

# EFFET DU PANSEMENT CELLOSORB® NA MICROADHÉRENT SUR LA PROLIFÉRATION DES FIBROBLASTES *IN VITRO*

F.X. BERNARD<sup>1</sup>, F. JUCHAUX<sup>2</sup>, M. BOUSCHBACHER<sup>3</sup>

1. PhD, Directeur scientifique BIOalternatives. 1 bis rue des plantes, 86160 Gençay, France.

2. Directeur d'étude BIOalternatives. 1 bis rue des plantes, 86160 Gençay, France.

3. PhD, Responsable projets de recherche. Laboratoires URGO, 42 rue de Longvic, 21300 Chenôve, France.

**Mots clés :** TLC Contact, fibroblastes, prolifération cellulaire.

**Key words:** TLC Contact, fibroblasts, cellular proliferation.

## → RÉSUMÉ

Lors de la cicatrisation cutanée, les fibroblastes migrent au sein de la zone lésionnelle, prolifèrent et synthétisent la matrice extra-cellulaire pour former le tissu de granulation. Puis les fibroblastes se différencient *in situ* en myofibroblastes, qui grâce à leurs propriétés contractiles, permettent la contraction du tissu de granulation et ainsi le rapprochement des berges de la plaie. Le but de cette étude a donc été d'évaluer le comportement de la TLC Contact, composant le nouveau Cellosorb® NA microadhérent, sur les fibroblastes *in vitro*, en analysant plus particulièrement son effet sur la prolifération de fibroblastes dermiques humains normaux (NHDF) en culture. Matériel et méthodes : Les NHDF ont été cultivés en DMEM 10 % sérum. La TLC Contact a été appliquée sur les tapis cellulaires durant 24, 48 et 72 heures. La cytotoxicité a été évaluée par un test MTT, et la prolifération cellulaire par incorporation de thymidine tritiée. Les effets sur l'ultrastructure des cellules ont été analysés par microscopie laser confocale. Résultats : La TLC Contact ne présente aucune cytotoxicité cellulaire à 24, 48 et 72 heures. Par ailleurs, la TLC Contact stimule significativement la prolifération des fibroblastes en culture et ce à 24, 48 et 72 heures. Ce résultat est confirmé par l'observation en microscopie laser confocale de nombreuses cellules en division. Conclusion : Ce travail a permis d'établir que le nouveau pansement Cellosorb® NA micro-adhérent, grâce à sa TLC Contact, stimule la prolifération des fibroblastes humains *in vitro*, activité clé pour garantir une cicatrisation optimale *in vivo*.

## EFFECT OF THE NEW CELLOSORB® MICROADHERENT DRESSING ON THE PROLIFERATION OF FIBROBLASTS *IN VITRO*

### → ABSTRACT

During the course of wound healing, fibroblasts migrate within the wound zone, proliferate and synthesise the extracellular matrix to form granulation tissue. Then the fibroblasts differentiate *in situ* into myofibroblasts, which, thanks to their contractile properties, enable contraction of the granulation tissue and bring together the wound margins. The aim of this study was therefore to assess the behaviour of TLC Contact, a component of the new micro-adherent absorbent dressing Urgocell Contact, on fibroblasts *in vitro* by analyzing more specifically its effect on the proliferation of normal human dermal fibroblasts (NHDF). Material and methods: NHDF were cultivated in 10% serum DMEM. TLC Contact