiées dans l'article du docteur Preeyawaas Phemniuan, chercheur thaïlandais ayant passé une année au laboratoire dans le cadre de sa thèse. Ma contribution à cet article m'a valu la place de deuxième auteur dans le manuscrit présenté ci-après en Annexe 2. J'ai également eu à cœur de m'impliquer dans l'ensemble des événements de vulgarisation scientifique organisés par l'Université de Franche-Comté. J'ai notamment été responsable de l'organisation du stand de la Fête de la Science en 2022 et 2023. J'ai également participé à l'édition 2020 de la Nuit des chercheurs, et à l'organisation du Forum des Jeunes chercheurs en juin 2023. En résumé, les mots-clés de mon travail de thèse : science, échange, vulgarisation.

PARTIE VI

-

Annexes

Annexe 1 : Best presentation award obtenu en décembre 2022 au NAPA (Chiang Mai, Thaïlande).



NAPA 2022

BEST PRESENTATION AWARD

GRANTED TO

ZÉLIE DIRAND

FOR HER ORAL PRESENTATION AT
**11th INTERNATIONAL CONFERENCE ON NUTRITION
 AND PHYSICAL ACTIVITY IN AGEING, OBESITY AND CANCER**

December 15 - 17, 2022, Chiang Mai, Thailand

S. Jirak
 Associate Professor
 SUPAT JIRANUSORNKUL, Ph.D.

Chairperson, NAPA2022
 Dept. Faculty of Public Health, Chiang Mai University

Madaya Chingamwong
 Professor
 MALYN UNGSURUNGSIEL, Ph.D.

Chairperson, NAPA2022
 President
 Thai Endocrinological Society

Yong-Joon Surh
 Professor
 YOUNG-JOON SURH, Ph.D.

Chairperson, NAPA2022
 Director, Core Research Center,
 College of Pharmacy, Seoul National University

Yong-Sang Song
 Professor
 YONG-SANG SONG, Ph.D.

Chairperson, NAPA2022
 Department of Obstetrics & Gynecology,
 Gynecologic Cancer Center,
 College of Medicine, Seoul National University



Annexe 2 : Article publié dans le cadre de la thèse de sciences du Dr Preeyawaas Phimnuan, publié en 2023 dans ACS Omega.

Beneficial Effects of a Blended Fibroin/Aloe Gel Extract Film on the Biomolecular Mechanism(s) *via* the MAPK/ERK Pathway Relating to Diabetic Wound Healing

Preeyawass Phimnuan, Zélie Dirand, Marion Tissot, Saran Worasakwutiphong, Anuphan Sittichokechaiwut, François Grandmottet, Jarupa Viyoch,* and Céline Viennet*



Cite This: *ACS Omega* 2023, 8, 6813–6824



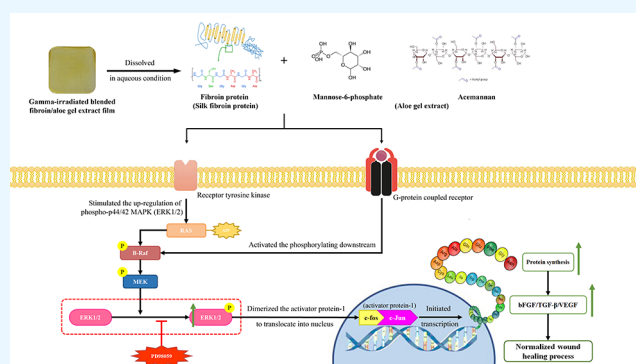
Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

ABSTRACT: In diabetic patients, the process of wound healing is usually delayed or impaired. A diabetic environment could be associated with dermal fibroblast dysfunction, reduced angiogenesis, the release of excessive proinflammatory cytokines, and senescence features. Alternative therapeutic treatments using natural products are highly demanded for their high potential of bioactive activity in skin repair. Two natural extracts were combined to develop fibroin/aloe gel wound dressing. Our previous studies revealed that the prepared film enhances the healing rate of diabetic foot ulcers (DFUs). Moreover, we aimed to explore its biological effects and underlying biomolecular mechanisms on normal dermal, diabetic dermal, and diabetic wound fibroblasts. Cell culture experiments showed that the γ -irradiated blended fibroin/aloe gel extract film promotes skin wound healing by enhancing cell proliferation and migration, vascular epidermal growth factor (VEGF) secretion, and cell senescence prevention. Its action was mainly linked to the activation of the mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) signaling pathway known to regulate various cellular activities, including proliferation. Therefore, the findings of this study confirm and support our previous data. The blended fibroin/aloe gel extract film displays a biological behavior with favorable properties for delayed wound healing and can be considered as a promising therapeutic approach in the treatment of diabetic nonhealing ulcers.



1. INTRODUCTION

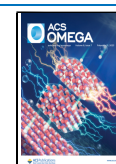
A chronic diabetic foot ulcer (DFU) is described as delayed wound healing leading to amputation in impaired glucose tolerance patients. About 15–25% of diabetic patients are expected to face this complication.¹ The prevention of DFU is complicated regarding the adverse incidences on a patient's well-being, and the prevalence is mainly associated with a number of factors that involves cutaneous cell malfunction and growth factor disorder.² Dermal fibroblasts play an important role in skin structure formation and maintenance of homeostasis, including skin barrier construction, extracellular matrix (ECM) production, and angiogenesis support. The decrease of proliferative and mitogenic abilities to the essential growth factors, as well as the deficiency of collagen and enzymatic production, occurs in diabetic ulcer fibroblasts compared to normal fibroblasts.³ In the molecular pathway, the metabolic abnormalities cause insufficient cellular growth factor responses, including transforming growth factor (TGF- β 1), platelet-derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), and especially vascular epidermal growth factor (VEGF).^{4,5} During normal wound healing, these growth factors

play important roles in the inflammatory and proliferative processes simultaneously with re-epithelialization.⁶ They regulate cellular responses and stimulate intracellular signaling pathways involved in the regulation of cell proliferation, differentiation, migration, and protein synthesis. In diabetes conditions, the healing process is dysfunctional by the changes in the levels and timing of TGF- β 1, PDGF, bFGF, and VEGF expression.⁷ Downregulation of these signals significantly reduces cell migration and proliferation, vasculature remodeling, and maturation, showing critical defects in skin damage repair. Furthermore, deregulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling cascades such as extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), p38 MAPK (p38), and c-Jun

Received: November 23, 2022

Accepted: January 23, 2023

Published: February 7, 2023



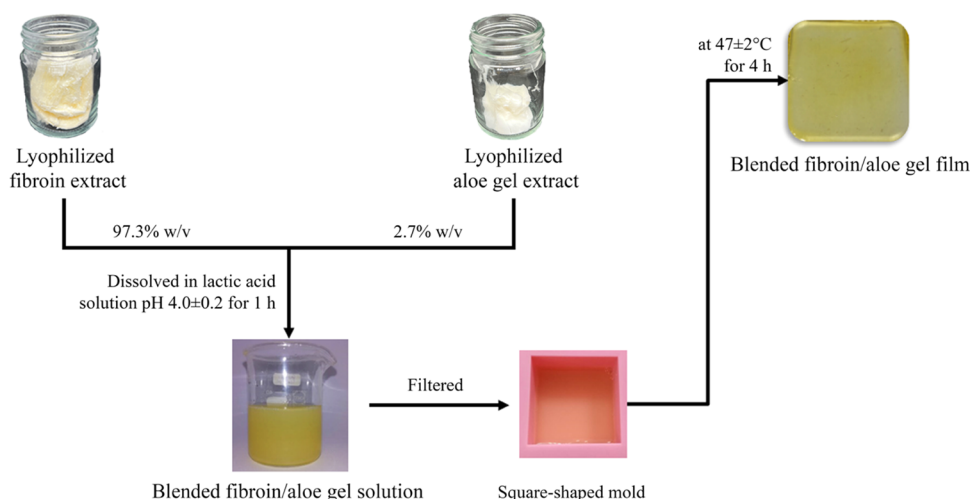


Figure 1. Preparation procedure of the blended fibroin/aloë gel extract film.

NH₂-terminal protein kinase (JNK) have significant effects on wound healing.⁸ The overproduction of glucose induces oxidative stress and/or glycation that contribute to impaired activation of growth factor receptors and serine/threonine kinases, resulting in downregulation of ERK1/2 activity.^{9,10}

We believe that primary healthcare systems and medical innovations involved in the treatment and management of DFU are essential. Wound dressing is an alternatively practical tool that plays a pivotal role in managing diabetic foot ulcers.¹¹ Composed of natural products, they have frequently proved their efficacy in the treatment of skin disorders. The cooperation of silk fibroin and aloë gel extract biomaterials has illustrated potential properties in promoting wound healing in *in vitro* and *in vivo* models, as well as in clinical trials.^{12,13}

Fibroin protein, comprising the silk cocoon of *Bombyx mori*, illustrates the remarkable biocompatibility to several cells and tissues because of its potent properties in the stimulation of the migration and proliferation of fibroblasts.^{12,14} Furthermore, at the molecular level, silk fibroin accelerates signals, including AKT/mTOR and MAPK pathways extensively involved in cell migration and proliferation regulation.¹⁵ Regarding its excellent ability, silk fibroin can be considered as a bioactive material for wound dressing in the medical field.

Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) has been broadly utilized for several traditional therapeutics, especially for wound healing properties. Many productive components consisting of *Aloe vera* exert accelerating effects on fibroblast proliferation and migration in wound granulation tissue.¹⁶ For the cellular pathway, *Aloe vera* stimulates wound repair by promoting collagen type I synthesis, influencing the cyclin-dependent cell cycle progression, stimulating cross-linking of collagen for wound contraction and promoting wound-breaking strength.¹⁷ In addition, *Aloe vera* increases the expression of VEGF and TGF- β 1 genes in the wound of diabetes-induced rats.¹⁸ Hence, it clarifies the enhancing capabilities of growth factor expression associated with the wound healing process *via* easy penetration across the skin.¹⁹

Our previous studies found that the blended fibroin/aloë gel extract film demonstrates potential healing effects, based on experimentations *in vitro* and *in vivo* in streptozotocin-induced diabetic rats, and clinical trials in diabetic foot ulcer patients.^{12,13} Additionally, the γ -irradiated developed film enhanced the proliferation and migration of the healthy fibroblast cells. The

presence of functional groups in the blended fibroin/aloë gel film, including amides (I, II, III), glucan units, pyranoside ring, and mannose, promotes tissue repair, but the underlying molecular mechanism is still unclear.²⁰ In this present study, we explored the beneficial effects of the γ -irradiated blended fibroin/aloë gel extract film on cell biological activities and biomolecular mechanism(s) using normal dermal, diabetic dermal, and diabetic wound fibroblasts. The *in vitro* experiments confirmed that our extract film promotes skin wound healing by enhancing cell viability, proliferation, migration, and VEGF secretion as well as inhibiting cell senescence. The activation of the MAPK signaling pathway, particularly ERK1/2, was involved in the underlying molecular mechanism. We likewise indicate that the developed film is appropriate for managing normal or chronic skin wounds such as DFU.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Ethical Statement. The experiment was approved by the medical ethics committee of Besançon University Hospital, France, and patients were informed about the purpose of the research study and provided written consent (protocol 2010-104). We confirm that all methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations.

2.2. Materials. Yellow silkworm cocoons (*Bombyx Mori*, Nang-Laai strain, Chiang Mai Province, Thailand) were received by Queen Sirikit Sericulture Center, Chiang Mai Province, Thailand. *Aloe vera* was cultured and collected from Phitsanulok Province, Thailand. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin–streptomycin (PS, 10,000 U/mL), 0.05% trypsin/0.02% EDTA, and Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS) were purchased from PAN Biotech, Dominique Dutscher, France. Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT reagent), lactic acid solution (88%), dimethyl sulfoxide (DMSO), 4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI), bovine serum albumin (BSA), propidium iodide (PI), copper(II) sulfate solution, bicinechonic acid solution, protease inhibitor cocktail, Triton X-100, formaldehyde solution 4%, MEK/ERK inhibitor PD98059, phalloidin–tetramethylrhodamine B isothiocyanate, and senescence cells histochemical staining kit were purchased from Sigma-Aldrich Co. Human VEGF ELISA kit was purchased from Diaclone, France. Cell proliferation BrdU ELISA assay was purchased from MERCK, Germany. Ethanol 96% (EtOH) was

purchased from Carlo Erba, France. Rabbit anti-human phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2), rabbit anti-human p44/42 MAPK (ERK1/2), goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 conjugate, and rabbit IgG isotype antibodies (mAb) were purchased from Cell Signaling Technology. Fluoromount G was purchased from Southern Biotech.

2.3. Preparation of the γ -Irradiated Blended Fibroin/Aloe Gel Extract Film. Fibroin from silk cocoon (*Bombyx Mori*, Nang-Laai strain) and aloe gel extract from the gel part of the *aloe vera* (*Aloe barbadensis* miller) leaf were extracted separately to achieve the lyophilized form. Subsequently, they were qualified to control the physicochemical characteristics prior to the preparation of the film according to our previous study.^{12,13,20} The obtained fibroin commonly provided a percentage of yield in the range of 54–58% w/w and protein content in the range of $97.43 \pm 0.44\%$ w/w. For the infrared spectra obtained using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, amide I at 1611–1696, amide II at 1501–1550, and amide III at 1200–1320 cm^{-1} must be found. Moreover, its molecular weight pattern would consist of a band of L-chain at 25 kDa and a smear band of H-chain in the range of 30–245 kDa. For aloe gel extract, it generally provided a percentage of yield in the range of 0.04–0.06% w/w and protein content in the range of $6.86 \pm 1.15\%$ w/w. The infrared (IR) spectra of the aloe gel extract indicated peaks at 1730–1740 and 1236–1252 (O-acetyl ester), 1030–1079 (glucan units), 875–959 (pyranoside ring), and 805–813 (mannose) cm^{-1} . The molecular weight pattern presented bands of 14 and 20–100 kDa.

The film preparation was performed as in our previous study.²⁰ Briefly, 540 mg of lyophilized fibroin and 15 mg of lyophilized aloe gel extract were dissolved for 1 h in lactic acid solution (pH 4.0 ± 0.2), finalizing volume of 15 mL. The mixed extract solution was then filtered and cast in a square-shaped mold ($6 \times 6 \text{ cm}^2$) at $47 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ for 4 h, as shown in Figure 1. The ratio of the blended fibroin to aloe gel extract in the film (36 cm^2) was 97.3 to 2.7% w/w. For sterilization, the obtained film was performed using a γ irradiation technique facilitated by Thai Adhesive Tapes Industry, Ltd., Bangkok, Thailand. Subsequently, the physicochemical properties of the sterilized film was determined to control the quality, including physical appearance (flexible yellowish film with an approximate thickness of 0.05 mm), nonporous morphology by scanning electron microscopy (SEM) imaging, and mechanical properties (breaking force of $6.26 \pm 0.44 \text{ N}$ and percentage elongation at break of $1.20 \pm 0.07\%$). For the chemical structure analysis, FTIR spectroscopy presented infrared spectra at 1630–1640 (amide I), 1510–1520 (amide II), 1220–1240 (amide III), 1050–1060 (glucan units), 1010–1020 (pyranoside ring), and 820–830 (mannose) cm^{-1} .

2.4. Film Extract Preparation. The film extract named in the present study was the film-free supernatant collected from incubating $1 \times 1 \times 0.005 \text{ cm}^3$ of sterilized film in 1 mL of serum-free DMEM at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h. The collected supernatant was filtered and used in further experiments.

2.5. Fibroblast Cell Culture. Fibroblasts used in this study were classified into three groups: normal dermal fibroblasts (NDF), diabetic dermal fibroblasts (DDF), and diabetic wound fibroblasts (DWF). NDF and DWF were, respectively, obtained from one patient undergoing skin abdominal plastic surgery and one patient with diabetic foot ulcers. The isolation and culture methods of fibroblasts were consistent with previous reports.²¹ DDF were purchased from PELOBIOTECH GmbH, Germany.

Cells were cultured in complete DMEM supplemented with 10% FBS and 1% PS (10,000 U/mL penicillin, and 10 mg/mL

streptomycin) at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in a humidified 5% CO_2 atmosphere. Cells were trypsinized when they reached a confluency of 80% and used up to passage 8.

2.6. Cytocompatibility and Cell Proliferation. The fibroblast cells (1×10^4 cells/well) were cultured in a 96-well plate for 24 h. The incubated medium was replaced with DMEM with FBS-free (0% FBS), DMEM with 2% FBS, and DMEM with the film extract, and incubation was conducted for 24 h. The incubated medium was replaced with 100 μL of serum-free DMEM containing MTT reagent (0.5 mg/mL) for 4 h, and then, 100 μL of DMSO was added to each well. The absorbance was read at 517 nm using a spectrophotometer (Multiskan FC, Thermo Scientific). The experiment was performed in triplicates ($n = 8$) for each condition. Additionally, for each group, the percentage of viability of the control (DMEM with 0% FBS) has been adjusted as 100% and compared with the other two conditions (DMEM with 2% FBS and DMEM with the film extract).

The cell proliferation was quantified by a BrdU assay kit according to the manufacturer's protocol. Briefly, fibroblast cells (1×10^4 cells/well) were seeded in a 96-well plate and incubated for 24 h. The incubated medium was replaced by DMEM with 0% FBS, DMEM with 2% FBS, and DMEM with film extract for 24 h. BrdU labeling solution (100 μL) was added and incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h. After the incubation, the solution was removed and 200 μL of FixDeant was added and incubated at room temperature (RT) for 30 min. Then, 100 μL of the anti-BrdU-POD working solution was added and incubated at RT for 2 h. The solution was removed and washed three times with 100 μL of PBS. After the washing, 100 μL of substrate solution was added and incubated at RT for 10 min, followed by 25 μL of 1 M sulfuric acid. The absorbance at 450 nm was detected using a spectrophotometer. The experiment was performed in triplicates ($n = 8$) per condition. Additionally, for each group, the percentage of cell proliferation of the control (DMEM with 0% FBS) was adjusted to 100% and compared with the other two conditions (DMEM with 2% FBS and DMEM with film extract).

2.7. Cell Cycle. Fibroblast cells (1×10^5 cells/well) were seeded in a 6-well plate for 24 h. The incubated medium was replaced by DMEM with 0% FBS, DMEM with 2% FBS, and DMEM with film extract for 24 h. After incubation, supernatants were discarded and cells were detached with 0.25% trypsin/0.01 M EDTA. Cell suspensions were centrifuged, and pellets were then fixed with 70% EtOH at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ overnight. After being washed with cold PBS, cell pellets were stained with 300 μL of PBS + 5 μL of PI (from 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ stock solution) + 1 μL of RNase (from 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ stock solution). The cell cycle was analyzed using an LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson). The experiment was performed in triplicate ($n = 3$) per condition. The percentage of total cells for each cell cycle phase (G0/G1, S, and G2/M) and for each cell group was reported.

2.8. Cell Migration. Fibroblast cells (3×10^4 cells/well) were seeded in 96-well ImageLock plates. When the cells reached the confluent monolayer, the IncuCyte Wound Marker tool (Sartorius, Germany) was utilized to create a scratching area. Cells were washed gently with PBS, followed by adding DMEM with 0% FBS, DMEM with 2% FBS, and DMEM with film extract for 24 h and incubated in the IncuCyteS3 system (Sartorius, Germany). To record cell migration, the scratched areas were photographed immediately after scratching in real time every 2 h over a period of 48 h. Relative wound density was quantified using the IncuCyte Software S3 (Sartorius), measuring the spatial cell density in the wound area relative to

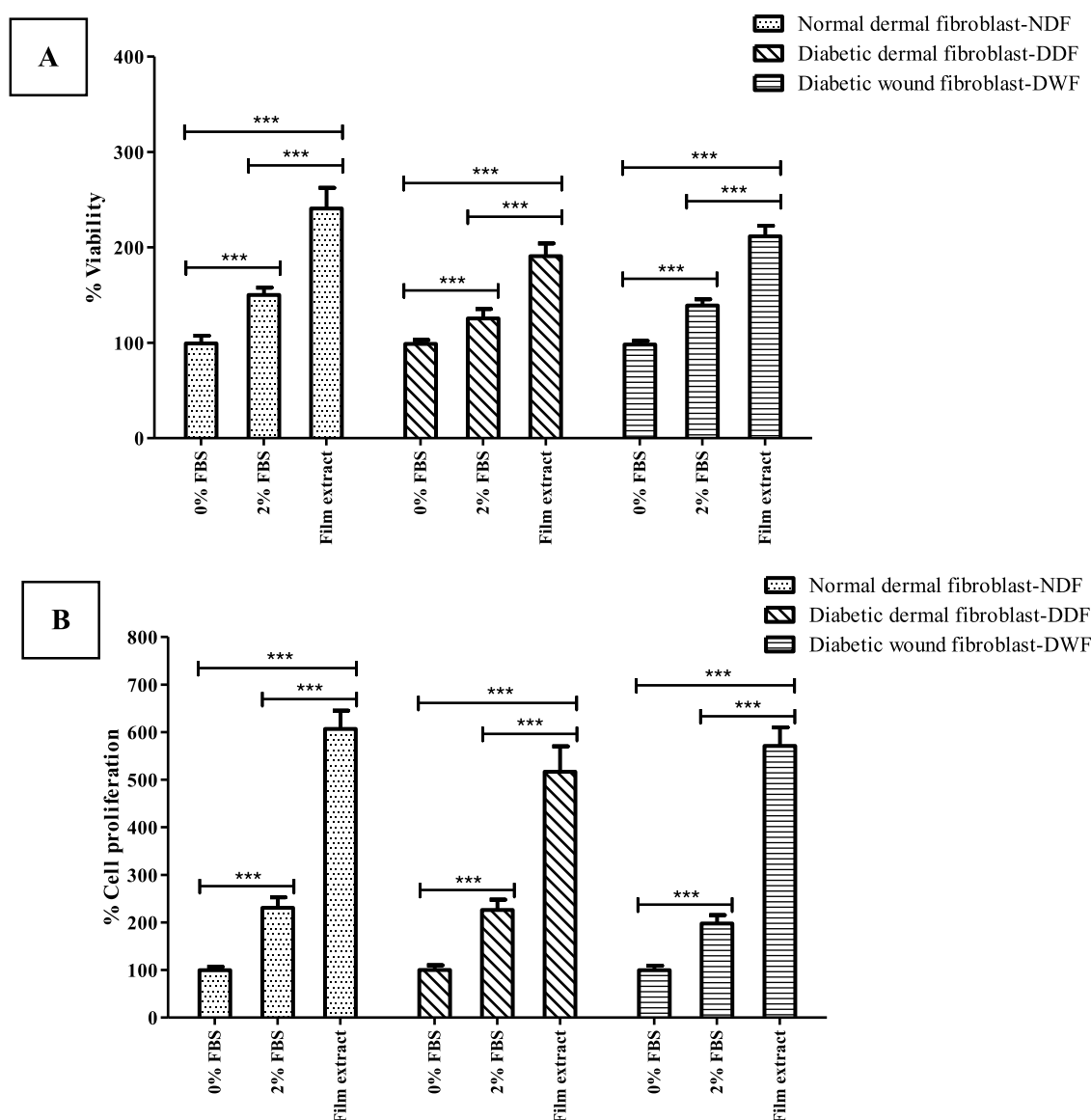


Figure 2. Determination of (A) viability and (B) proliferation of fibroblasts (NDF, DDF, and DWF) cultured with DMEM with 0% FBS, DMEM with 2% FBS, and DMEM with film extract for 24 h. Cell viability and cell proliferation were measured using XTT assay and BrdU assay. Data for individual cell types are expressed as the percentage of the control group (FBS-free DMEM), which is considered as 100% cell viability and cell proliferation; each column represents mean \pm S.D. in triplicate ($n = 8$); *** $p < 0.001$.

the spatial cell density outside of the wound area at every time point. The experiment was performed in triplicate ($n = 5$) per condition.

2.9. Cell Senescence. Fibroblast cells (1×10^4 cells/well) were seeded in a 96-well plate for 24 h. The incubated medium was replaced by DMEM with 0% FBS, DMEM with 2% FBS, and DMEM with film extract for 24 h. The SA- β -galactosidase (SA- β -gal) activity was quantified by the senescence cells histochemical staining kit according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were fixed for 5 min at RT and incubated with SA- β -gal staining solution at 37 °C overnight (without CO₂ atmosphere). They were counterstained with the DAPI solution (5 μ L/mL) for 10 min at RT. The SA- β -gal positive cells exhibited a blue color. Three independent fields were randomly selected in each well to observe cells. Cells were scored by bright-field and fluorescence microscopy (Olympus IX50 microscope, Japan). Data were expressed as the ratio percentage

of SA- β -gal positive cells to the total cell count. The experiment was performed in triplicate ($n = 8$) per condition.

2.10. VEGF Protein Secretion. Fibroblast cells (2×10^5 cells/well) were seeded in a 12-well plate and incubated for 24 h. The incubated medium was replaced by DMEM with 0% FBS, DMEM with 2% FBS, and DMEM with film extract for 24 h. Supernatants were collected with 10% v/v anti-protease solution. The concentration of VEGF from the supernatant was assessed using a VEGF ELISA kit following the manufacturer's protocol. Briefly, 50 μ L of assay solution was added, followed by 200 μ L of standards or cell culture supernatant, and incubated at RT for 2 h. Then, 200 μ L of human VEGF-conjugated antibody was added and incubated at RT for 2 h. After washing, 200 μ L of substrate solution was added and incubated at RT for 30 min. The reaction was stopped with 50 μ L of stop solution. Then, absorbance was measured at 450 nm using a spectrophotometer. The amount of VEGF was expressed in pg/mg protein. The protein content was

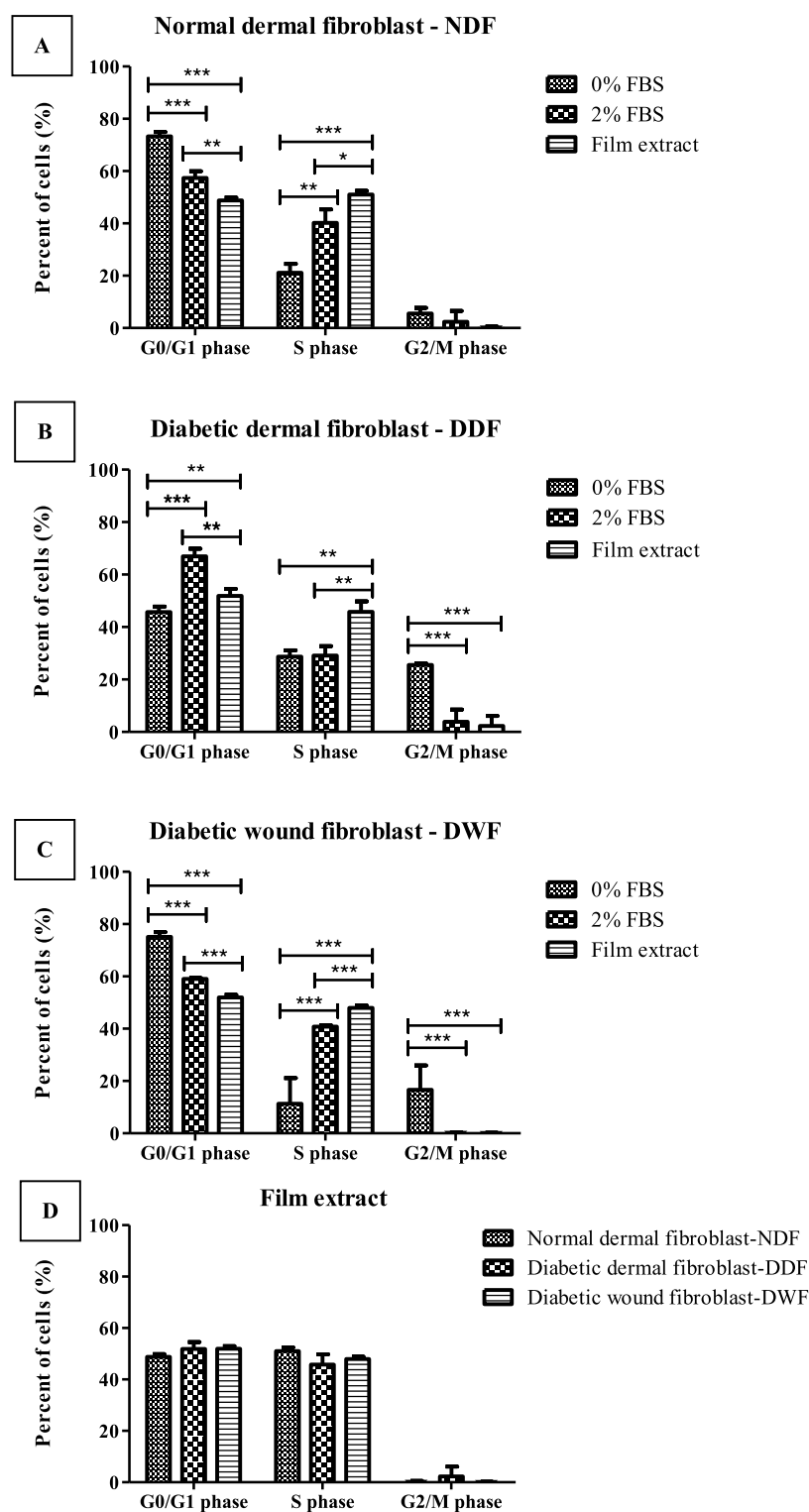


Figure 3. Cell cycle phases of fibroblasts (NDF, DDF, and DWF) cultured with DMEM with 0% FBS, DMEM with 2% FBS, and DMEM with film extract for 24 h. The cell cycle was analyzed by flow cytometry. The figures show the percentage of total cells in the G0/G1 phase, S phase, and G2/M phase of (A) NDF, (B) DDF, and (C) DWF and (D) the effect of DMEM with film extract in different cell types. Each column represents mean \pm S.D. in triplicate ($n = 4$); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

determined by the Bradford assay with BSA as the protein standard. The experiment was performed in triplicate ($n = 4$) per condition.

2.11. ERK1/2 Signaling Pathway Assays. 2.11.1. Cell Culture and MEK/ERK Inhibitor Treatment. NDF were cultured for 24 h in a complete DMEM, which was changed

during 1 h for serum-free DMEM with or without the PD98059 solution ($10 \mu\text{M}$), followed by 24 h of incubation in DMEM with 0% FBS, DMEM with 2% FBS, and DMEM with film extract. Cell proliferation was quantified by the BrdU assay kit described above. The experiment was performed in triplicate ($n = 8$) per condition.

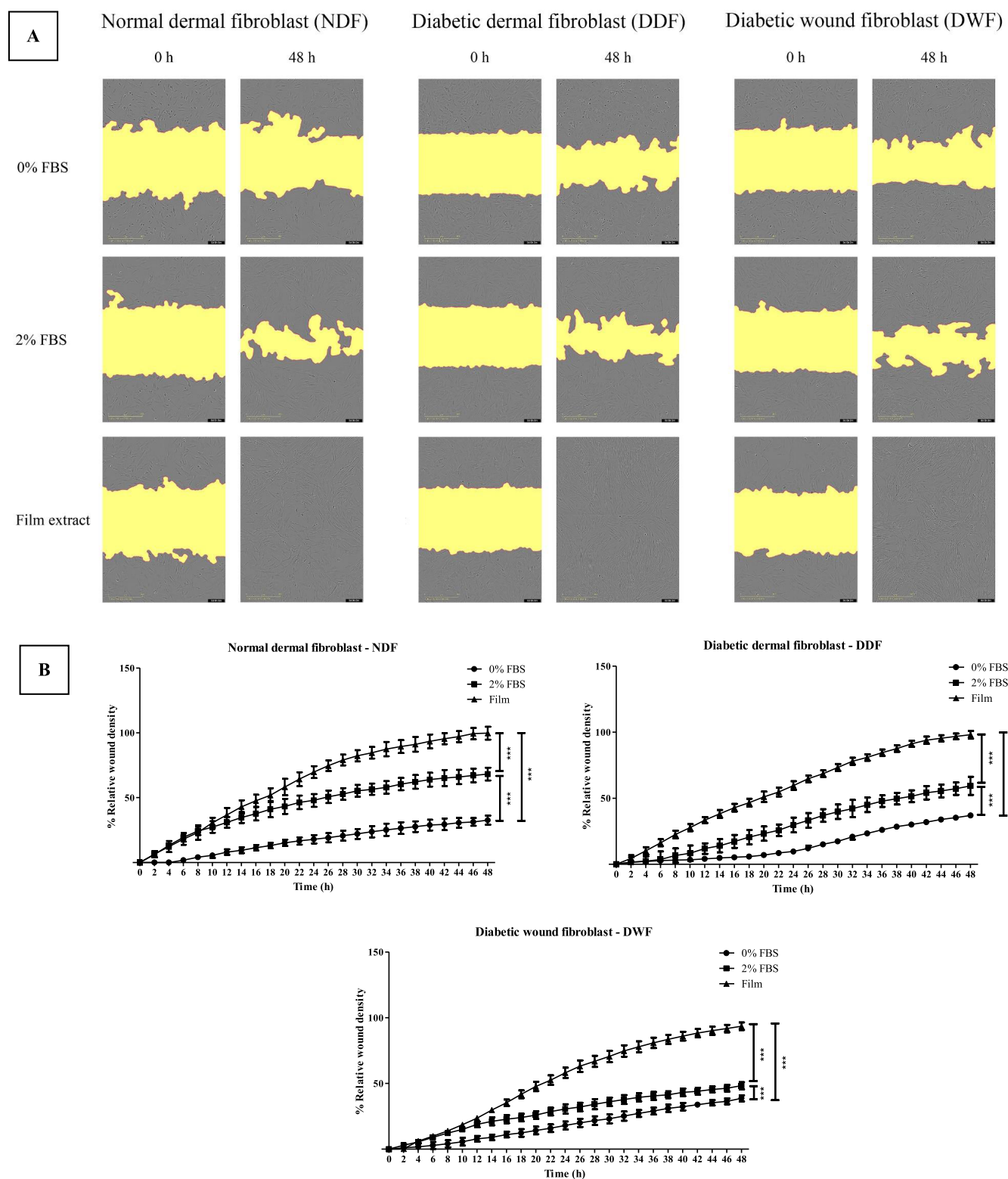


Figure 4. Migration of fibroblasts (NDF, DDF, and DWF) cultured with DMEM with 0% FBS, DMEM with 2% FBS, and DMEM with film extract for 48 h. Cell migration was studied by the scratch assay. The figures demonstrate (A) the visualization of the scratching gap at 10 \times magnification and (B) the percentage of relative wound density. Each time point represents mean \pm S.D. in triplicate ($n = 5$); *** $p < 0.001$ at 48 h.

2.11.2. Confocal Imaging. NDF (1×10^5 cells/well) were seeded onto coverslips in a 12-well plate for 24 h. The incubated medium was replaced by 10 μ M of PD98059 for 1 h. The cells were then washed and incubated in DMEM with 0% FBS, DMEM with 2% FBS, and DMEM with film extract for 1 and 24

h. They were then fixed with paraformaldehyde (PFA 4% final concentration in PBS) at RT for 10 min, washed, permeabilized using 0.1% Triton X-100 for 10 min, washed, and blocked with 5% goat serum + 0.3% Triton X-100 in PBS for 1 h at 4 $^{\circ}$ C. Coverslips were incubated with phospho-p44/42 MAPK

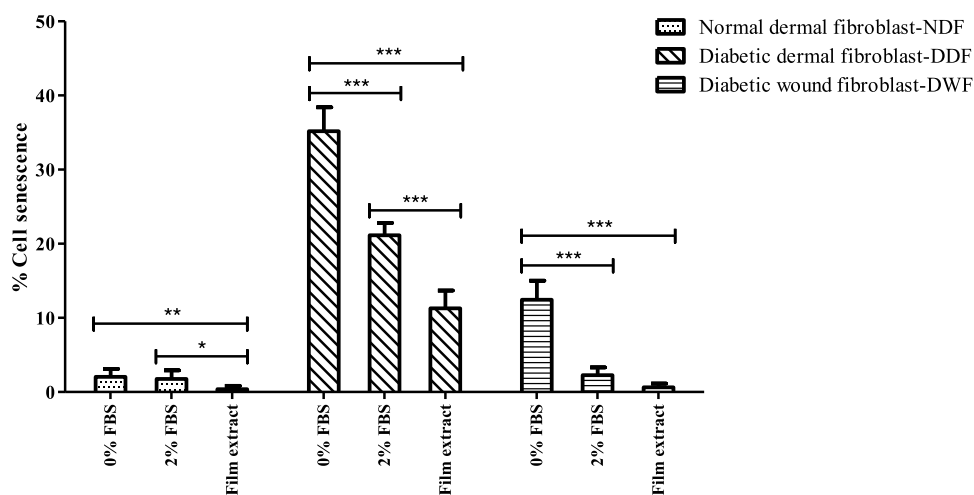


Figure 5. Senescence of fibroblasts (NDF, DDF, and DWF) cultured with the DMEM with 0% FBS, DMEM with 2% FBS, and DMEM with film extract for 24 h. The cell senescence was quantified using the SA- β -gal activity assay. Data are expressed as the ratio percentage of SA- β -gal positive cells to the total cell count, each column represents mean \pm S.D. in triplicate ($n = 8$); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

(ERK1/2) (Thr202/Tyr204) XP rabbit mAb (1:200 in diluent (PBS with 1% BSA + 0.3% Triton X-100)) in a humidified chamber at 4 °C for overnight. The cells were washed and then incubated with goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (1:100 in diluent) for 1 h at 4 °C. They were washed and stained with DAPI to visualize nuclei. Coverslips were mounted with Fluoromount reagent. The immunofluorescence images were captured with an LSM 800 laser scanning confocal microscope (Zeiss, Germany).

2.11.3. Flow Cytometry. NDF (6×10^5 cells/well) were cultured in a 12-well plate for 24 h. The supernatant was then discarded and replaced with DMEM with 0% FBS, DMEM with 2% FBS, and DMEM with film extract for 24 h. After incubation, the cells were detached and fixed with 4% PFA at RT for 10 min. After washing, the cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 at RT for 15 min. They were then suspended in blocking buffer containing 5% goat serum + 0.3% Triton X-100 in PBS for 1 h at 4 °C and incubated overnight at 4 °C with p44/42 MAPK (ERK1/2) rabbit mAb (1:400 in diluent), phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) XP rabbit mAb (1:800 in diluent) and rabbit mAb Isotype control (1:200 in diluent). After washing, the cells were incubated with goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 conjugate (1:100 in diluent) in the dark at 4 °C for 1 h. Finally, the cells were washed, suspended in 2 mM EDTA/PBS, and analyzed using a flow cytometer (LSR Fortessa, Becton Dickinson). FACS analysis was performed using FACSDiva software (Becton Dickinson); 20,000 events were recorded for each sample. The results are mean values of fluorescence intensity \pm SD of triplicate measurements ($n = 4$) per condition.

2.12. Statistical Analysis. The data are presented as the mean \pm SD. Statistical comparisons between each condition were performed using a one-way ANOVA test (GraphPad Prism software).

3. RESULTS

3.1. Cytotoxicity and Cell Proliferation. For the cytotoxicity, the results showed that NDF, DDF, and DWF treated with film extract for 24 h have viability percentages of 242.77 ± 8.95 , 193.24 ± 6.91 , and 215.52 ± 5.22 , respectively, which are significantly higher than DMEM with 0% FBS (100 ± 8.34 , 100 ± 4.21 , and 100 ± 3.79) and DMEM with 2% FBS

(151.26 ± 5.12 , 127.15 ± 7.83 , and 141.64 ± 4.69), as shown in Figure 2A. In the proliferation assay, Figure 2B illustrates that NDF, DDF, and DWF treated with film extract for 24 h have proliferation percentages of 608.83 ± 6.39 , 515.42 ± 10.26 , and 576.90 ± 6.87 , respectively, which are significantly higher than DMEM with 0% FBS (100 ± 7.35 , 100 ± 9.54 , and 100 ± 9.37) and DMEM with 2% FBS (231.49 ± 9.73 , 225.63 ± 9.51 , and 198.30 ± 9.02).

3.2. Cell Cycle. The effect of the film extract on the fibroblast cell cycle as the percentage of cells in cell cycle phases (G0/G1, S, and G2/M) was determined. The percentage of NDF in the G0/G1 phase was significantly lower with film extract (48.76 ± 1.15) than with DMEM with 0% FBS (73.80 ± 1.65) and DMEM with 2% FBS (57.38 ± 2.54), whereas, in the S phase, the percentage of NDF was significantly higher with film extract ($51.03 \pm 1.45\%$) compared to DMEM with 0% FBS ($21.12 \pm 3.40\%$) and DMEM with 2% FBS ($40.22 \pm 5.12\%$), as shown in Figure 3A. The same trend was observed for DDF and DWF; the percentage of NDF in the S phase was significantly higher with film extract ($45.81 \pm 3.98\%$, $47.92 \pm 0.93\%$, respectively) compared to DMEM with 0% FBS ($28.72 \pm 2.43\%$, $11.28 \pm 9.82\%$) and DMEM with 2% FBS ($29.12 \pm 3.60\%$, $40.78 \pm 0.50\%$) (Figure 3B,C). Figure 3D also indicates the effect of the film extract in different cell types as the percentage of total cells in each cell cycle phase. The data showed that the percentage of total cells for each cell cycle phase was not significantly different in each cell type.

3.3. Cell Migration. Cell migration was studied by the IncuCyte scratch assay modified by An et al.²² The results showed that NDF, DDF, and DWF treated with film extract for 24 h elucidated a completely healed scratch after 48 h, while under other conditions (DMEM with 0% FBS and DMEM with 2% FBS), they exhibit no wound closure at the same time, as shown in Figure 4A. At 48 h, percentages of relative wound density for NDF, DDF, and DWF treated with film extract were 99.73 ± 5.01 , 98.01 ± 2.90 , and $93.47 \pm 2.86\%$, respectively, which reached approximately 100% of relative wound density, whereas they were lower for NDF, DDF, and DWF cultured with DMEM with 0% FBS (32.65 ± 3.52 , 37.01 ± 1.75 , and $38.63 \pm 2.36\%$) and DMEM with 2% FBS (68.15 ± 4.91 , 59.37 ± 6.85 , and $48.27 \pm 2.71\%$) (Figure 4B).

3.4. Cell Senescence. The film extract contributed to significantly inhibiting the percentage of cell senescence in NDF, DDF, and DWF as 0.39 ± 0.43 , 11.30 ± 2.39 , and $0.63 \pm 0.51\%$, respectively, compared to DMEM with 0% FBS (2.04 ± 1.09 , 35.18 ± 3.22 , and $12.43 \pm 2.57\%$) and DMEM with 2% FBS (1.77 ± 1.16 , 21.15 ± 1.67 , and $2.27 \pm 1.03\%$), as shown in Figure 5.

3.5. VEGF Secretion. Figure 6 illustrates that NDF, DDF, and DWF treated with film extract for 24 h secrete significantly higher levels of VEGF (1072 ± 35.85 , 979.28 ± 70.97 , and 828.24 ± 87.33 pg/mg protein, respectively) than those treated with DMEM with 0% FBS (448.06 ± 70.96 , 349.62 ± 39.20 , and 140.59 ± 62.68 pg/mg protein) and DMEM with 2% FBS (650.51 ± 41.41 , 569.87 ± 43.77 , and 430.69 ± 50.26 pg/mg protein).

3.6. MAPK/ERK Pathway. Whatever the culture condition (DMEM with 0% FBS, DMEM with 2% FBS, film extract), the pretreatment for 1 h with the PD98059 suppressed cell proliferation and phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) expression, as shown in Figure 7A,B. For the quantitative flow cytometry data on p44/42 MAPK (ERK1/2) phosphorylation, we found that the film extract activates the phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2), confirmed by immunofluorescence images shown in Figure 7B. The mean fluorescence intensity value of phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) was significantly higher with the film extract (2082.50 ± 41.41) than with DMEM with 0% FBS (1206.00 ± 56.23) and DMEM with 2% FBS (1611.50 ± 126.74), as shown in Figure 7C.

4. DISCUSSION

The wound healing process is usually delayed or impaired for patients under diabetic conditions. A major chronic complication is diabetic foot ulcers. A diabetic environment could be associated with dermal fibroblast dysfunction, reduced angiogenesis, the release of proinflammatory cytokines, and senescence features. Alternative therapeutic treatments using natural products are highly demanded for their high potential of bioactive activity in skin repair. We developed a dressing comprising silk fibroin and *Aloe vera* gel extract for a novel approach to the treatment of chronic wound pathologies. Previously, the main markers during the wound healing process were investigated. This study aimed to elucidate the possible MAPK/ERK signaling pathway related to the biological effects of the dressing on fibroblast cells. This investigation was conducted on NDF, DDF, and DWF for the cellular responses and on NDF for the MAPK/ERK signaling pathway.

The cytotoxicity of fibroblasts was evaluated using the MTT colorimetric assay, which provides a readout of cell viability and growth by measuring the metabolic activity of any viable or proliferative cells with NADPH-dependent enzymes that reduce MTT. These results implied that the film extract behaved as having a noncytotoxicity effect on fibroblast cells and might also have the potential to stimulate cell viability and proliferation. Also, the results were similar to our previous study.²⁰

The quantification of cell proliferation of fibroblast cells was performed using the colorimetric BrdU assay. This quantification of cell proliferation is based on the measurement of the incorporation of BrdU (bromodeoxyuridine is a synthetic nucleoside, a structural analogue of thymidine) during DNA synthesis. The results were related to cell viability, which implied a higher rate of cell viability as a higher rate of cell proliferation. In the hyperglycemic environment, the declined cell proliferation is caused by several issues such as the increase of L-lactate

secretion, proinflammatory mediators, and advanced glycation end-products (AGE), leading to enhanced apoptosis *via* activation of ROS, proapoptotic transcription factor FOXO1, and caspase.²³ As the outcome, the film extract is composed of factors that enhance cell proliferation, which is concurrent to the previous findings. As its remarkable properties, silk fibroin regulates the NF- κ B signaling pathway and expression of proteins involved in cell proliferation, including vimentin, cyclin D1, VEGF, and fibronectin.²⁴ Two fibroin-derived peptides, VITTDSDGNE and NINDFDED, located in the N-terminal region, were identified as active agents targeting fibroblast growth.²⁵ Also, a 29 kDa glycoprotein displayed the potential to stimulate the proliferative activity of kidney cells in hamsters and human dermal fibroblasts.²⁶ Moreover, acemannan is one of the main polysaccharide compounds of *Aloe vera*, providing synergistic effects to promote cell proliferation and skin wound healing through the AKT/mTOR signaling pathway.²⁷

Stain DNA with PI and flow cytometry experiments were performed for cell cycle analysis. Typically, p21^{Cip1} and p27^{Kip1} are the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors (CKIs) that play an essential role in interfering with the kinase activities related to the cell cycle. These CKIs are significantly elevated at high glucose levels and inhibit the cyclin/CDK complexes. In cell cycle progression, cells are arrested in the G1 phase, and the proliferation rate is restricted, followed by impaired wound healing processes.²⁸ As the depicted cell cycle data implies, the film-treated cells shifted from the G0/G1 phase to the S phase by binding to cyclin D/CDK4,6 complexes that regulate G1-S phase transit. The film extract promoted cells to enter the S phase *via* the pathway of acemannan, which is an important stage for mitosis and cell growth by influencing cyclin-dependent cell cycle progress through translational regulation of cyclin D1.²⁰ Our cell cycle finding was liable to Yuan et al. who reported that after treating with aloe polysaccharide, the number of cells was increased in the S and G2/M phases preparing for mitosis, and cyclin D1 protein was upregulated in a concentration-dependent manner.²⁹ Thus, we hypothesized that the film extract stimulates cyclin D1 expression in cultured fibroblasts and functions as a transcriptional coregulator ensuing to initiate the shift from cell arrest (G0/G1 phase) to cell synthesis (S phase).

Cell migration was studied by the IncuCyte scratch assay. Regarding the hyperglycemic condition, the excessive production of ROS led to their accumulation, resulting in protein structure dysfunction and aberration of cell migration directly by over-activation of the small Rho GTPase Rac1, thus affecting the cell polarity and morphology.³ Following the effect of film extract to promote cell migration was coincident with the study on mouse embryonic fibroblasts and damaged skin rats, which showed that silk fibroin stimulates the pathway of canonical NF- κ B signaling, which is associated with fibroblast migration and the wound healing process.²⁴ Moreover, a 5.5 kDa glycoprotein isolated from the *Aloe vera* gel improved cell proliferation and migration using keratinocyte scratch wound monolayer.³⁰

SA- β -gal staining was used to measure senescence, a regulatory cell response to multiple types of cellular stress leading to the permanent cell-cycle arrest. The process of cell cycle arrest is regulated by activating p53/p21^{CIP1} and p16^{INK4a}/Rb tumor suppression pathways.³¹ Under diabetic conditions, several downstream cellular abnormalities, especially for cutaneous fibroblasts, are present *via* enhanced activation of p53/p21-dependent pathways and increased senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) activity, resulting in cell senescence and wound healing dysfunction.³² Thus, cell

senescence can compromise tissue repair and regeneration. In this study, the film extract contributed to significant inhibition of fibroblast senescence. These data corresponding to Ma et al. reported that fibroin improved the osseointegration of porous titanium implants under diabetic conditions *via* activation of the PI3K/Akt signaling pathway.³³ Also, Hu et al. found that polysaccharides and flavonoids contained in *Aloe vera* possess free radical scavenging activity.³⁴ We suggested that the film extract has a protective effect on cellular senescence by regulating ROS-induced stress pathways.

The production of VEGF by fibroblasts induces angiogenesis by stimulating the formation of blood vessels and the expansion of an existing vascular bed as it acts as a highly specific mitogen for endothelial cells.³⁵ It is, therefore, one of the essential mediators associated with the wound healing process. VEGF secretion was determined by a colorimetric ELISA kit. An impaired glucose tolerance condition leads to the malfunction of VEGF expression, resulting in cell proliferation and cell migration disturbances, and also affects the prolonged wound healing rate.³⁶ These results confirmed that the film extract could improve the skin repair process by stimulating VEGF secretion. The increase of VEGF secretion was interrelated to the finding of acetyl groups in acemannan and its derivatives, and the β -sitosterol compounds of *Aloe vera* have been investigated to be essential stimulators of VEGF expression.³⁷ Additionally, *Aloe vera* likewise upregulated the expression of the VEGF gene in the diabetes-induced rats.⁸

In summary, whatever the origin of fibroblasts including NDF, DDF, and DWF, we demonstrated that the film extract enhances cell proliferation and migration, stimulates VEGF secretion, and prevents cell senescence features. All of these results suggested that the blended fibroin/alginate gel extract film has significant effects on wound healing. Next, we selected NDF to elucidate the underlying mechanism, particularly the principal intracellular signaling pathway targeted by the film extract.

MAPK pathways are the primary key driving signaling events that facilitate wound healing processes, including cell proliferation, cell migration, cell differentiation, and angiogenesis.³⁸ Activation of MAPK complexes regulates transcription factors by phosphorylating downstream proteins and finally initiates cell proliferation and differentiation signals to the nucleus. In this study, to investigate the biomolecular mechanism(s) of the film extract, we focused on three MAPK signaling pathways, including ERK, JNK, and p38, which play a major role in the development of nonhealing wound pathologies such as DFU. We used confocal microscopy imaging of immunofluorescence-labeled NDF over different time points (1, 4, 18, and 24 h) to reveal the abundance of ERK1/2, JNK1/2, and p38-MAPK phosphoproteins. We observed that film extract leads to higher levels of ERK1/2 phosphorylation compared to JNK1/2 and p38-MAPK (data not shown). So, we further investigated more precisely the effect of the film extract on the MAPK/ERK pathway, focusing on phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2), a transcription factor related to cell proliferation. The activation of the MAPK/ERK cascade can be stimulated *via* various factors, including (1) a variety of growth factors and cytokines; (2) Ca^{2+} influx; (3) activation of receptor tyrosine kinase Ras, protein kinase-mediated, G-protein-coupled receptor ligands; and (4) membrane depolarization.³⁹ We utilized the PD98059 inhibitor, a flavonoid compound considered as a potent inhibitor of MEK/ERK1/2 cascade by binding to MEK/ERK1/2, inducing an inactive MEK/ERK1/2 form and preventing the activation of the upstream activator (c-Raf).⁴⁰ For the effect of the MEK/

ERK1/2 inhibitor, these results confirmed the positive correlation between the level of MAPK (ERK1/2) activity and the cellular growth rate. They also indicated the direct effect of FBS and film extract on cell proliferation, mediated by the MAPK/ERK pathway. Regarding the quantitative flow cytometry data on p44/42 MAPK (ERK1/2) phosphorylation, the film extract can activate the phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) confirming immunofluorescence images. The confocal microscopy images allowed the detection and localization of intracellular MAPK/ERK activity. The green fluorescent staining indicated that the film extract stimulates the upregulation of phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2), promoting downstream protein synthesis involved in the wound healing process. The obtained results were concurrent to Maemura et al. who reported that the MAPK/ERK signaling pathway promotes cell proliferation and inhibits the apoptotic cell by influencing the activity of downstream cell cycle regulatory proteins, apoptosis-related proteins, and other effector molecules, such as G1/S-specific cyclin D1.⁴¹ We proposed that the film extract *via* its functional components, *Aloe vera* and fibroin, acts through the common MAPK/ERK signaling pathway. Nevertheless, according to the literature, it should regulate other signaling molecules and processes involved in dynamic signaling crosstalk, such as the NF- κ B signaling system.^{42,43}

Our previous clinical study indicated the wound healing efficacy of the blended fibroin/alginate gel extract film.¹³ The film could accelerate the healing rate of diabetic foot ulcers after application for 4 weeks, implying the sufficient delivery of the bioactive compounds from the film to the wound site. In this study, to regulate the amount of the bioactive compounds released from the film, the film-free supernatant obtained from incubating the sterilized film in serum-free DMEM for 24 h (film extract) was used to clarify the molecular mechanisms of the film on the wound healing enhancer.

5. CONCLUSIONS

In this study, the experiments confirm and support the beneficial effects of the blended fibroin/alginate gel extract film on cell proliferation and migration, VEGF secretion, and prevention of cell senescence. The blended fibroin/alginate gel extract film displays a biological behavior with interesting properties for delayed wound healing. Its mechanism of action is mainly linked to the activation of the MAPK/ERK pathway known to regulate various cellular activities, including proliferation. Therefore, the blended fibroin/alginate gel extract film can be considered as a promising therapeutic approach in the treatment of diabetic nonhealing ulcers.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Jarupa Viyoch – Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand; Phone: (+66)55 963730; Email: jarupav@nu.ac.th

Céline Viennet – UMR 1098 RIGHT INSERM EFS FC, DIMaCell Imaging Resource Center, University of Franche-Comté, Besançon 25000, France; Phone: (+33)3 83 08 22 10; Email: celine.viennet@univ-fcomte.fr

Authors

Preeyawass Phimmuan – Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand; UMR 1098 RIGHT INSERM EFS FC, DImaCell Imaging Resource Center, University of Franche-Comté, Besançon 25000, France; orcid.org/0000-0003-1884-2006

Zélie Dirand – UMR 1098 RIGHT INSERM EFS FC, DImaCell Imaging Resource Center, University of Franche-Comté, Besançon 25000, France

Marion Tissot – UMR 1098 RIGHT INSERM EFS FC, DImaCell Imaging Resource Center, University of Franche-Comté, Besançon 25000, France

Saran Worasakwutiphong – Division Plastic and Reconstructive Surgery, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

Anuphan Sittichokechaiwut – Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

François Grandmottet – Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

Complete contact information is available at:
<https://pubs.acs.org/10.1021/acsomega.2c07507>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Naresuan University and Université Bourgogne-Franche-Comté for the support of all facilities. This work was granted from Franco-Thai scholarship under a double doctoral degree program between Naresuan University and Université Bourgogne-Franche-Comté and Global and Frontier Research University (Grant number R2566C052), Naresuan University. The authors are also thankful to the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Office of the Higher Education Commission, and the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University for the support of all facilities.

REFERENCES

- (1) Abid, H. M. U.; Hanif, M.; Mahmood, K.; Aziz, M.; Abbas, G.; Latif, H. Wound-healing and antibacterial activity of the quercetin-4-formyl phenyl boronic acid complex against bacterial pathogens of diabetic foot ulcer. *ACS Omega* **2022**, *7*, 24415–24422.
- (2) Edmonds, M. Diabetic foot ulcers: practical treatment recommendations. *Drugs* **2006**, *66*, 913–929.
- (3) Lamers, M. L.; Almeida, M. E. S.; Vicente-Manzanares, M.; Horwitz, A. F.; Santos, M. F. High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. *PLoS One* **2011**, *6*, No. e22865.
- (4) Griffioen, A. W.; Molema, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 237–268.
- (5) Hehenberger, K.; Kratz, G.; Hansson, A.; Brismar, K. Fibroblasts derived from human chronic diabetic wounds have a decreased proliferation rate, which is recovered by the addition of heparin. *J. Dermatol. Sci.* **1998**, *16*, 144–151.
- (6) Yamakawa, S.; Hayashida, K. Advances in surgical applications of growth factors for wound healing. *Burns Trauma* **2019**, *7*, No. s41038-019-0148-1.

(7) Demidova-Rice, T. N.; Hamblin, M. R.; Herman, I. M. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv. Skin Wound Care* **2012**, *25*, 304–314.

(8) Ghilardi, S. J.; O'Reilly, B. M.; Sgro, A. E. Intracellular signaling dynamics and their role in coordinating tissue repair. *WIREs Syst. Biol. Med.* **2020**, *12*, No. e1479.

(9) Awazu, M.; Ishikura, K.; Hida, M.; Hoshiya, M. Mechanisms of mitogen-activated protein kinase activation in experimental diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1999**, *10*, 738–745.

(10) Haneda, M.; Araki, S.; Togawa, M.; Sugimoto, T.; Isono, M.; Kikkawa, R. Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetes* **1997**, *46*, 847–853.

(11) Dhivya, S.; Padma, V. V.; Santhini, E. Wound dressings - a review. *Biomedicine* **2015**, *5*, No. 22.

(12) Inpanya, P.; Faikrua, A.; Ounaron, A.; Sittichokechaiwut, A.; Viyoch, J. Effects of the blended fibroin/alginate gel film on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed. Mater.* **2012**, *7*, No. 035008.

(13) Worasakwutiphong, S.; Termwattanaphakdee, T.; Kamolhan, T.; Phimmuan, P.; Sittichokechaiwut, A.; Viyoch, J. Evaluation of the safety and healing potential of a fibroin-alginate gel film for the treatment of diabetic foot ulcers. *J. Wound Care* **2021**, *30*, 1020–1028.

(14) Liu, T.-l.; Miao, J.-c.; Sheng, W.-h.; Xie, Y.-f.; Huang, Q.; Shan, Y.-b.; Yang, J.-c. Cytocompatibility of regenerated silk fibroin film: a medical biomaterial applicable to wound healing. *J. Zhejiang Univ., Sci., B* **2010**, *11*, 10–16.

(15) Czekay, R. P.; Wilkins-Port, C. E.; Higgins, S. P.; Freytag, J.; Overstreet, J. M.; Klein, R. M.; Higgins, C. E.; Samarakoon, R.; Higgins, P. J. PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration. *Int. J. Cell Biol.* **2011**, *2011*, No. 562481.

(16) Chantarawatit, P.; Sangvanich, P.; Banlunara, W.; Soontornvipart, K.; Thunyakitpisal, P. Acemannan sponges stimulate alveolar bone, cementum and periodontal ligament regeneration in a canine class II furcation defect model. *J. Periodontol. Res.* **2014**, *49*, 164–178.

(17) Teplicki, E.; Ma, Q.; Castillo, D. E.; Zarei, M.; Hustad, A. P.; Chen, J.; Li, J. The Effects of *Aloe vera* on Wound Healing in Cell Proliferation, Migration, and Viability. *Wounds* **2018**, *30*, 263–268.

(18) Atiba, A.; Ueno, H.; Uzuka, Y. The effect of *Aloe vera* oral administration on cutaneous wound healing in type 2 diabetic rats. *J. Vet. Med. Sci.* **2011**, *73*, 583–589.

(19) Akaberi, M.; Sobhani, Z.; Javadi, B.; Sahebkar, A.; Emami, S. A. Therapeutic effects of *Aloe* spp. in traditional and modern medicine: A review. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *84*, 759–772.

(20) Phimmuan, P.; Worasakwutiphong, S.; Sittichokechaiwut, A.; Grandmottet, F.; Nakyai, W.; Luangpraditkun, K.; Viennet, C.; Viyoch, J. Physicochemical and biological activities of the gamma-irradiated blended fibroin/alginate gel film. *ScienceAsia* **2022**, *48*, No. 278.

(21) Nakyai, W.; Tissot, M.; Humbert, P.; Grandmottet, F.; Viyoch, J.; Viennet, C. Effects of Repeated UVA Irradiation on Human Skin Fibroblasts Embedded in 3D Tense Collagen Matrix. *Photochem. Photobiol.* **2018**, *94*, 715–724.

(22) An, J.; Yao, W.; Tang, W.; Jiang, J.; Shang, Y. Hormesis effect of methyl triclosan on cell proliferation and migration in human hepatocyte L02 cells. *ACS Omega* **2021**, *6*, 18904–18913.

(23) Mahali, S.; Raviprakash, N.; Raghavendra, P. B.; Manna, S. K. Advanced glycation end products (AGEs) induce apoptosis via a novel pathway: involvement of Ca²⁺ mediated by interleukin-8 protein. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 34903–34913.

(24) Park, Y. R.; Sultan, M. T.; Park, H. J.; Lee, J. M.; Ju, H. W.; Lee, O. J.; Lee, D. J.; Kaplan, D. L.; Park, C. H. NF- κ B signaling is key in the wound healing processes of silk fibroin. *Acta Biomater.* **2018**, *67*, 183–195.

(25) Yamada, H.; Igarashi, Y.; Takasu, Y.; Saito, H.; Tsubouchi, K. Identification of fibroin-derived peptides enhancing the proliferation of cultured human skin fibroblasts. *Biomaterials* **2004**, *25*, 467–472.

- (26) Yagi, A.; Egusa, T.; Arase, M.; Tanabe, M.; Tsuji, H. Isolation and characterization of the glycoprotein fraction with a proliferation-promoting activity on human and hamster cells in vitro from *Aloe vera* gel. *Planta Med.* **1997**, *63*, 18–21.
- (27) Xing, W.; Guo, W.; Zou, C.-H.; Fu, T.-T.; Li, X.-Y.; Zhu, M.; Qi, J. H.; Song, J.; Dong, C. H.; Li, Z.; Xiao, Y.; Yuan, P. S.; Huang, H.; Xu, X. Acemannan accelerates cell proliferation and skin wound healing through AKT/mTOR signaling pathway. *J. Dermatol. Sci.* **2015**, *79*, 101–109.
- (28) Wolf, G. Cell cycle regulation in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* **2000**, *58*, S59–S66.
- (29) Yuan, L.; Duan, X.; Zhang, R.; Zhang, Y.; Qu, M. Aloe polysaccharide protects skin cells from UVB irradiation through Keap1/Nrf2/ARE signal pathway. *J. Dermatol. Treat.* **2020**, *31*, 300–308.
- (30) Moriyama, M.; Moriyama, H.; Uda, J.; Kubo, H.; Nakajima, Y.; Goto, A.; Akaki, J.; Yoshida, I.; Matsuoka, N.; Hayakawa, T. Beneficial Effects of the Genus *Aloe* on Wound Healing, Cell Proliferation, and Differentiation of Epidermal Keratinocytes. *PLoS One* **2016**, *11*, No. e0164799.
- (31) Mijit, M.; Caracciolo, V.; Melillo, A.; Amicarelli, F.; Giordano, A. Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules* **2020**, *10*, No. 420.
- (32) Berlanga-Acosta, J. A.; Guillén-Nieto, G. E.; Rodríguez-Rodríguez, N.; Mendoza-Mari, Y.; Bringas-Vega, M. L.; Berlanga-Saez, J. O.; García Del Barco, H. D.; Martínez-Jimenez, I.; Hernández-Gutierrez, S.; Valdés-Sosa, P. A. Cellular Senescence as the Pathogenic Hub of Diabetes-Related Wound Chronicity. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, No. 573032.
- (33) Ma, X. Y.; Cui, D.; Wang, Z.; Liu, B.; Yu, H. L.; Yuan, H.; Xiang, L. B.; Zhou, D. P. Silk Fibroin/Hydroxyapatite Coating Improved Osseointegration of Porous Titanium Implants under Diabetic Conditions via Activation of the PI3K/Akt Signaling Pathway. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2022**, *8*, 2908–2919.
- (34) Hu, Y.; Xu, J.; Hu, Q. Evaluation of Antioxidant Potential of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) Extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7788–7791.
- (35) Hoeben, A.; Landuyt, B.; Highley, M. S.; Wildiers, H.; Van-Oosterom, A. T.; De Bruijn, E. A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 549–580.
- (36) Firdaus, I.; Arfian, N.; Wahyuningsih, M. S. H.; Agustini, D. *Aloe vera* stimulate cell proliferation, cell migration, expression of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), and c-Jun N-terminal kinase-1 (JNK-1) on fibroblast of diabetic rat models. *J. Med. Sci.* **2019**, *51*, 114–127.
- (37) Jettanacheawchankit, S.; Sasithanasate, S.; Sangvanich, P.; Banlunara, W.; Thunyakitpisal, P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. *J. Pharmacol. Sci.* **2009**, *109*, 525–531.
- (38) Guo, Y. J.; Pan, W. W.; Liu, S. B.; Shen, Z. F.; Xu, Y.; Hu, L. L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp. Ther. Med.* **2020**, *19*, 1997–2007.
- (39) Avruch, J.; Khokhlatchev, A.; Kyriakis, J. M.; Luo, Z.; Tzivion, G.; Vavvas, D.; Zhang, X. F. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog. Horm. Res.* **2001**, *56*, 127–155.
- (40) Di Paola, R.; Galuppo, M.; Mazzon, E.; Paterniti, I.; Bramanti, P.; Cuzzocrea, S. PD98059, a specific MAP kinase inhibitor, attenuates multiple organ dysfunction syndrome/failure (MODS) induced by zymosan in mice. *Pharmacol. Res.* **2010**, *61*, 175–187.
- (41) Maemura, K.; Shiraishi, N.; Sakagami, K.; Kawakami, K.; Inoue, T.; Murano, M.; Watanabe, M.; Otsuki, Y. Proliferative effects of gamma-aminobutyric acid on the gastric cancer cell line are associated with extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2009**, *24*, 688–696.
- (42) Liu, Y.; Fan, J.; Lv, M.; She, K.; Sun, J.; Lu, Q.; Han, C.; Ding, S.; Zhao, S.; Wang, G.; Zhang, Y.; Zang, G. Photocrosslinking silver nanoparticles-aloe vera-silk fibroin composite hydrogel for treatment of full-thickness cutaneous wounds. *Regen. Biomater.* **2021**, *8*, No. rbab048.
- (43) Ng, M. Y.; Lin, T.; Chao, S.-C.; Chu, P.-M.; Yu, C.-C. Potential Therapeutic Applications of Natural Compounds in Diabetes-Associated Periodontitis. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, No. 3614.

PARTIE VII

-

Références bibliographiques

1. Adler, M. *et al.* Principles of Cell Circuits for Tissue Repair and Fibrosis. *iScience* **23**, 100841 (2020).
2. Wynn, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* **214**, 199–210 (2008).
3. Mack, M. Inflammation and fibrosis. *Matrix Biol* **68–69**, 106–121 (2018).
4. Henderson, N. C., Rieder, F. & Wynn, T. A. FIBROSIS: FROM MECHANISMS TO MEDICINES. *Nature* **587**, 555–566 (2020).
5. Diegelmann, R. F. & Evans, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* **9**, 283–289 (2004).
6. Cohen, A. J., Nikbakht, N. & Uitto, J. Keloid Disorder: Genetic Basis, Gene Expression Profiles, and Immunological Modulation of the Fibrotic Processes in the Skin. *Cold Spring Harb Perspect Biol* a041245 (2022) doi:10.1101/cshperspect.a041245.
7. Wernig, G. *et al.* Unifying mechanism for different fibrotic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 4757–4762 (2017).
8. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1908. *NobelPrize.org* <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/summary/>.
9. Locati, M., Curtale, G. & Mantovani, A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu Rev Pathol* **15**, 123–147 (2020).
10. Yona, S. *et al.* Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* **38**, 79–91 (2013).
11. Hashimoto, D. *et al.* Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* **38**, 792–804 (2013).
12. Epelman, S., Lavine, K. J. & Randolph, G. J. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* **41**, 21–35 (2014).
13. Unanue, E. R. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu Rev Immunol* **2**, 395–428 (1984).
14. Bordon, Y. Kupffer cells: finding their niche. *Nat Rev Immunol* **19**, 660–661 (2019).
15. Merad, M., Ginhoux, F. & Collin, M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol* **8**, 935–947 (2008).
16. Joshi, N., Walter, J. M. & Misharin, A. V. Alveolar Macrophages. *Cell Immunol* **330**, 86–90 (2018).

17. Butovsky, O. & Weiner, H. L. Microglial signatures and their role in health and disease. *Nat Rev Neurosci* **19**, 622–635 (2018).
18. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* **6**, 13 (2014).
19. Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* **176**, 287–292 (1992).
20. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25**, 677–686 (2004).
21. Bhattacharya, M. & Ramachandran, P. Immunology of human fibrosis. *Nat Immunol* (2023) doi:10.1038/s41590-023-01551-9.
22. Zhou, J. *et al.* Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. *Front Oncol* **10**, 188 (2020).
23. Baxter, E. W. *et al.* Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN γ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *J Immunol Methods* **478**, 112721 (2020).
24. Pemmari, A. *et al.* MKP-1 promotes anti-inflammatory M(IL-4/IL-13) macrophage phenotype and mediates the anti-inflammatory effects of glucocorticoids. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **124**, 404–415 (2019).
25. Yu, B. *et al.* Resveratrol improves CCL4-induced liver fibrosis in mouse by upregulating endogenous IL-10 to reprogramme macrophages phenotype from M(LPS) to M(IL-4). *Biomed Pharmacother* **117**, 109110 (2019).
26. Sander, J. *et al.* Cellular Differentiation of Human Monocytes Is Regulated by Time-Dependent Interleukin-4 Signaling and the Transcriptional Regulator NCOR2. *Immunity* **47**, 1051-1066.e12 (2017).
27. Hourani, T. *et al.* Label-free macrophage phenotype classification using machine learning methods. *Sci Rep* **13**, 5202 (2023).
28. Nakai, K. Multiple roles of macrophage in skin. *J Dermatol Sci* **104**, 2–10 (2021).
29. Murray, P. J. *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
30. Hesketh, M., Sahin, K. B., West, Z. E. & Murray, R. Z. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *Int J Mol Sci* **18**, E1545 (2017).

31. Futosi, K., Fodor, S. & Mócsai, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol* **17**, 638–650 (2013).
32. Savill, J. & Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**, 784–788 (2000).
33. Sorokin, L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol* **10**, 712–723 (2010).
34. Wilkinson, H. N. & Hardman, M. J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology* **10**, 200223 (2020).
35. McKeown, S., Richter, A. G., O’Kane, C., McAuley, D. F. & Thickett, D. R. MMP expression and abnormal lung permeability are important determinants of outcome in IPF. *Eur Respir J* **33**, 77–84 (2009).
36. Willenborg, S. *et al.* CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood* **120**, 613–625 (2012).
37. Shen, B., Liu, X., Fan, Y. & Qiu, J. Macrophages regulate renal fibrosis through modulating TGF β superfamily signaling. *Inflammation* **37**, 2076–2084 (2014).
38. Henderson, N. C. *et al.* Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *Am J Pathol* **172**, 288–298 (2008).
39. Kim, M.-G. *et al.* The Role of M2 Macrophages in the Progression of Chronic Kidney Disease following Acute Kidney Injury. *PLoS One* **10**, e0143961 (2015).
40. Hu, Z., Zhan, J., Pei, G. & Zeng, R. Depletion of macrophages with clodronate liposomes partially attenuates renal fibrosis on AKI-CKD transition. *Ren Fail* **45**, 2149412 (2023).
41. Gibbons, M. A. *et al.* Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **184**, 569–581 (2011).
42. Wan, X., Xiao, Y., Tian, X., Lu, Y. & Chu, H. Selective depletion of CD11b-positive monocytes/macrophages potently suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Int Immunopharmacol* **114**, 109570 (2023).
43. Tian, X. *et al.* Conditional depletion of macrophages ameliorates cholestatic liver injury and fibrosis via lncRNA-H19. *Cell Death Dis* **12**, 1–13 (2021).
44. Zhu, Z., Ding, J., Ma, Z., Iwashina, T. & Tredget, E. E. Systemic depletion of macrophages in the subacute phase of wound healing reduces hypertrophic scar formation. *Wound Repair Regen* **24**, 644–656 (2016).

45. Li, H., Nagai, T., Hasui, K. & Matsuyama, T. Depletion of folate receptor β -expressing macrophages alleviates bleomycin-induced experimental skin fibrosis. *Mod Rheumatol* **24**, 816–822 (2014).
46. Ding, J. *et al.* Macrophages are necessary for skin regeneration during tissue expansion. *Journal of Translational Medicine* **17**, 36 (2019).
47. Lucas, T. *et al.* Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol* **184**, 3964–3977 (2010).
48. Duffield, J. S. *et al.* Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* **115**, 56–65 (2005).
49. Meng, X.-M., Mak, T. S.-K. & Lan, H.-Y. Macrophages in Renal Fibrosis. *Adv Exp Med Biol* **1165**, 285–303 (2019).
50. Nakagawa, M., Karim, M. R., Izawa, T., Kuwamura, M. & Yamate, J. Immunophenotypical Characterization of M1/M2 Macrophages and Lymphocytes in Cisplatin-Induced Rat Progressive Renal Fibrosis. *Cells* **10**, 257 (2021).
51. Hou, J. *et al.* M2 macrophages promote myofibroblast differentiation of LR-MSCs and are associated with pulmonary fibrogenesis. *Cell Commun Signal* **16**, 89 (2018).
52. Uceru, A. C. *et al.* Fra-2-expressing macrophages promote lung fibrosis in mice. *J Clin Invest* **129**, 3293–3309 (2019).
53. Zhao, J. *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptor-2 facilitates pulmonary fibrosis through potentiating IL-13 pathway in macrophages. *PLoS One* **13**, e0197604 (2018).
54. Wang, Y. *et al.* MBD2 serves as a viable target against pulmonary fibrosis by inhibiting macrophage M2 program. *Sci Adv* **7**, eabb6075 (2021).
55. Hu, G. & Christman, J. W. Editorial: Alveolar Macrophages in Lung Inflammation and Resolution. *Front Immunol* **10**, 2275 (2019).
56. Braga, T. T., Agudelo, J. S. H. & Camara, N. O. S. Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. *Frontiers in Immunology* **6**, (2015).
57. Ramachandran, P. *et al.* Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E3186-3195 (2012).
58. Jung, M. *et al.* IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic Res Cardiol* **112**, 33 (2017).

59. Shintani, Y. *et al.* IL-4 as a Repurposed Biological Drug for Myocardial Infarction through Augmentation of Reparative Cardiac Macrophages: Proof-of-Concept Data in Mice. *Sci Rep* **7**, 6877 (2017).
60. McLaughlin, S. *et al.* Injectable human recombinant collagen matrices limit adverse remodeling and improve cardiac function after myocardial infarction. *Nat Commun* **10**, 4866 (2019).
61. Hu, Y. *et al.* Class A scavenger receptor attenuates myocardial infarction-induced cardiomyocyte necrosis through suppressing M1 macrophage subset polarization. *Basic Res Cardiol* **106**, 1311–1328 (2011).
62. Tian, S. *et al.* HMGB1 exacerbates renal tubulointerstitial fibrosis through facilitating M1 macrophage phenotype at the early stage of obstructive injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **308**, F69-75 (2015).
63. Lis-López, L., Bauset, C., Seco-Cervera, M. & Cosín-Roger, J. Is the Macrophage Phenotype Determinant for Fibrosis Development? *Biomedicines* **9**, 1747 (2021).
64. Setten, E. *et al.* Understanding fibrosis pathogenesis via modeling macrophage-fibroblast interplay in immune-metabolic context. *Nat Commun* **13**, 6499 (2022).
65. Wynn, T. A. & Barron, L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis* **30**, 245–257 (2010).
66. Frangogiannis, N. G. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *J Exp Med* **217**, (2020).
67. Jagadeesan, J. & Bayat, A. Transforming growth factor beta (TGF β) and keloid disease. *International Journal of Surgery* **5**, 278–285 (2007).
68. Liu, W. *et al.* Blocking transforming growth factor-beta receptor signaling down-regulates transforming growth factor-beta1 autoproduction in keloid fibroblasts. *Chin J Traumatol* **5**, 77–81 (2002).
69. Stachowski, T. R., Snell, M. E. & Snell, E. H. Structural insights into conformational switching in latency-associated peptide between transforming growth factor β -1 bound and unbound states. *IUCrJ* **7**, 238–252 (2020).
70. Biernacka, A., Dobaczewski, M. & Frangogiannis, N. G. TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors* **29**, 196–202 (2011).
71. Györfi, A. H., Matei, A.-E. & Distler, J. H. W. Targeting TGF- β signaling for the treatment of fibrosis. *Matrix Biol* **68–69**, 8–27 (2018).

72. Friedman, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* **88**, 125–172 (2008).
73. Shaw, R. J., Benedict, S. H., Clark, R. A. & King, T. E. Pathogenesis of pulmonary fibrosis in interstitial lung disease. Alveolar macrophage PDGF(B) gene activation and up-regulation by interferon gamma. *Am Rev Respir Dis* **143**, 167–173 (1991).
74. Martinet, Y., Rom, W. N., Grotendorst, G. R., Martin, G. R. & Crystal, R. G. Exaggerated spontaneous release of platelet-derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **317**, 202–209 (1987).
75. Khalil, N., Berezney, O., Sporn, M. & Greenberg, A. H. Macrophage production of transforming growth factor beta and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. *J Exp Med* **170**, 727–737 (1989).
76. McCormick, L. L., Zhang, Y., Tootell, E. & Gilliam, A. C. Anti-TGF- β Treatment Prevents Skin and Lung Fibrosis in Murine Sclerodermatous Graft-Versus-Host Disease: A Model for Human Scleroderma¹. *The Journal of Immunology* **163**, 5693–5699 (1999).
77. Xu, B.-H. *et al.* Deletion of Smad3 prevents renal fibrosis and inflammation in type 2 diabetic nephropathy. *Metabolism* **103**, 154013 (2020).
78. You, Y.-K. *et al.* Deletion of Smad3 protects against C-reactive protein-induced renal fibrosis and inflammation in obstructive nephropathy. *Int J Biol Sci* **17**, 3911–3922 (2021).
79. Loeffler, I. *et al.* FSP1-specific SMAD2 knockout in renal tubular, endothelial, and interstitial cells reduces fibrosis and epithelial-to-mesenchymal transition in murine STZ-induced diabetic nephropathy. *Cell Tissue Res* **372**, 115–133 (2018).
80. Meng, X.-M. *et al.* Disruption of Smad4 impairs TGF- β /Smad3 and Smad7 transcriptional regulation during renal inflammation and fibrosis in vivo and in vitro. *Kidney International* **81**, 266–279 (2012).
81. Wei, Y. *et al.* Fibroblast-specific inhibition of TGF- β 1 signaling attenuates lung and tumor fibrosis. *J Clin Invest* **127**, 3675–3688 (2017).
82. Khalil, H. *et al.* Fibroblast-specific TGF- β -Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis. *J Clin Invest* **127**, 3770–3783 (2017).
83. Chung, S. *et al.* TGF- β promotes fibrosis after severe acute kidney injury by enhancing renal macrophage infiltration. *JCI Insight* **3**, e123563, 123563 (2018).
84. Zhang, F. *et al.* TGF- β induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget* **7**, 52294–52306 (2016).

85. Juhl, P. *et al.* Dermal fibroblasts have different extracellular matrix profiles induced by TGF- β , PDGF and IL-6 in a model for skin fibrosis. *Scientific Reports* **10**, 17300 (2020).
86. Takamura, N., Renaud, L., da Silveira, W. A. & Feghali-Bostwick, C. PDGF Promotes Dermal Fibroblast Activation via a Novel Mechanism Mediated by Signaling Through MCHR1. *Front Immunol* **12**, 745308 (2021).
87. Bonner, J. C., Badgett, A., Osornio-Vargas, A. R., Hoffman, M. & Brody, A. R. PDGF-stimulated fibroblast proliferation is enhanced synergistically by receptor-recognized alpha 2-macroglobulin. *J Cell Physiol* **145**, 1–8 (1990).
88. Aran, D. *et al.* Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. *Nat Immunol* **20**, 163–172 (2019).
89. Iwayama, T. *et al.* PDGFR α signaling drives adipose tissue fibrosis by targeting progenitor cell plasticity. *Genes Dev* **29**, 1106–1119 (2015).
90. Trojanowska, M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* **47 Suppl 5**, v2-4 (2008).
91. Bonner, J. C. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**, 255–273 (2004).
92. Agostini, C. *et al.* Cxcr3 and its ligand CXCL10 are expressed by inflammatory cells infiltrating lung allografts and mediate chemotaxis of T cells at sites of rejection. *Am J Pathol* **158**, 1703–1711 (2001).
93. Xu, J. *et al.* Role of the SDF-1/CXCR4 axis in the pathogenesis of lung injury and fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **37**, 291–299 (2007).
94. Cai, X. *et al.* Inhibition of angiogenesis, fibrosis and thrombosis by tetramethylpyrazine: mechanisms contributing to the SDF-1/CXCR4 axis. *PLoS One* **9**, e88176 (2014).
95. Shao, S., Cai, W., Sheng, J. & Yin, L. Role of SDF-1 and Wnt signaling pathway in the myocardial fibrosis of hypertensive rats. *Am J Transl Res* **7**, 1345–1356 (2015).
96. Wu, X. *et al.* CXCL12/CXCR4: An amazing challenge and opportunity in the fight against fibrosis. *Ageing Res Rev* **83**, 101809 (2023).
97. Yates, C. C. *et al.* Lack of CXC chemokine receptor 3 signaling leads to hypertrophic and hypercellular scarring. *Am J Pathol* **176**, 1743–1755 (2010).
98. Yates, C. C., Whaley, D. & Wells, A. Transplanted fibroblasts prevents dysfunctional repair in a murine CXCR3-deficient scarring model. *Cell Transplant* **21**, 919–931 (2012).

99. Mühlstedt, S. *et al.* Cardiomyocyte-derived CXCL12 is not involved in cardiogenesis but plays a crucial role in myocardial infarction. *J Mol Med (Berl)* **94**, 1005–1014 (2016).
100. Liu, C.-H. *et al.* Dual-Functional Nanoparticles Targeting CXCR4 and Delivering Antiangiogenic siRNA Ameliorate Liver Fibrosis. *Mol Pharm* **13**, 2253–2262 (2016).
101. Mouchemore, K. A. & Pixley, F. J. CSF-1 signaling in macrophages: pleiotrophy through phosphotyrosine-based signaling pathways. *Crit Rev Clin Lab Sci* **49**, 49–61 (2012).
102. Davies, L. C. *et al.* Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nat Commun* **4**, 1886 (2013).
103. Joshi, N. *et al.* A spatially restricted fibrotic niche in pulmonary fibrosis is sustained by M-CSF/M-CSFR signalling in monocyte-derived alveolar macrophages. *Eur Respir J* **55**, 1900646 (2020).
104. Wiktor-Jedrzejczak, W. *et al.* Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4828–4832 (1990).
105. Bellomo, A. *et al.* Reticular Fibroblasts Expressing the Transcription Factor WT1 Define a Stromal Niche that Maintains and Replenishes Splenic Red Pulp Macrophages. *Immunity* **53**, 127-142.e7 (2020).
106. Meziani, L. *et al.* CSF1R inhibition prevents radiation pulmonary fibrosis by depletion of interstitial macrophages. *Eur Respir J* **51**, 1702120 (2018).
107. Deng, X. *et al.* CSF-1R inhibition attenuates ischemia-induced renal injury and fibrosis by reducing Ly6C⁺ M2-like macrophage infiltration. *Int Immunopharmacol* **88**, 106854 (2020).
108. Singh, S., Anshita, D. & Ravichandiran, V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int Immunopharmacol* **101**, 107598 (2021).
109. Boniakowski, A. E. *et al.* Murine macrophage chemokine receptor CCR2 plays a crucial role in macrophage recruitment and regulated inflammation in wound healing. *Eur J Immunol* **48**, 1445–1455 (2018).
110. Ferreira, A. M. *et al.* Diminished induction of skin fibrosis in mice with MCP-1 deficiency. *J Invest Dermatol* **126**, 1900–1908 (2006).
111. Li, Y. *et al.* The Role of IL-6 in Fibrotic Diseases: Molecular and Cellular Mechanisms. *Int J Biol Sci* **18**, 5405–5414 (2022).

112. Ayaub, E. A. *et al.* Overexpression of OSM and IL-6 impacts the polarization of pro-fibrotic macrophages and the development of bleomycin-induced lung fibrosis. *Sci Rep* **7**, 13281 (2017).
113. Denton, C. P. *et al.* Therapeutic interleukin-6 blockade reverses transforming growth factor-beta pathway activation in dermal fibroblasts: insights from the faSScinate clinical trial in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* **77**, 1362–1371 (2018).
114. Kelley, S. M. & Ravichandran, K. S. Putting the brakes on phagocytosis: “don’t-eat-me” signaling in physiology and disease. *EMBO reports* **22**, e52564 (2021).
115. Lerbs, T. *et al.* CD47 prevents the elimination of diseased fibroblasts in scleroderma. *JCI Insight* **5**, e140458.
116. Moretti, L., Stalfort, J., Barker, T. H. & Abeyayehu, D. The interplay of fibroblasts, the extracellular matrix, and inflammation in scar formation. *Journal of Biological Chemistry* **298**, 101530 (2022).
117. Kaji, K., Takeshita, S., Miyake, K., Takai, T. & Kudo, A. Functional association of CD9 with the Fc gamma receptors in macrophages. *J Immunol* **166**, 3256–3265 (2001).
118. Morse, C. *et al.* Proliferating SPP1/MERTK-expressing macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* **54**, 1802441 (2019).
119. Zhou, L. *et al.* Glycoprotein non-metastatic melanoma protein b (Gpnmb) is highly expressed in macrophages of acute injured kidney and promotes M2 macrophages polarization. *Cell Immunol* **316**, 53–60 (2017).
120. Palisoc, P. J. *et al.* Functional Characterization of Glycoprotein Nonmetastatic Melanoma Protein B in Scleroderma Fibrosis. *Front Immunol* **13**, 814533 (2022).
121. Song, J. *et al.* The Role of FABP5 in Radiation-Induced Human Skin Fibrosis. *Radiat Res* **189**, 177–186 (2018).
122. Lei, Q., Yu, Z., Li, H., Cheng, J. & Wang, Y. Fatty acid-binding protein 5 aggravates pulmonary artery fibrosis in pulmonary hypertension secondary to left heart disease via activating wnt/ β -catenin pathway. *J Adv Res* **40**, 197–206 (2022).
123. Fabre, T. *et al.* Identification of a broadly fibrogenic macrophage subset induced by type 3 inflammation. *Sci Immunol* **8**, eadd8945 (2023).
124. Ramachandran, P. *et al.* Resolving the fibrotic niche of human liver cirrhosis at single-cell level. *Nature* **575**, 512–518 (2019).

125. Hendriks, T. *et al.* Soluble TREM2 levels reflect the recruitment and expansion of TREM2+ macrophages that localize to fibrotic areas and limit NASH. *J Hepatol* **77**, 1373–1385 (2022).
126. Buechler, M. B., Fu, W. & Turley, S. J. Fibroblast-macrophage reciprocal interactions in health, fibrosis, and cancer. *Immunity* **54**, 903–915 (2021).
127. Breasted, J. H. *Case forty-five, Bulging Tumors on the Breast*. vol. Edwin Smith Surgical Papyrus, Vol 1.
128. Retz, N. *Des maladies de la peau et de celles de l'esprit (telles que les vapeurs, la mélancolie, la manie etc.), qui procèdent des affections du foie. Leur origine, la description de celles qui sont le moins connues, les traitements qui leur conviennent. Troisième édition, augmentée d'un grand nombre d'observations.* (1790).
129. Alibert, J.-L. *Précis théorique et pratique sur les maladies de la peau, Tome premier.* (1810).
130. Petit, A. Histoire de la chéloïde. *Revue Francophone de Cicatrisation* **2**, 10–11 (2018).
131. Keloid Research Foundation. *Keloid Research Foundation* <https://keloidresearchfoundation.org/>.
132. Jumper, N., Paus, R. & Bayat, A. Functional histopathology of keloid disease. *Histol Histopathol* **30**, 1033–1057 (2015).
133. Sitaniya, S. *et al.* Quality-of-life of people with keloids and its correlation with clinical severity and demographic profiles. *Wound Repair Regen* **30**, 409–416 (2022).
134. HAWASH, A. A., INGRASCI, G., NOURI, K. & YOSIPOVITCH, G. Pruritus in Keloid Scars: Mechanisms and Treatments. *Acta Derm Venereol* **101**, 578 (2021).
135. Limandjaja, G. C. *et al.* Increased epidermal thickness and abnormal epidermal differentiation in keloid scars. *Br J Dermatol* **176**, 116–126 (2017).
136. Hellström, M., Hellström, S., Engström-Laurent, A. & Bertheim, U. The structure of the basement membrane zone differs between keloids, hypertrophic scars and normal skin: a possible background to an impaired function. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **67**, 1564–1572 (2014).
137. Kurokawa, N., Ueda, K. & Tsuji, M. Study of microvascular structure in keloid and hypertrophic scars: density of microvessels and the efficacy of three-dimensional vascular imaging. *J Plast Surg Hand Surg* **44**, 272–277 (2010).

138. Barallobre-Barreiro, J. *et al.* Cartilage-like composition of keloid scar extracellular matrix suggests fibroblast mis-differentiation in disease. *Matrix Biol Plus* **4**, 100016 (2019).
139. Friedman, D. W. *et al.* Regulation of collagen gene expression in keloids and hypertrophic scars. *J Surg Res* **55**, 214–222 (1993).
140. Verhaegen, P. D. H. M. *et al.* Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis. *Wound Repair Regen* **17**, 649–656 (2009).
141. Amadeu, T. P., Braune, A. S., Porto, L. C., Desmoulière, A. & Costa, A. M. A. Fibrillin-1 and elastin are differentially expressed in hypertrophic scars and keloids. *Wound Repair Regen* **12**, 169–174 (2004).
142. Babu, M., Diegelmann, R. & Oliver, N. Fibronectin is overproduced by keloid fibroblasts during abnormal wound healing. *Mol Cell Biol* **9**, 1642–1650 (1989).
143. Kischer, C. W. & Hendrix, M. J. Fibronectin (FN) in hypertrophic scars and keloids. *Cell Tissue Res* **231**, 29–37 (1983).
144. Zhou, H.-M. *et al.* Spatiotemporal expression of periostin during skin development and incisional wound healing: lessons for human fibrotic scar formation. *J Cell Commun Signal* **4**, 99–107 (2010).
145. Jiao, H., Zhang, T., Fan, J. & Xiao, R. The Superficial Dermis May Initiate Keloid Formation: Histological Analysis of the Keloid Dermis at Different Depths. *Front Physiol* **8**, 885 (2017).
146. Meenakshi, J. *et al.* Low decorin expression along with inherent activation of ERK1,2 in ear lobe keloids. *Burns* **35**, 519–526 (2009).
147. Shin, J. U. *et al.* TSLP Is a Potential Initiator of Collagen Synthesis and an Activator of CXCR4/SDF-1 Axis in Keloid Pathogenesis. *J Invest Dermatol* **136**, 507–515 (2016).
148. Lee, C.-H., Hong, C.-H., Chen, Y.-T., Chen, Y.-C. & Shen, M.-R. TGF-beta1 increases cell rigidity by enhancing expression of smooth muscle actin: keloid-derived fibroblasts as a model for cellular mechanics. *J Dermatol Sci* **67**, 173–180 (2012).
149. Hahn, J. M., McFarland, K. L., Combs, K. A., Powell, H. M. & Supp, D. M. Myofibroblasts Are Not Characteristic Features of Keloid Lesions. *Plast Reconstr Surg Glob Open* **10**, e4680 (2022).
150. Luo, L. *et al.* Adiponectin Is Involved in Connective Tissue Growth Factor-Induced Proliferation, Migration and Overproduction of the Extracellular Matrix in Keloid Fibroblasts. *Int J Mol Sci* **18**, 1044 (2017).

151. Jiao, H. *et al.* Analysis of Characteristics Similar to Autoimmune Disease in Keloid Patients. *Aesthetic Plast Surg* **39**, 818–825 (2015).
152. Shaker, S. A., Ayuob, N. N. & Hajrah, N. H. Cell talk: a phenomenon observed in the keloid scar by immunohistochemical study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **19**, 153–159 (2011).
153. Bella, H. *et al.* A clinical characterization of familial keloid disease in unique African tribes reveals distinct keloid phenotypes. *Plast Reconstr Surg* **127**, 689–702 (2011).
154. Huang, C. *et al.* Keloid progression: a stiffness gap hypothesis. *Int Wound J* **14**, 764–771 (2017).
155. Huang, C. & Ogawa, R. Keloidal pathophysiology: Current notions. *Scars Burn Heal* **7**, 2059513120980320 (2021).
156. Conway, H., Gillette, R., Smith, J. W. & Findley, A. Differential diagnosis of keloids and hypertrophic scars by tissue culture technique with notes on therapy of keloids by surgical excision and decadron. *Plast Reconstr Surg Transplant Bull* **25**, 117–132 (1960).
157. Seifert, O. *et al.* Identification of unique gene expression patterns within different lesional sites of keloids. *Wound Repair and Regeneration* **16**, 254–265 (2008).
158. Lu, F., Gao, J., Ogawa, R., Hyakusoku, H. & Ou, C. Biological differences between fibroblasts derived from peripheral and central areas of keloid tissues. *Plast Reconstr Surg* **120**, 625–630 (2007).
159. Varmeh, S. *et al.* Cellular Senescence as a Possible Mechanism for Halting Progression of Keloid Lesions. *Genes Cancer* **2**, 1061–1066 (2011).
160. Akasaka, Y. *et al.* Detection of apoptosis in keloids and a comparative study on apoptosis between keloids, hypertrophic scars, normal healed flat scars, and dermatofibroma. *Wound Repair Regen* **9**, 501–506 (2001).
161. Le, A. D. *et al.* Elevated vascular endothelial growth factor in keloids: relevance to tissue fibrosis. *Cells Tissues Organs* **176**, 87–94 (2004).
162. Appleton, I., Brown, N. J. & Willoughby, D. A. Apoptosis, necrosis, and proliferation: possible implications in the etiology of keloids. *Am J Pathol* **149**, 1441–1447 (1996).
163. Suttho, D. *et al.* 3D modeling of keloid scars in vitro by cell and tissue engineering. *Arch Dermatol Res* **309**, 55–62 (2017).
164. Touchi, R., Ueda, K., Kurokawa, N. & Tsuji, M. Central regions of keloids are severely ischaemic. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **69**, e35-41 (2016).

165. Wolfram, D., Tzankov, A., Püzl, P. & Piza-Katzer, H. Hypertrophic scars and keloids--a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management. *Dermatol Surg* **35**, 171–181 (2009).
166. Limandjaja, G. C., Niessen, F. B., Scheper, R. J. & Gibbs, S. The Keloid Disorder: Heterogeneity, Histopathology, Mechanisms and Models. *Front Cell Dev Biol* **8**, (2020).
167. Comorbidities of Keloid and Hypertrophic Scars Among Participants in UK Biobank - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36598763/>.
168. Davis, S. A., Feldman, S. R. & McMichael, A. J. Management of keloids in the United States, 1990-2009: an analysis of the National Ambulatory Medical Care Survey. *Dermatol Surg* **39**, 988–994 (2013).
169. Huang, C., Wu, Z., Du, Y. & Ogawa, R. The Epidemiology of Keloids. in *Textbook on Scar Management: State of the Art Management and Emerging Technologies* (eds. Téot, L., Mustoe, T. A., Middelkoop, E. & Gauglitz, G. G.) (Springer, 2020).
170. Rockwell, W. B., Cohen, I. K. & Ehrlich, H. P. Keloids and hypertrophic scars: a comprehensive review. *Plast Reconstr Surg* **84**, 827–837 (1989).
171. Sun, L.-M., Wang, K.-H. & Lee, Y.-C. G. Keloid incidence in Asian people and its comorbidity with other fibrosis-related diseases: a nationwide population-based study. *Arch Dermatol Res* **306**, 803–808 (2014).
172. Kiprono, S. K. *et al.* Epidemiology of keloids in normally pigmented Africans and African people with albinism: population-based cross-sectional survey. *Br J Dermatol* **173**, 852–854 (2015).
173. Hirata, M. *et al.* Cross-sectional analysis of BioBank Japan clinical data: A large cohort of 200,000 patients with 47 common diseases. *J Epidemiol* **27**, S9–S21 (2017).
174. Bloom, D. Heredity of keloids; review of the literature and report of a family with multiple keloids in five generations. *N Y State J Med* **56**, 511–519 (1956).
175. Omo-Dare, P. Genetic studies on keloid. *J Natl Med Assoc* **67**, 428–432 (1975).
176. Goeminne, L. A new probably X-linked inherited syndrome: congenital muscular torticollis, multiple keloids cryptorchidism and renal dysplasia. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* **17**, 439–467 (1968).
177. Marneros, A. G., Norris, J. E., Olsen, B. R. & Reichenberger, E. Clinical genetics of familial keloids. *Arch Dermatol* **137**, 1429–1434 (2001).

178. Huang, J. *et al.* Combined analyses of RNA-sequence and Hi-C along with GWAS loci—A novel approach to dissect keloid disorder genetic mechanism. *PLoS Genet* **18**, e1010168 (2022).
179. Bayat, A., Bock, O., Mrowietz, U., Ollier, W. E. R. & Ferguson, M. W. J. Genetic susceptibility to keloid disease: transforming growth factor beta receptor gene polymorphisms are not associated with keloid disease. *Exp Dermatol* **13**, 120–124 (2004).
180. He, Y. *et al.* From genetics to epigenetics: new insights into keloid scarring. *Cell Prolif* **50**, e12326 (2017).
181. Liu, S. *et al.* Keloid: Genetic susceptibility and contributions of genetics and epigenetics to its pathogenesis. *Exp Dermatol* **31**, 1665–1675 (2022).
182. Glass, D. A. Current Understanding of the Genetic Causes of Keloid Formation. *J Investig Dermatol Symp Proc* **18**, S50–S53 (2017).
183. Nakashima, M. *et al.* A genome-wide association study identifies four susceptibility loci for keloid in the Japanese population. *Nat Genet* **42**, 768–771 (2010).
184. Zhu, F. *et al.* Association study confirmed susceptibility loci with keloid in the Chinese Han population. *PLoS One* **8**, e62377 (2013).
185. Yan, X., Gao, J., Chen, Y., Song, M. & Liu, X. [Preliminary linkage analysis and mapping of keloid susceptibility locus in a Chinese pedigree]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* **23**, 32–35 (2007).
186. Bayat, A., Ollier, W. E. R., Ferguson, M. W. J., Bock, O. & Mrowietz, U. Genetic susceptibility to keloid disease and transforming growth factor β 2 polymorphisms. *British Journal of Plastic Surgery* **55**, 283–286 (2002).
187. Brown, J. J. *et al.* Genetic susceptibility to keloid scarring: SMAD gene SNP frequencies in Afro-Caribbeans. *Exp Dermatol* **17**, 610–613 (2008).
188. Marneros, A. G., Norris, J. E. C., Watanabe, S., Reichenberger, E. & Olsen, B. R. Genome scans provide evidence for keloid susceptibility loci on chromosomes 2q23 and 7p11. *J Invest Dermatol* **122**, 1126–1132 (2004).
189. Shih, B., McGrouther, D. A. & Bayat, A. Identification of novel keloid biomarkers through Profiling of Tissue Biopsies versus Cell Cultures in Keloid Margin specimens Compared to adjacent Normal Skin. *Eplasty* **10**, e24 (2010).
190. Chin, G. S. *et al.* Cellular signaling by tyrosine phosphorylation in keloid and normal human dermal fibroblasts. *Plast Reconstr Surg* **106**, 1532–1540 (2000).

191. Tosa, M., Watanabe, A. & Ghazizadeh, M. IL-6 Polymorphism and Susceptibility to Keloid Formation in a Japanese Population. *J Invest Dermatol* **136**, 1069–1072 (2016).
192. Zhu, X. J., Li, W. Z., Li, H., Fu, C. Q. & Liu, J. Association of interleukin-6 gene polymorphisms and circulating levels with keloid scars in a Chinese Han population. *Genet Mol Res* **16**, (2017).
193. Abdu Allah, A. M. K. *et al.* Interleukin-6 serum level and gene polymorphism in keloid patients. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **65**, 43–48 (2019).
194. Murad, A. *et al.* Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing. *FASEB J* **17**, 1895–1897 (2003).
195. Tadokoro, S. *et al.* Leptin promotes wound healing in the skin. *PLoS One* **10**, e0121242 (2015).
196. Liu, J., Cai, L., Zhang, Z., Ma, Y. & Wang, Y. Association of Leptin Receptor Gene Polymorphisms with Keloids in the Chinese Han Population. *Med Sci Monit* **27**, e928503 (2021).
197. Greater understanding about genetic factors in keloid development. *Br J Dermatol* **188**, e9 (2023).
198. Down regulation of ADAM33 as a Predictive Biomarker of Aggressive Breast Cancer - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28294120/>.
199. Fujita, M. *et al.* NEDD4 Is Involved in Inflammation Development during Keloid Formation. *J Invest Dermatol* **139**, 333–341 (2019).
200. Heim, J. B. *et al.* Myosin-1E interacts with FAK proline-rich region 1 to induce fibronectin-type matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 3933–3938 (2017).
201. Brown, J. J., Ollier, W. E. R., Thomson, W. & Bayat, A. Positive association of HLA-DRB1*15 with keloid disease in Caucasians. *Int J Immunogenet* **35**, 303–307 (2008).
202. Zhang, Q., Qian, Y. L. & Cui, L. [Experimental study of actin and myosin in the scar tissue]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* **15**, 32–35 (2001).
203. Zhou, Z.-Q. *et al.* HUS1 checkpoint clamp component (HUS1) is a potential tumor suppressor in primary hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* **58**, 76–87 (2019).
204. Marongiu, M. *et al.* Novel action of FOXL2 as mediator of Col1a2 gene autoregulation. *Dev Biol* **416**, 200–211 (2016).
205. Lu, W. *et al.* SNP rs1511412 in FOXL2 gene as a risk factor for keloid by meta analysis. *Int J Clin Exp Med* **8**, 2766–2771 (2015).

206. Lu, M.-Z. *et al.* Genomic risk variants at 3q22.3 are associated with keloids in a Chinese Han population. *Am J Transl Res* **10**, 554–562 (2018).
207. Differential susceptible loci expression in keloid and hypertrophic scars in the Chinese Han population - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25305228/>.
208. Jones, L. R. *et al.* Genome-Wide Scan for Methylation Profiles in Keloids. *Dis Markers* **2015**, 943176 (2015).
209. Jones, L. R. *et al.* Biological significance of genome-wide DNA methylation profiles in keloids. *Laryngoscope* **127**, 70–78 (2017).
210. E, Y., Qipa, Z. & Hengshu, Z. The Expression of DNMT1 in Pathologic Scar Fibroblasts and the Effect of 5-aza-2-Deoxycytidine on Cytokines of Pathologic Scar Fibroblasts. *Wounds* **26**, 139–146 (2014).
211. Zou, Q.-P., Yang, E. & Zhang, H.-S. [Effect of the methylation enzyme inhibitors of 5-aza-2-deoxycytidine on the TGF-beta/smad signal transduction pathway in human keloid fibroblasts]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* **29**, 285–289 (2013).
212. Fischle, W. Molecular mechanisms of histone modification function. *Biochim Biophys Acta* **1839**, 621–622 (2014).
213. Fitzgerald O'Connor, E. J. *et al.* Histone deacetylase 2 is upregulated in normal and keloid scars. *J Invest Dermatol* **132**, 1293–1296 (2012).
214. Diao, J.-S. *et al.* Trichostatin A inhibits collagen synthesis and induces apoptosis in keloid fibroblasts. *Arch Dermatol Res* **303**, 573–580 (2011).
215. Russell, S. B. *et al.* Epigenetically altered wound healing in keloid fibroblasts. *J Invest Dermatol* **130**, 2489–2496 (2010).
216. Liu, Y., Yang, D., Xiao, Z. & Zhang, M. miRNA expression profiles in keloid tissue and corresponding normal skin tissue. *Aesthetic Plast Surg* **36**, 193–201 (2012).
217. Wu, Z.-Y. *et al.* Keloid microRNA expression analysis and the influence of miR-199a-5p on the proliferation of keloid fibroblasts. *Genet Mol Res* **13**, 2727–2738 (2014).
218. Wu, Z.-Y., Lu, L., Guo, X.-R. & Zhang, P.-H. [Identification of differently expressed microRNAs in keloid and pilot study on biological function of miR-199a-5p]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* **29**, 279–284 (2013).
219. Liang, X., Ma, L., Long, X. & Wang, X. LncRNA expression profiles and validation in keloid and normal skin tissue. *Int J Oncol* **47**, 1829–1838 (2015).

220. Etoh, M. *et al.* microRNA-7 down-regulation mediates excessive collagen expression in localized scleroderma. *Arch Dermatol Res* **305**, 9–15 (2013).
221. Maurer, B. *et al.* MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **62**, 1733–1743 (2010).
222. Yang, X., Lei, S., Long, J., Liu, X. & Wu, Q. MicroRNA-199a-5p inhibits tumor proliferation in melanoma by mediating HIF-1 α . *Mol Med Rep* **13**, 5241–5247 (2016).
223. Langer, K. Zur Anatomie und Physiologie der Haut. I. Über die Spaltbarkeit der Cutis. (1861).
224. Hsu, C.-K. *et al.* Mechanical forces in skin disorders. *J Dermatol Sci* **90**, 232–240 (2018).
225. Ogawa, R. *et al.* The relationship between skin stretching/contraction and pathologic scarring: the important role of mechanical forces in keloid generation. *Wound Repair Regen* **20**, 149–157 (2012).
226. Butzelaar, L. *et al.* Different properties of skin of different body sites: The root of keloid formation? *Wound Repair Regen* **25**, 758–766 (2017).
227. Keloid pathogenesis and treatment - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16404281/>.
228. Gurtner, G. C. *et al.* Improving cutaneous scar formation by controlling the mechanical environment: large animal and phase I studies. *Ann Surg* **254**, 217–225 (2011).
229. Keloids: time to dispel the myths? - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10654768/>.
230. Young, W. G., Worsham, M. J., Joseph, C. L. M., Divine, G. W. & Jones, L. R. D. Incidence of keloid and risk factors following head and neck surgery. *JAMA Facial Plast Surg* **16**, 379–380 (2014).
231. Bayat, A., Arscott, G., Ollier, W. E. R., McGrouther, D. A. & Ferguson, M. W. J. Keloid disease: clinical relevance of single versus multiple site scars. *Br J Plast Surg* **58**, 28–37 (2005).
232. Burd, A. Keloid epidemiology: population based studies needed. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **59**, 105 (2006).
233. Lu, W., Zheng, X., Yao, X. & Zhang, L. Clinical and epidemiological analysis of keloids in Chinese patients. *Arch Dermatol Res* **307**, 109–114 (2015).

234. Schierle, H. P., Scholz, D. & Lemperle, G. Elevated levels of testosterone receptors in keloid tissue: an experimental investigation. *Plast Reconstr Surg* **100**, 390–395; discussion 396 (1997).
235. Kim, H.-D. *et al.* Recurrent Auricular Keloids during Pregnancy. *Arch Plast Surg* **40**, 70–72 (2013).
236. Wu, J. *et al.* RNA Sequencing Keloid Transcriptome Associates Keloids With Th2, Th1, Th17/Th22, and JAK3-Skewing. *Front Immunol* **11**, 597741 (2020).
237. Russell, S. B., Trupin, K. M., Rodríguez-Eaton, S., Russell, J. D. & Trupin, J. S. Reduced growth-factor requirement of keloid-derived fibroblasts may account for tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 587–591 (1988).
238. Zhang, M.-Z. *et al.* A comparison of apoptosis levels in keloid tissue, physiological scars and normal skin. *Am J Transl Res* **9**, 5548–5557 (2017).
239. Chipev, C. C. *et al.* Myofibroblast phenotype and apoptosis in keloid and palmar fibroblasts in vitro. *Cell Death Differ* **7**, 166–176 (2000).
240. Smith, J. C., Boone, B. E., Opalenik, S. R., Williams, S. M. & Russell, S. B. Gene profiling of keloid fibroblasts shows altered expression in multiple fibrosis-associated pathways. *J Invest Dermatol* **128**, 1298–1310 (2008).
241. Ashcroft, K. J., Syed, F. & Bayat, A. Site-specific keloid fibroblasts alter the behaviour of normal skin and normal scar fibroblasts through paracrine signalling. *PLoS One* **8**, e75600 (2013).
242. TGF- β 1 Induces Polypyrimidine Tract-Binding Protein to Alter Fibroblasts Proliferation and Fibronectin Deposition in Keloid - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27897224/>.
243. Lee, T. Y. *et al.* Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids. *Ann Plast Surg* **43**, 179–184 (1999).
244. Bock, O. *et al.* Studies of Transforming Growth Factors Beta 1-3 and their Receptors I and II in Fibroblast of Keloids and Hypertrophic Scars. *Acta Dermato-Venereologica* **1**, 1–1 (2005).
245. Chin, G. S. *et al.* Differential expression of transforming growth factor-beta receptors I and II and activation of Smad 3 in keloid fibroblasts. *Plast Reconstr Surg* **108**, 423–429 (2001).

246. Haisa, M., Okochi, H. & Grotendorst, G. R. Elevated levels of PDGF alpha receptors in keloid fibroblasts contribute to an enhanced response to PDGF. *J Invest Dermatol* **103**, 560–563 (1994).
247. Yu, H., Bock, O., Bayat, A., Ferguson, M. W. J. & Mrowietz, U. Decreased expression of inhibitory SMAD6 and SMAD7 in keloid scarring. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* **59**, 221–229 (2006).
248. Wang, X.-M., Liu, X.-M., Wang, Y. & Chen, Z.-Y. Activating transcription factor 3 (ATF3) regulates cell growth, apoptosis, invasion and collagen synthesis in keloid fibroblast through transforming growth factor beta (TGF-beta)/SMAD signaling pathway. *Bioengineered* **12**, 117–126 (2021).
249. Ma, H.-L., Zhao, X.-F., Chen, G.-Z., Fang, R.-H. & Zhang, F.-R. Silencing NLRC5 inhibits extracellular matrix expression in keloid fibroblasts via inhibition of transforming growth factor- β 1/Smad signaling pathway. *Biomed Pharmacother* **83**, 1016–1021 (2016).
250. Mah, W. *et al.* Elevated CD26 Expression by Skin Fibroblasts Distinguishes a Profibrotic Phenotype Involved in Scar Formation Compared to Gingival Fibroblasts. *Am J Pathol* **187**, 1717–1735 (2017).
251. Meidinger, S. *et al.* 1289 CD26+ FAP+ fibroblasts increase ECM expression in keloid scarring. *Journal of Investigative Dermatology* **138**, S219 (2018).
252. Huang, X. *et al.* Targeting Dermal Fibroblast Subtypes in Antifibrotic Therapy: Surface Marker as a Cellular Identity or a Functional Entity? *Frontiers in Physiology* **12**, (2021).
253. Xin, Y. *et al.* Expansion of CD26 positive fibroblast population promotes keloid progression. *Exp Cell Res* **356**, 104–113 (2017).
254. Chen, Z. *et al.* Dysregulation of DPP4-CXCL12 Balance by TGF- β 1/SMAD Pathway Promotes CXCR4+ Inflammatory Cell Infiltration in Keloid Scars. *J Inflamm Res* **14**, 4169–4180 (2021).
255. Tasic, T. *et al.* Dipeptidyl peptidase IV (DPP4) deficiency increases Th1-driven allergic contact dermatitis. *Clin Exp Allergy* **41**, 1098–1107 (2011).
256. Barreira da Silva, R. *et al.* Dipeptidylpeptidase 4 inhibition enhances lymphocyte trafficking, improving both naturally occurring tumor immunity and immunotherapy. *Nat Immunol* **16**, 850–858 (2015).
257. Xue, H., McCauley, R. L. & Zhang, W. Elevated interleukin-6 expression in keloid fibroblasts. *J Surg Res* **89**, 74–77 (2000).

258. Ghazizadeh, M., Tosa, M., Shimizu, H., Hyakusoku, H. & Kawanami, O. Functional implications of the IL-6 signaling pathway in keloid pathogenesis. *J Invest Dermatol* **127**, 98–105 (2007).
259. Messadi, D. V. *et al.* Activation of NFkappaB signal pathways in keloid fibroblasts. *Arch Dermatol Res* **296**, 125–133 (2004).
260. Li, Y. *et al.* The Polygenic Map of Keloid Fibroblasts Reveals Fibrosis-Associated Gene Alterations in Inflammation and Immune Responses. *Front Immunol* **12**, 810290 (2022).
261. Kanchanawong, P. & Calderwood, D. A. Organization, dynamics and mechanoregulation of integrin-mediated cell–ECM adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **24**, 142–161 (2023).
262. Wang, Z. *et al.* Increased transcriptional response to mechanical strain in keloid fibroblasts due to increased focal adhesion complex formation. *J Cell Physiol* **206**, 510–517 (2006).
263. Joo, C.-K. & Seomun, Y. Matrix metalloproteinase (MMP) and TGF beta 1-stimulated cell migration in skin and cornea wound healing. *Cell Adh Migr* **2**, 252–253 (2008).
264. Kang, Y. *et al.* Hypoxia and HIF-1 α Regulate Collagen Production in Keloids. *J Invest Dermatol* **140**, 2157–2165 (2020).
265. Lei, R. *et al.* HIF-1 α promotes the keloid development through the activation of TGF- β /Smad and TLR4/MyD88/NF- κ B pathways. *Cell Cycle* **18**, 3239–3250 (2019).
266. Satish, L., Lyons-Weiler, J., Hebda, P. A. & Wells, A. Gene expression patterns in isolated keloid fibroblasts. *Wound Repair Regen* **14**, 463–470 (2006).
267. Tosa, M. *et al.* Global gene expression analysis of keloid fibroblasts in response to electron beam irradiation reveals the involvement of interleukin-6 pathway. *J Invest Dermatol* **124**, 704–713 (2005).
268. Feghali, C. A. & Wright, T. M. Identification of multiple, differentially expressed messenger RNAs in dermal fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **42**, 1451–1457 (1999).
269. Pilewski, J. M., Liu, L., Henry, A. C., Knauer, A. V. & Feghali-Bostwick, C. A. Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins 3 and 5 Are Overexpressed in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Contribute to Extracellular Matrix Deposition. *The American Journal of Pathology* **166**, 399 (2005).
270. Yoshimoto, H. *et al.* Overexpression of insulin-like growth factor-1 (IGF-I) receptor and the invasiveness of cultured keloid fibroblasts. *Am J Pathol* **154**, 883–889 (1999).

271. Labus, M. B., Stirk, C. M., Thompson, W. D. & Melvin, W. T. Expression of Wnt genes in early wound healing. *Wound Repair Regen* **6**, 58–64 (1998).
272. Okuse, T., Chiba, T., Katsuumi, I. & Imai, K. Differential expression and localization of WNTs in an animal model of skin wound healing. *Wound Repair Regen* **13**, 491–497 (2005).
273. Upregulation of the Wnt/beta-catenin pathway induced by transforming growth factor-beta in hypertrophic scars and keloids - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16874413/>.
274. Liu, J. *et al.* Methylation of secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) promoter downregulates Wnt/ β -catenin activity in keloids. *J Mol Histol* **49**, 185–193 (2018).
275. Davis, K. *et al.* Detection of a critical interval for a familial keloid locus on chromosome 14q22-14q23 in an African-American pedigree. *American Journal of Human Genetics* **67**, 62 (2000).
276. Rinkevich, Y. *et al.* Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential. *Science* **348**, aaa2151 (2015).
277. Limandjaja, G. C. *et al.* Reconstructed human keloid models show heterogeneity within keloid scars. *Arch Dermatol Res* **310**, 815–826 (2018).
278. Serror, K. *et al.* Evidence of inter- and intra-keloid heterogeneity through analysis of dermal fibroblasts: A new insight in deciphering keloid physiopathology. *Experimental Dermatology* **n/a**,.
279. Solé-Boldo, L. *et al.* Single-cell transcriptomes of the human skin reveal age-related loss of fibroblast priming. *Commun Biol* **3**, 188 (2020).
280. Deng, C.-C. *et al.* Single-cell RNA-seq reveals fibroblast heterogeneity and increased mesenchymal fibroblasts in human fibrotic skin diseases. *Nat Commun* **12**, 3709 (2021).
281. Feng, C. *et al.* Single-cell RNA sequencing reveals distinct immunology profiles in human keloid. *Front Immunol* **13**, 940645 (2022).
282. Li, A., Wei, Y., Hung, C. & Vunjak-Novakovic, G. Chondrogenic properties of collagen type XI, a component of cartilage extracellular matrix. *Biomaterials* **173**, 47–57 (2018).
283. Peltonen, J. *et al.* Activation of collagen gene expression in keloids: co-localization of type I and VI collagen and transforming growth factor-beta 1 mRNA. *J Invest Dermatol* **97**, 240–248 (1991).

284. Babu, M., Diegelmann, R. & Oliver, N. Keloid fibroblasts exhibit an altered response to TGF-beta. *J Invest Dermatol* **99**, 650–655 (1992).
285. Deng, Z. *et al.* Keloid fibroblasts have elevated and dysfunctional mechanotransduction signaling that is independent of TGF- β . *J Dermatol Sci* **104**, 11–20 (2021).
286. Marty, P. *et al.* Halofuginone regulates keloid fibroblast fibrotic response to TGF- β induction. *Biomed Pharmacother* **135**, 111182 (2021).
287. Babu, M., Diegelmann, R. & Oliver, N. Fibronectin is overproduced by keloid fibroblasts during abnormal wound healing. *Mol Cell Biol* **9**, 1642–1650 (1989).
288. He, S. *et al.* Mechanisms of transforming growth factor beta(1)/Smad signalling mediated by mitogen-activated protein kinase pathways in keloid fibroblasts. *Br J Dermatol* **162**, 538–546 (2010).
289. Dirand, Z., Tissot, M., Chatelain, B., Viennet, C. & Rolin, G. Is Spheroid a Relevant Model to Address Fibrogenesis in Keloid Research? *Biomedicines* **11**, 2350 (2023).
290. Ding, Q. *et al.* Stemona alkaloids suppress the positive feedback loop between M2 polarization and fibroblast differentiation by inhibiting JAK2/STAT3 pathway in fibroblasts and CXCR4/PI3K/AKT1 pathway in macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **72**, 385–394 (2019).
291. Nangole, F. W., Ouyang, K., Anzala, O., Ogengo, J. & Agak, G. W. Multiple Cytokines Elevated in Patients with Keloids: Is It an Indication of Auto-Inflammatory Disease? *J Inflamm Res* **14**, 2465–2470 (2021).
292. Nangole, F. W. & Agak, G. W. Keloid pathophysiology: fibroblast or inflammatory disorders? *JPRAS Open* **22**, 44–54 (2019).
293. Kidzeru, E. B. *et al.* Immune cells and associated molecular markers in dermal fibrosis with focus on raised cutaneous scars. *Exp Dermatol* **32**, 570–587 (2023).
294. Bloch, E. F., Hall, M. G., Denson, M. J. & Slay-Solomon, V. General immune reactivity in keloid patients. *Plast Reconstr Surg* **73**, 448–451 (1984).
295. Kazeem, A. A. The immunological aspects of keloid tumor formation. *J Surg Oncol* **38**, 16–18 (1988).
296. Xu, H. *et al.* Downregulated cytotoxic CD8⁺ T-cell identifies with the NKG2A-soluble HLA-E axis as a predictive biomarker and potential therapeutic target in keloids. *Cell Mol Immunol* **19**, 527–539 (2022).

297. Bagabir, R. *et al.* Site-specific immunophenotyping of keloid disease demonstrates immune upregulation and the presence of lymphoid aggregates. *Br J Dermatol* **167**, 1053–1066 (2012).
298. Chen, Y., Jin, Q., Fu, X., Qiao, J. & Niu, F. Connection between T regulatory cell enrichment and collagen deposition in keloid. *Exp Cell Res* **383**, 111549 (2019).
299. Jin, Q. *et al.* Macrophages in keloid are potent at promoting the differentiation and function of regulatory T cells. *Exp Cell Res* **362**, 472–476 (2018).
300. Nang'ole, W. F., Omu, A., Ogeng'o, J. A. & Agak, G. W. Do Mesenchymal Stem Cells Influence Keloid Recurrence? *Stem Cells Cloning* **15**, 77–84 (2022).
301. Shin, J.-Y., Wang, C.-Y., Lin, C.-C. & Chu, C.-L. A recently described type 2 conventional dendritic cell (cDC2) subset mediates inflammation. *Cell Mol Immunol* **17**, 1215–1217 (2020).
302. Jin, Q. *et al.* Macrophages in keloid are potent at promoting the differentiation and function of regulatory T cells. *Exp Cell Res* **362**, 472–476 (2018).
303. Lee, C.-C. *et al.* An updated review of the immunological mechanisms of keloid scars. *Front Immunol* **14**, 1117630 (2023).
304. Ogawa, R. Keloid and Hypertrophic Scars Are the Result of Chronic Inflammation in the Reticular Dermis. *Int J Mol Sci* **18**, (2017).
305. Zhang, D., Li, B. & Zhao, M. Therapeutic Strategies by Regulating Interleukin Family to Suppress Inflammation in Hypertrophic Scar and Keloid. *Front Pharmacol* **12**, 667763 (2021).
306. Do, D. V. *et al.* Interleukin-18 system plays an important role in keloid pathogenesis via epithelial-mesenchymal interactions. *Br J Dermatol* **166**, 1275–1288 (2012).
307. Shan, M. *et al.* Immune-related gene expression in skin, inflamed and keloid tissue from patients with keloids. *Oncol Lett* **23**, 72 (2022).
308. Khattab, F. M. & Samir, M. A. Correlation between serum IL 37 levels with keloid severity. *J Cosmet Dermatol* **19**, 2428–2431 (2020).
309. Zhao, Y., Shi, J. & Lyu, L. Critical role and potential therapeutic efficacy of interleukin-37 in the pathogenesis of keloid scarring. *J Cosmet Dermatol* **19**, 1805–1806 (2020).
310. Xie, J. *et al.* Single-Cell Sequencing Analysis and Weighted Co-Expression Network Analysis Based on Public Databases Identified That TNC Is a Novel Biomarker for Keloid. *Front Immunol* **12**, 783907 (2021).

311. Philippeos, C. *et al.* Spatial and Single-Cell Transcriptional Profiling Identifies Functionally Distinct Human Dermal Fibroblast Subpopulations. *J Invest Dermatol* **138**, 811–825 (2018).
312. Shan, M. & Wang, Y. Viewing keloids within the immune microenvironment. *Am J Transl Res* **14**, 718–727 (2022).
313. Zhang, M., Chen, H., Qian, H. & Wang, C. Characterization of the skin keloid microenvironment. *Cell Commun Signal* **21**, 207 (2023).
314. Xia, Y. *et al.* Identification of a Diagnostic Signature and Immune Cell Infiltration Characteristics in Keloids. *Front Mol Biosci* **9**, 879461 (2022).
315. Wang, X. *et al.* Identification and characterization of four immune-related signatures in keloid. *Front Immunol* **13**, 942446 (2022).
316. Griffith, J. W., Sokol, C. L. & Luster, A. D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* **32**, 659–702 (2014).
317. López-Pacheco, C., Soldevila, G., Du Pont, G., Hernández-Pando, R. & García-Zepeda, E. A. CCR9 Is a Key Regulator of Early Phases of Allergic Airway Inflammation. *Mediators Inflamm* **2016**, 3635809 (2016).
318. Chen, Z. *et al.* Characterization of CD45RO⁺ memory T lymphocytes in keloid disease. *Br J Dermatol* **178**, 940–950 (2018).
319. T cell memory. Skin-resident memory CD8⁺ T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25278612/>.
320. Wynn, T. A. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* **4**, 583–594 (2004).
321. Harrop, A. R. *et al.* Regulation of collagen synthesis and mRNA expression in normal and hypertrophic scar fibroblasts in vitro by interferon-gamma. *J Surg Res* **58**, 471–477 (1995).
322. Diaz, A. *et al.* Keloid lesions show increased IL-4/IL-13 signaling and respond to Th2-targeting dupilumab therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **34**, e161–e164 (2020).
323. Oriente, A. *et al.* Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* **292**, 988–994 (2000).
324. Shan, M. *et al.* IL-4 and CCR7 play an important role in the development of keloids in patients with a family history. *Am J Transl Res* **14**, 3381–3394 (2022).

325. Maeda, D. *et al.* Periostin is induced by IL-4/IL-13 in dermal fibroblasts and promotes RhoA/ROCK pathway-mediated TGF- β 1 secretion in abnormal scar formation. *J Plast Surg Hand Surg* **53**, 288–294 (2019).
326. Chao, H. *et al.* IL-13RA2 downregulation in fibroblasts promotes keloid fibrosis via JAK/STAT6 activation. *JCI Insight* **8**, e157091.
327. Nguyen, J. K., Austin, E., Huang, A., Mamalis, A. & Jagdeo, J. The IL-4/IL-13 Axis in Skin Fibrosis and Scarring: Mechanistic Concepts and Therapeutic Targets. *Arch Dermatol Res* **312**, 81–92 (2020).
328. Deng, G. *et al.* Foxp3 Post-translational Modifications and Treg Suppressive Activity. *Front Immunol* **10**, 2486 (2019).
329. Li, Z., Li, D., Tsun, A. & Li, B. FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation. *Cell Mol Immunol* **12**, 558–565 (2015).
330. Ganeshan, K. & Bryce, P. J. Regulatory T cells enhance mast cell production of IL-6 via surface-bound TGF- β . *J Immunol* **188**, 594–603 (2012).
331. Fickenscher, H. *et al.* The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol* **23**, 89–96 (2002).
332. Zhang, Q. *et al.* Tumor-like stem cells derived from human keloid are governed by the inflammatory niche driven by IL-17/IL-6 axis. *PLoS One* **4**, e7798 (2009).
333. Lee, S.-Y. *et al.* IL-17 Induced Stromal Cell-Derived Factor-1 and Profibrotic Factor in Keloid-Derived Skin Fibroblasts via the STAT3 Pathway. *Inflammation* **43**, 664–672 (2020).
334. Lee, S.-Y. *et al.* IL-17 Induces Autophagy Dysfunction to Promote Inflammatory Cell Death and Fibrosis in Keloid Fibroblasts via the STAT3 and HIF-1 α Dependent Signaling Pathways. *Front Immunol* **13**, 888719 (2022).
335. Ud-Din, S., Wilgus, T. A. & Bayat, A. Mast Cells in Skin Scarring: A Review of Animal and Human Research. *Front Immunol* **11**, 552205 (2020).
336. Ng, M. F. Y. The role of mast cells in wound healing. *Int Wound J* **7**, 55–61 (2010).
337. Arbi, S., Eksteen, E. C., Oberholzer, H. M., Taute, H. & Bester, M. J. Premature collagen fibril formation, fibroblast-mast cell interactions and mast cell-mediated phagocytosis of collagen in keloids. *Ultrastruct Pathol* **39**, 95–103 (2015).
338. Ammendola, M. *et al.* Targeting Mast Cells Tryptase in Tumor Microenvironment: A Potential Antiangiogenetic Strategy. *Biomed Res Int* **2014**, 154702 (2014).

339. Dong, X., Zhang, C., Ma, S. & Wen, H. Mast cell chymase in keloid induces profibrotic response via transforming growth factor- β 1/Smad activation in keloid fibroblasts. *Int J Clin Exp Pathol* **7**, 3596–3607 (2014).
340. Zhang, Q. *et al.* Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibit mast cell-stimulated type I collagen expression in keloid fibroblasts via blocking PI-3K/AkT signaling pathways. *J Invest Dermatol* **126**, 2607–2613 (2006).
341. Wang, R., Chen, J., Zhang, Z. & Cen, Y. Role of chymase in the local renin-angiotensin system in keloids: inhibition of chymase may be an effective therapeutic approach to treat keloids. *Drug Des Devel Ther* **9**, 4979–4988 (2015).
342. Zhang, Q. *et al.* Hypoxia-induced HIF-1 alpha accumulation is augmented in a co-culture of keloid fibroblasts and human mast cells: involvement of ERK1/2 and PI-3K/Akt. *Exp Cell Res* **312**, 145–155 (2006).
343. Carneiro, T., Zimmermann, M., Radstake, T. R. D. J. & Marut, W. Novel insights into dendritic cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* **201**, 25–33 (2020).
344. Lu, T. T. Dendritic cells: novel players in fibrosis and scleroderma. *Curr Rheumatol Rep* **14**, 30–38 (2012).
345. Onodera, M. *et al.* Factor XIIIa-positive dermal dendritic cells in keloids and hypertrophic and mature scars. *Pathol Int* **57**, 337–342 (2007).
346. Rath, M. *et al.* Multi-Antigen Imaging Reveals Inflammatory DC, ADAM17 and Nephrylysin as Effectors in Keloid Formation. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 9417 (2021).
347. Grant, C. *et al.* Expression of embryonic stem cell markers in keloid-associated lymphoid tissue. *J Clin Pathol* **69**, 643–646 (2016).
348. Lim, K. H., Itinteang, T., Davis, P. F. & Tan, S. T. Stem Cells in Keloid Lesions: A Review. *Plast Reconstr Surg Glob Open* **7**, e2228 (2019).
349. Akino, K. *et al.* Human mesenchymal stem cells may be involved in keloid pathogenesis. *Int J Dermatol* **47**, 1112–1117 (2008).
350. Lim, I. J., Phan, T. T., Song, C., Tan, W. T. & Longaker, M. T. Investigation of the influence of keloid-derived keratinocytes on fibroblast growth and proliferation in vitro. *Plast Reconstr Surg* **107**, 797–808 (2001).

351. Funayama, E., Chodon, T., Oyama, A. & Sugihara, T. Keratinocytes Promote Proliferation and Inhibit Apoptosis of the Underlying Fibroblasts: An Important Role in the Pathogenesis of Keloid. *Journal of Investigative Dermatology* **121**, 1326–1331 (2003).
352. Ma, X. *et al.* Keloid-derived keratinocytes acquire a fibroblast-like appearance and an enhanced invasive capacity in a hypoxic microenvironment in vitro. *Int J Mol Med* **35**, 1246–1256 (2015).
353. Hahn, J. M. *et al.* Keloid-derived keratinocytes exhibit an abnormal gene expression profile consistent with a distinct causal role in keloid pathology. *Wound Repair Regen* **21**, 530–544 (2013).
354. Hahn, J. M., McFarland, K. L., Combs, K. A. & Supp, D. M. Partial epithelial-mesenchymal transition in keloid scars: regulation of keloid keratinocyte gene expression by transforming growth factor- β 1. *Burns Trauma* **4**, 30 (2016).
355. Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a016295 (2014).
356. Fielding, C. A. *et al.* Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation. *Immunity* **40**, 40–50 (2014).
357. Ghazizadeh, M. Essential role of IL-6 signaling pathway in keloid pathogenesis. *J Nippon Med Sch* **74**, 11–22 (2007).
358. Lim, C. P., Phan, T.-T., Lim, I. J. & Cao, X. Stat3 contributes to keloid pathogenesis via promoting collagen production, cell proliferation and migration. *Oncogene* **25**, 5416–5425 (2006).
359. Johnson, B. Z., Stevenson, A. W., Prêle, C. M., Fear, M. W. & Wood, F. M. The Role of IL-6 in Skin Fibrosis and Cutaneous Wound Healing. *Biomedicines* **8**, 101 (2020).
360. Li, X., Wang, Y., Yuan, B., Yang, H. & Qiao, L. Status of M1 and M2 type macrophages in keloid. *Int J Clin Exp Pathol* **10**, 11098–11105 (2017).
361. Liao, W.-T. *et al.* Enhanced MCP-1 release by keloid CD14⁺ cells augments fibroblast proliferation: role of MCP-1 and Akt pathway in keloids. *Exp Dermatol* **19**, e142-150 (2010).
362. Seoudy, W. M., Mohy El Dien, S. M., Abdel Reheem, T. A., Elfangary, M. M. & Erfan, M. A. Macrophages of the M1 and M2 types play a role in keloids pathogenesis. *International Wound Journal* **n/a**.

363. Jayasingam, S. D. *et al.* Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Front Oncol* **9**, 1512 (2020).
364. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **23**, 549–555 (2002).
365. Hu, Z.-C. *et al.* Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in keloid and hypertrophic scar. *Clin Exp Dermatol* **39**, 822–828 (2014).
366. Li, J. *et al.* Collagen triple helix repeat containing-1 inhibits transforming growth factor- β 1-induced collagen type I expression in keloid. *Br J Dermatol* **164**, 1030–1036 (2011).
367. Kischer, C. W. & Pindur, J. Effects of platelet derived growth factor (PDGF) on fibronectin (FN) production by human skin and scar fibroblasts. *Cytotechnology* **3**, 231–238 (1990).
368. Messadi, D. V. *et al.* Effect of TGF- β 1 on PDGF receptors expression in human scar fibroblasts. *Front Biosci* **3**, a16-22 (1998).
369. Limandjaja, G. C., Waaijman, T., Roffel, S., Niessen, F. B. & Gibbs, S. Monocytes co-cultured with reconstructed keloid and normal skin models skew towards M2 macrophage phenotype. *Arch Dermatol Res* **311**, 615–627 (2019).
370. Lee, Y.-S. *et al.* Keloid-derived, plasma/fibrin-based skin equivalents generate de novo dermal and epidermal pathology of keloid fibrosis in a mouse model. *Wound Repair Regen* **24**, 302–316 (2016).
371. Ploeger, D. T. *et al.* Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. *Cell Commun Signal* **11**, 29 (2013).
372. Zhu, Z., Ding, J., Ma, Z., Iwashina, T. & Tredget, E. E. Alternatively activated macrophages derived from THP-1 cells promote the fibrogenic activities of human dermal fibroblasts. *Wound Repair Regen* **25**, 377–388 (2017).
373. Zhu, Z. *et al.* Blockade of LINC01605-enriched exosome generation in M2 macrophages impairs M2 macrophage-induced proliferation, migration, and invasion of human dermal fibroblasts. *Int J Immunopathol Pharmacol* **35**, 20587384211016724 (2021).
374. Sapudom, J. *et al.* 3D in vitro M2 macrophage model to mimic modulation of tissue repair. *npj Regen Med* **6**, 1–13 (2021).

375. Savitri, C., Kwon, J. W., Drobyshava, V., Ha, S. S. & Park, K. M2 Macrophage-Derived Concentrated Conditioned Media Significantly Improves Skin Wound Healing. *Tissue Eng Regen Med* **19**, 617–628 (2022).
376. Kurachi, I., Kurita, E., Takushima, A. & Suga, H. Human CD206+ Macrophages Show Antifibrotic Effects on Human Fibroblasts via an IL-6-Dependent Mechanism In Vitro. *Plast Reconstr Surg* (2020) doi:10.1097/PRS.00000000000007563.
377. Couper, K. N., Blount, D. G. & Riley, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* **180**, 5771–5777 (2008).
378. Zhou, B., Gao, Z., Liu, W., Wu, X. & Wang, W. Important role of mechanical microenvironment on macrophage dysfunction during keloid pathogenesis. *Exp Dermatol* **31**, 375–380 (2022).
379. Bao, Y. *et al.* Comparative Efficacy and Safety of Common Therapies in Keloids and Hypertrophic Scars: A Systematic Review and Meta-analysis. *Aesthetic Plast Surg* **44**, 207–218 (2020).
380. Betarbet, U. & Blalock, T. W. Keloids: A Review of Etiology, Prevention, and Treatment. *J Clin Aesthet Dermatol* **13**, 33–43 (2020).
381. Walsh, L. A. *et al.* Keloid treatments: an evidence-based systematic review of recent advances. *Syst Rev* **12**, 42 (2023).
382. Gold, M. H. *et al.* Updated international clinical recommendations on scar management: part 2--algorithms for scar prevention and treatment. *Dermatol Surg* **40**, 825–831 (2014).
383. Wu, W.-S., Wang, F.-S., Yang, K. D., Huang, C.-C. & Kuo, Y.-R. Dexamethasone induction of keloid regression through effective suppression of VEGF expression and keloid fibroblast proliferation. *J Invest Dermatol* **126**, 1264–1271 (2006).
384. McCoy, B. J., Diegelmann, R. F. & Cohen, I. K. In vitro inhibition of cell growth, collagen synthesis, and prolyl hydroxylase activity by triamcinolone acetonide. *Proc Soc Exp Biol Med* **163**, 216–222 (1980).
385. Trisliana Perdanasari, A. *et al.* Recent developments in the use of intralesional injections keloid treatment. *Arch Plast Surg* **41**, 620–629 (2014).
386. Muneuchi, G. *et al.* Long-term outcome of intralesional injection of triamcinolone acetonide for the treatment of keloid scars in Asian patients. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* **40**, 111–116 (2006).

387. Acosta, S. *et al.* Effectiveness of Intralesional Triamcinolone in the Treatment of Keloids in Children. *Pediatr Dermatol* **33**, 75–79 (2016).
388. Nor, N. M., Ismail, R., Jamil, A., Shah, S. A. & Imran, F. H. A Randomized, Single-Blind Trial of Clobetasol Propionate 0.05% Cream Under Silicone Dressing Occlusion Versus Intralesional Triamcinolone for Treatment of Keloid. *Clin Drug Investig* **37**, 295–301 (2017).
389. Huu, N. D. *et al.* Successful Treatment of Intralesional Triamcilonon Acetonide Injection in Keloid Patients. *Open Access Maced J Med Sci* **7**, 275–278 (2019).
390. Cai, L. *et al.* Evaluation of the efficacy of triamcinolone acetonide in the treatment of keloids by high-frequency ultrasound. *Skin Res Technol* **26**, 489–493 (2020).
391. Park, T. H., Seo, S. W., Kim, J.-K. & Chang, C. H. Clinical characteristics of facial keloids treated with surgical excision followed by intra- and postoperative intralesional steroid injections. *Aesthetic Plast Surg* **36**, 169–173 (2012).
392. Ledon, J. A., Savas, J., Franca, K., Chacon, A. & Nouri, K. Intralesional treatment for keloids and hypertrophic scars: a review. *Dermatol Surg* **39**, 1745–1757 (2013).
393. Chen, T., Kunnavatana, S. S. & Koch, R. J. Effects of mitomycin-C on normal dermal fibroblasts. *Laryngoscope* **116**, 514–517 (2006).
394. Simman, R., Alani, H. & Williams, F. Effect of mitomycin C on keloid fibroblasts: an in vitro study. *Ann Plast Surg* **50**, 71–76 (2003).
395. Seo, S.-H. & Sung, H.-W. Treatment of keloids and hypertrophic scars using topical and intralesional mitomycin C. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **26**, 634–638 (2012).
396. Chi, S. G. *et al.* Ear keloids as a primary candidate for the application of mitomycin C after shave excision: in vivo and in vitro study. *Dermatol Surg* **37**, 168–175 (2011).
397. Gupta, M. & Narang, T. Role of mitomycin C in reducing keloid recurrence: patient series and literature review. *J Laryngol Otol* **125**, 297–300 (2011).
398. Bailey, J. N. R., Waite, A. E., Clayton, W. J. & Rustin, M. H. A. Application of topical mitomycin C to the base of shave-removed keloid scars to prevent their recurrence. *Br J Dermatol* **156**, 682–686 (2007).
399. Stewart, C. E. & Kim, J. Y. Application of mitomycin-C for head and neck keloids. *Otolaryngol Head Neck Surg* **135**, 946–950 (2006).
400. Parker, W. B. & Cheng, Y. C. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol Ther* **48**, 381–395 (1990).

401. Gupta, S. & Kalra, A. Efficacy and safety of intralesional 5-fluorouracil in the treatment of keloids. *Dermatology* **204**, 130–132 (2002).
402. Prabhu, A., Sreekar, H., Powar, R. & Uppin, V. M. A randomized controlled trial comparing the efficacy of intralesional 5-fluorouracil versus triamcinolone acetonide in the treatment of keloids. *Journal of the Scientific Society* **39**, 19 (2012).
403. Aggarwal, H., Saxena, A., Lubana, P. S., Mathur, R. K. & Jain, D. K. Treatment of keloids and hypertrophic scars using bleom. *J Cosmet Dermatol* **7**, 43–49 (2008).
404. Naeini, F. F., Najafian, J. & Ahmadpour, K. Bleomycin tattooing as a promising therapeutic modality in large keloids and hypertrophic scars. *Dermatol Surg* **32**, 1023–1029; discussion 1029-1030 (2006).
405. A surgical approach for earlobe keloid: keloid fillet flap - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15114128/>.
406. Berman, B., Maderal, A. & Raphael, B. Keloids and Hypertrophic Scars: Pathophysiology, Classification, and Treatment. *Dermatol Surg* **43 Suppl 1**, S3–S18 (2017).
407. B, B., Er, G. & Pm, F. Best Reconstructive Techniques: Improving the Final Scar. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]* **41 Suppl 10**, (2015).
408. Barara, M., Mendiratta, V. & Chander, R. Cryotherapy in treatment of keloids: evaluation of factors affecting treatment outcome. *J Cutan Aesthet Surg* **5**, 185–189 (2012).
409. Fracalvieri, M. *et al.* Cryotreatment of keloids: a single Italian institution experience. *Eur J Plast Surg* **39**, 201–206 (2016).
410. Careta, M. F., Fortes, A. C., Messina, M. C. & Maruta, C. W. Combined treatment of earlobe keloids with shaving, cryosurgery, and intralesional steroid injection: a 1-year follow-up. *Dermatol Surg* **39**, 734–738 (2013).
411. Har-Shai, Y. *et al.* Intralesional cryosurgery enhances the involution of recalcitrant auricular keloids: a new clinical approach supported by experimental studies. *Wound Repair Regen* **14**, 18–27 (2006).
412. Dalkowski, A., Fimmel, S., Beutler, C. & Zouboulis, C. C. Cryotherapy modifies synthetic activity and differentiation of keloidal fibroblasts in vitro. *Exp Dermatol* **12**, 673–681 (2003).
413. Niessen, F. B., Spauwen, P. H., Schalkwijk, J. & Kon, M. On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review. *Plast Reconstr Surg* **104**, 1435–1458 (1999).

414. Park, T. H. & Rah, D. K. Successful eradication of helical rim keloids with surgical excision followed by pressure therapy using a combination of magnets and silicone gel sheeting. *Int Wound J* **14**, 302–306 (2017).
415. Tanaydin, V. *et al.* Management of ear keloids using custom-molded pressure clips: a preliminary study. *Eur J Plast Surg* **37**, 259–266 (2014).
416. Chen, B., Ding, J., Jin, J., Song, N. & Liu, Y. Continuous tension reduction to prevent keloid recurrence after surgical excision: Preliminary experience in Asian patients. *Dermatol Ther* **33**, e13553 (2020).
417. Han, X., Hu, S.-D., Ji, D.-S., Liu, Y. & Zhao, Y.-M. Preliminary clinical observations on autologous cultured skin fibroblasts transplantation in the treatment of keloids: a case report. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **27**, 5410–5414 (2023).
418. Chen, J.-Y. *et al.* An Open-Label, Uncontrolled, Single-Arm Clinical Trial of Tofacitinib, an Oral JAK1 and JAK3 Kinase Inhibitor, in Chinese Patients with Keloid. *Dermatology* 1–10 (2023) doi:10.1159/000532064.
419. Sharma, J. R., Lebeko, M., Kidzeru, E. B., Khumalo, N. P. & Bayat, A. In Vitro and Ex Vivo Models for Functional Testing of Therapeutic Anti-scarring Drug Targets in Keloids. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **8**, 655–670 (2019).
420. Diegelmann, R. F., Cohen, I. K. & McCoy, B. J. Growth kinetics and collagen synthesis of normal skin, normal scar and keloid fibroblasts in vitro. *J Cell Physiol* **98**, 341–346 (1979).
421. Abergel, R. P. *et al.* Biochemical composition of the connective tissue in keloids and analysis of collagen metabolism in keloid fibroblast cultures. *J Invest Dermatol* **84**, 384–390 (1985).
422. Katarzyna, A. *et al.* Analysis of the expression of FAP- α protein in 2D-keloid fibroblast cultures and in 3D models of keloid. *J Cosmet Dermatol* (2021) doi:10.1111/jocd.14667.
423. Calderon, M., Lawrence, W. T. & Banes, A. J. Increased proliferation in keloid fibroblasts wounded in vitro. *J Surg Res* **61**, 343–347 (1996).
424. Colwell, A. S., Phan, T.-T., Kong, W., Longaker, M. T. & Lorenz, P. H. Hypertrophic scar fibroblasts have increased connective tissue growth factor expression after transforming growth factor-beta stimulation. *Plast Reconstr Surg* **116**, 1387–1390; discussion 1391–1392 (2005).
425. Smith, P. *et al.* TGF-beta2 activates proliferative scar fibroblasts. *J Surg Res* **82**, 319–323 (1999).

426. Jones, C. D., Guiot, L., Samy, M., Gorman, M. & Tehrani, H. The Use of Chemotherapeutics for the Treatment of Keloid Scars. *Dermatol Reports* **7**, 5880 (2015).
427. Mikulec, A. A. *et al.* Effect of tamoxifen on transforming growth factor beta1 production by keloid and fetal fibroblasts. *Arch Facial Plast Surg* **3**, 111–114 (2001).
428. Zhang, G.-Y. *et al.* Effect of camptothecin on collagen synthesis in fibroblasts from patients with keloid. *Ann Plast Surg* **63**, 94–99 (2009).
429. Makino, S. *et al.* DHMEQ, a novel NF-kappaB inhibitor, suppresses growth and type I collagen accumulation in keloid fibroblasts. *J Dermatol Sci* **51**, 171–180 (2008).
430. Jeon, H. B. *et al.* Metformin Inhibits Transforming Growth Factor β -Induced Fibrogenic Response of Human Dermal Fibroblasts and Suppresses Fibrosis in Keloid Spheroids. *Ann Plast Surg* (2020) doi:10.1097/SAP.0000000000002574.
431. Tan, J. *et al.* Co-culturing epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on nano-structured titanium surfaces. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **78**, 288–295 (2017).
432. Lim, C. K., Halim, A. S., Yaacob, N. S., Zainol, I. & Noorsal, K. Keloid pathogenesis via *Drosophila* similar to mothers against decapentaplegic (SMAD) signaling in a primary epithelial-mesenchymal in vitro model treated with biomedical-grade chitosan porous skin regenerating template. *J Biosci Bioeng* **115**, 453–458 (2013).
433. Phan, T.-T. *et al.* Differences in collagen production between normal and keloid-derived fibroblasts in serum-media co-culture with keloid-derived keratinocytes. *J Dermatol Sci* **29**, 26–34 (2002).
434. Murao, N. *et al.* Treg-enriched CD4⁺ T cells attenuate collagen synthesis in keloid fibroblasts. *Exp Dermatol* **23**, 266–271 (2014).
435. Plikus, M. V. *et al.* Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science* **355**, 748–752 (2017).
436. Xia, W., Phan, T.-T., Lim, I. J., Longaker, M. T. & Yang, G. P. Complex epithelial-mesenchymal interactions modulate transforming growth factor-beta expression in keloid-derived cells. *Wound Repair Regen* **12**, 546–556 (2004).
437. Ong, C. T. *et al.* mTOR as a potential therapeutic target for treatment of keloids and excessive scars. *Exp Dermatol* **16**, 394–404 (2007).
438. Phan, T. T. *et al.* Smad3 signalling plays an important role in keloid pathogenesis via epithelial-mesenchymal interactions. *J Pathol* **207**, 232–242 (2005).

439. Mukhopadhyay, A. *et al.* Conditioned medium from keloid keratinocyte/keloid fibroblast coculture induces contraction of fibroblast-populated collagen lattices. *Br J Dermatol* **152**, 639–645 (2005).
440. Ong, C. T. *et al.* Epithelial-mesenchymal interactions in keloid pathogenesis modulate vascular endothelial growth factor expression and secretion. *J Pathol* **211**, 95–108 (2007).
441. Li, H., Nahas, Z., Feng, F., Elisseeff, J. H. & Boahene, K. Tissue engineering for in vitro analysis of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of keloid lesions. *JAMA Facial Plast Surg* **15**, 448–456 (2013).
442. Kamamoto, F. *et al.* A wound contraction experimental model for studying keloids and wound-healing modulators. *Artif Organs* **27**, 701–705 (2003).
443. Ehrmann, R. L. & Gey, G. O. The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen. *J Natl Cancer Inst* **16**, 1375–1403 (1956).
444. Bell, E., Ivarsson, B. & Merrill, C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1274–1278 (1979).
445. Sriram, G., Bigliardi, P. L. & Bigliardi-Qi, M. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. *Eur J Cell Biol* **94**, 483–512 (2015).
446. Supp, D. M., Glaser, K., Hahn, J. M., McFarland, K. L. & Boyce, S. T. LETTER TO THE EDITOR Abnormal Responses of Keloid Tissue to Wounding Identified Using In Vitro Model System. *Eplasty* **12**, e19 (2012).
447. Butler, P. D., Ly, D. P., Longaker, M. T. & Yang, G. P. Use of organotypic coculture to study keloid biology. *Am J Surg* **195**, 144–148 (2008).
448. Torkian, B. A. *et al.* Modeling aberrant wound healing using tissue-engineered skin constructs and multiphoton microscopy. *Arch Facial Plast Surg* **6**, 180–187 (2004).
449. Duong, H. S., Zhang, Q., Kobi, A., Le, A. & Messadi, D. V. Assessment of morphological and immunohistological alterations in long-term keloid skin explants. *Cells Tissues Organs* **181**, 89–102 (2005).
450. Milsom, J. P. & Craig, R. D. Collagen degradation in cultured keloid and hypertrophic scar tissue. *Br J Dermatol* **89**, 635–644 (1973).
451. Bagabir, R., Syed, F., Paus, R. & Bayat, A. Long-term organ culture of keloid disease tissue. *Exp Dermatol* **21**, 376–381 (2012).

452. Mendoza-Garcia, J., Sebastian, A., Alonso-Rasgado, T. & Bayat, A. Ex vivo evaluation of the effect of photodynamic therapy on skin scars and striae distensae. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **31**, 239–251 (2015).
453. Yamamoto, T. *et al.* Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* **112**, 456–462 (1999).
454. Cameron, A. M., Adams, D. H., Greenwood, J. E., Anderson, P. J. & Cowin, A. J. A novel murine model of hypertrophic scarring using subcutaneous infusion of bleomycin. *Plast Reconstr Surg* **133**, 69–78 (2014).
455. Estrem, S. A., Domayer, M., Bardach, J. & Cram, A. E. Implantation of human keloid into athymic mice. *Laryngoscope* **97**, 1214–1218 (1987).
456. Yang, D. Y. *et al.* Establishment of a hypertrophic scar model by transplanting full-thickness human skin grafts onto the backs of nude mice. *Plast Reconstr Surg* **119**, 104–109 (2007).
457. Shetlar, M. R., Shetlar, C. L., Hendricks, L. & Kischer, C. W. The use of athymic nude mice for the study of human keloids. *Proc Soc Exp Biol Med* **179**, 549–552 (1985).
458. Chen, J. & Roop, D. R. Genetically engineered mouse models for skin research: taking the next step. *J Dermatol Sci* **52**, 1–12 (2008).
459. Waki, E. Y., Crumley, R. L. & Jakowatz, J. G. Effects of pharmacologic agents on human keloids implanted in athymic mice. A pilot study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **117**, 1177–1181 (1991).
460. Kischer, C. W., Pindur, J., Shetlar, M. R. & Shetlar, C. L. Implants of hypertrophic scars and keloids into the nude (athymic) mouse: viability and morphology. *J Trauma* **29**, 672–677 (1989).
461. Lee, A. R. *et al.* Establishment of a humanized mouse model of keloid diseases following the migration of patient immune cells to the lesion: Patient-derived keloid xenograft (PDKX) model. *Exp Mol Med* (2023) doi:10.1038/s12276-023-01045-6.
462. Shang, T. *et al.* A novel model of humanised keloid scarring in mice. *International Wound Journal* **15**, 90–94 (2018).
463. Sunaga, A. *et al.* Reconstitution of Human Keloids in Mouse Skin. *Plast Reconstr Surg Glob Open* **5**, e1304 (2017).
464. Wang, H. & Luo, S. Establishment of an animal model for human keloid scars using tissue engineering method. *J Burn Care Res* **34**, 439–446 (2013).

465. Yagi, Y. *et al.* An ex vivo model employing keloid-derived cell-seeded collagen sponges for therapy development. *J Invest Dermatol* **133**, 386–393 (2013).
466. Pines, M. & Spector, I. Halofuginone - the multifaceted molecule. *Molecules* **20**, 573–594 (2015).
467. Pines, M., Snyder, D., Yarkoni, S. & Nagler, A. Halofuginone to treat fibrosis in chronic graft-versus-host disease and scleroderma. *Biol Blood Marrow Transplant* **9**, 417–425 (2003).
468. Pines, M. *et al.* Reduction in dermal fibrosis in the tight-skin (Tsk) mouse after local application of halofuginone. *Biochem Pharmacol* **62**, 1221–1227 (2001).
469. Zion, O. *et al.* Inhibition of transforming growth factor beta signaling by halofuginone as a modality for pancreas fibrosis prevention. *Pancreas* **38**, 427–435 (2009).
470. Nagler, A. *et al.* Reduction in pulmonary fibrosis in vivo by halofuginone. *Am J Respir Crit Care Med* **154**, 1082–1086 (1996).
471. Pines, M. Targeting TGF β signaling to inhibit fibroblast activation as a therapy for fibrosis and cancer: effect of halofuginone. *Expert Opin Drug Discov* **3**, 11–20 (2008).
472. Lista, S. & Emanuele, E. Potential therapeutical effects of topical halofuginone hydrobromide in keloid management. *Med Hypotheses* **69**, 707 (2007).
473. Białkowska, K., Komorowski, P., Bryszewska, M. & Miłowska, K. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures-Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *Int J Mol Sci* **21**, 6225 (2020).
474. Ryu, N.-E., Lee, S.-H. & Park, H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells* **8**, 1620 (2019).
475. Rodrigues, M. & Bonham, C. A. Macrophage Plasticity in Skin Fibrosis. in *Fibrosis in Disease: An Organ-Based Guide to Disease Pathophysiology and Therapeutic Considerations* (eds. Willis, M. S., Yates, C. C. & Schisler, J. C.) 61–87 (Springer International Publishing, 2019). doi:10.1007/978-3-319-98143-7_3.
476. Shaker, S. A., Ayuob, N. N. & Hajrah, N. H. Cell talk: a phenomenon observed in the keloid scar by immunohistochemical study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **19**, 153–159 (2011).
477. Song, E. *et al.* Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell. Immunol.* **204**, 19–28 (2000).

478. Kim, H. *et al.* Exosome-Guided Phenotypic Switch of M1 to M2 Macrophages for Cutaneous Wound Healing. *Advanced Science* **6**, 1900513 (2019).
479. EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O. & Wood, M. J. A. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 347–357 (2013).
480. Brigstock, D. R. Extracellular Vesicles in Organ Fibrosis: Mechanisms, Therapies, and Diagnostics. *Cells* **10**, 1596 (2021).
481. Wang, Y. *et al.* Macrophage-derived extracellular vesicles: diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases. *Cell Death Dis* **11**, 1–18 (2020).
482. Granato, G. *et al.* Generation and analysis of spheroids from human primary skin myofibroblasts: an experimental system to study myofibroblasts deactivation. *Cell Death Discov.* **3**, 1–10 (2017).
483. Kunz-Schughart, L. A., Wenninger, S., Neumeier, T., Seidl, P. & Knuechel, R. Three-dimensional tissue structure affects sensitivity of fibroblasts to TGF- β 1. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **284**, C209–C219 (2003).
484. Suarez, E. *et al.* Skin equivalent tensional force alters keloid fibroblast behavior and phenotype. *Wound Repair Regen* **22**, 557–568 (2014).
485. Wong, V. W. *et al.* Focal adhesion kinase links mechanical force to skin fibrosis via inflammatory signaling. *Nat Med* **18**, 148–152 (2011).
486. Driscoll, T. P. *et al.* Integrin-based mechanosensing through conformational deformation. *Biophys J* **120**, 4349–4359 (2021).
487. Suarez, E., Syed, F., Alonso-Rasgado, T., Mandal, P. & Bayat, A. Up-regulation of tension-related proteins in keloids: knockdown of Hsp27, α 2 β 1-integrin, and PAI-2 shows convincing reduction of extracellular matrix production. *Plast Reconstr Surg* **131**, 158e–173e (2013).
488. Szulgit, G. *et al.* Alterations in Fibroblast α 1 β 1 Integrin Collagen Receptor Expression in Keloids and Hypertrophic Scars. *Journal of Investigative Dermatology* **118**, 409–415 (2002).
489. Feng, F. *et al.* Biomechanical Regulatory Factors and Therapeutic Targets in Keloid Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology* **13**, (2022).

490. Rybarczyk, B. J., Lawrence, S. O. & Simpson-Haidaris, P. J. Matrix-fibrinogen enhances wound closure by increasing both cell proliferation and migration. *Blood* **102**, 4035–4043 (2003).
491. Greiling, D. & Clark, R. A. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J Cell Sci* **110 (Pt 7)**, 861–870 (1997).
492. Li, X. *et al.* Human dermal fibroblast migration induced by fibronectin in autocrine and paracrine manners. *Exp Dermatol* **23**, 682–684 (2014).
493. Kuhn, C. *et al.* An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* **140**, 1693–1703 (1989).
494. Valiente-Alandi, I. *et al.* Inhibiting Fibronectin Attenuates Fibrosis and Improves Cardiac Function in a Model of Heart Failure. *Circulation* **138**, 1236–1252 (2018).
495. Frangogiannis, N. G. Fibroblast—Extracellular Matrix Interactions in Tissue Fibrosis. *Curr Pathobiol Rep* **4**, 11–18 (2016).
496. Tan, Y. *et al.* Human fibroblast-macrophage tissue spheroids demonstrate ratio-dependent fibrotic activity for in vitro fibrogenesis model development. *Biomater Sci* **8**, 1951–1960 (2020).
497. Liu, J. *et al.* CTHRC1+ fibroblasts are stimulated by macrophage-secreted SPP1 to induce excessive collagen deposition in keloids. *Clin Transl Med* **12**, e1115 (2022).
498. Yu, X., Guo, C., Fisher, P. B., Subjeck, J. R. & Wang, X.-Y. Chapter Nine - Scavenger Receptors: Emerging Roles in Cancer Biology and Immunology. in *Advances in Cancer Research* (eds. Wang, X.-Y. & Fisher, P. B.) vol. 128 309–364 (Academic Press, 2015).
499. Cai, B. *et al.* MerTK signaling in macrophages promotes the synthesis of inflammation resolution mediators by suppressing CaMKII activity. *Sci Signal* **11**, eaar3721 (2018).
500. She, Y. *et al.* Elevated expression of macrophage MERTK exhibits profibrotic effects and results in defective regulation of efferocytosis function in pulmonary fibrosis. *Respiratory Research* **24**, 118 (2023).
501. Zhao, S.-X. *et al.* CD14+ monocytes and CD163+ macrophages correlate with the severity of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Exp Ther Med* **20**, 228 (2020).
502. Rudnik, M. *et al.* Elevated Fibronectin Levels in Profibrotic CD14+ Monocytes and CD14+ Macrophages in Systemic Sclerosis. *Front Immunol* **12**, 642891 (2021).

503. Wynn, T. A., Chawla, A. & Pollard, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **496**, 445–455 (2013).
504. Schultze, J. L., Schmieder, A. & Goerdts, S. Macrophage activation in human diseases. *Semin Immunol* **27**, 249–256 (2015).
505. Bart, V. M. T., Pickering, R. J., Taylor, P. R. & Ipseiz, N. Macrophage reprogramming for therapy. *Immunology* **163**, 128–144 (2021).
506. Sharifiaghdam, M. *et al.* Macrophage reprogramming into a pro-healing phenotype by siRNA delivered with LBL assembled nanocomplexes for wound healing applications. *Nanoscale* **13**, 15445–15463 (2021).
507. Xu, X. *et al.* The role of macrophages in the formation of hypertrophic scars and keloids. *Burns Trauma* **8**, tkaa006 (2020).
508. Gunassekaran, G. R., Poongkavithai Vadevoo, S. M., Baek, M.-C. & Lee, B. M1 macrophage exosomes engineered to foster M1 polarization and target the IL-4 receptor inhibit tumor growth by reprogramming tumor-associated macrophages into M1-like macrophages. *Biomaterials* **278**, 121137 (2021).
509. Chen, P. *et al.* Targeted heart repair by T β 4-loaded cardiac-resident macrophage-derived extracellular vesicles modified with monocyte membranes. *Acta Biomater* S1742-7061(23)00484–1 (2023) doi:10.1016/j.actbio.2023.08.022.
510. Liu, J. *et al.* Wnt4 negatively regulates the TGF- β 1-induced human dermal fibroblast-to-myofibroblast transition via targeting Smad3 and ERK. *Cell Tissue Res* **379**, 537–548 (2020).
511. Cianfruglia, L., Minnelli, C., Laudadio, E., Scirè, A. & Armeni, T. Side Effects of Curcumin: Epigenetic and Antiproliferative Implications for Normal Dermal Fibroblast and Breast Cancer Cells. *Antioxidants (Basel)* **8**, 382 (2019).
512. Wang, Y. *et al.* Effect of mitomycin on normal dermal fibroblast and HaCat cell: an in vitro study. *J Zhejiang Univ Sci B* **13**, 997–1005 (2012).
513. Dachlan, I. *et al.* The effect of platelet-rich fibrin on normal dermal fibroblast proliferation after mitomycin-c treatment: An in vitro study. *Ann Med Surg (Lond)* **62**, 473–476 (2021).
514. Brun, C. *et al.*



Titre : Régulation de l'axe inflammation-fibrose pour la prévention et le traitement de la maladie chéloïdienne

Mots clés : chéloïde, fibrose, inflammation, macrophage, fibroblaste, sphéroïde

Résumé : La maladie chéloïdienne désigne une fibrose cutanée pseudo-tumorale, résultant d'un processus de cicatrisation dérégulé et en lien avec un état inflammatoire chronique. Du fait du manque de compréhension des mécanismes impliqués dans leur pathogénèse, le traitement des chéloïdes est encore aujourd'hui un problème de santé publique majeur.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons suivi deux objectifs principaux. Le premier était de construire un modèle tridimensionnel d'étude de la fibrogénicité du fibroblaste de chéloïde. Le second était d'évaluer l'impact de la polarisation du macrophage et de son sécrétome sur cette fibrogénicité.

Dans la première partie de nos travaux, nous avons développé un modèle tridimensionnel de chéloïde sous forme de sphéroïdes, composés uniquement de fibroblastes de chéloïdes (FC). Ce modèle, même s'il s'annonçait prometteur pour l'étude *in vitro* de la fibrose chéloïdienne, s'est révélé être plus proche d'un modèle de désactivation des fibroblastes que d'un réel modèle de fibrogénèse.

Dans la seconde partie, nous avons investigué l'impact différentiel des macrophages de sous-type M1 et M2 sur les fibroblastes de chéloïdes.

Nous avons démontré pour la première fois *in vitro* que le sécrétome de macrophages de type M1 possède une forte activité anti-fibrotique. Nous avons également montré que le sécrétome des macrophages de type M2, qui sont présents en quantités importantes dans les chéloïdes, possède des propriétés pro-fibrotiques. Ainsi, nos travaux soutiennent d'une part le rôle central du macrophage de type M2 dans la mise en place de la fibrose chéloïdienne, et plus généralement celui du déséquilibre M1/M2. D'autre part, l'effet du sécrétome de macrophage de type M1 sur la fibrogénèse des fibroblastes de chéloïdes nous conduit à proposer le macrophage comme levier majeur dans la régulation de l'axe inflammation-fibrose pour prévenir ou traiter la maladie chéloïdienne. Ces nouvelles données expérimentales ouvrent ainsi la voie vers le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques centrées sur l'environnement inflammatoire et immunitaire du fibroblaste chéloïdien.

Title : Regulation of inflammation-fibrosis axis to prevent and treat keloid disease

Keywords : keloid, fibrosis, inflammation, macrophage, fibroblast, spheroids

Abstract : Keloid disease is a pseudo-tumoral and fibrotic skin disorder resulting from a dysregulation of the wound healing process. Because of our poor understanding of the mechanisms leading to their pathogenesis, the treatment of keloids is still a major public health problem.

During this thesis work, we followed two main objectives. The first was to build a three-dimensional model to study the fibrogenicity of keloid fibroblast. The second was to evaluate the impact of macrophage polarization and its secretome on keloid fibroblasts fibrogenicity.

In the first part, we developed a spheroid 3D keloid model, composed of keloid fibroblasts (KF). This model was a promising tool to model *in vitro* keloid structure, but it unfortunately turned out to be closer to a fibroblast deactivation model than to a real fibrogenic one. In the second part, we investigated the differential impact of M1 and M2 macrophages subsets on keloid fibroblasts.

We demonstrated for the first time that the M1 secretome has a major anti-fibrotic activity. In accordance with previous work about M2 persistence in keloid tissue, we have also shown that M2 secretome strongly contributes to fibrogenesis. Thus, our work supports the central role of the M2 type macrophage in the establishment of keloid fibrosis, and more generally that of the M1/M2 imbalance. Moreover, the effect of the M1 secretome on fibroblasts fibrogenesis leads us to propose macrophages as a major lever to regulate the inflammation-fibrosis axis to prevent or treat keloid.

These new experimental data open the way towards the development of new therapeutic strategies focused on the inflammatory and immune environment of keloidal fibroblasts.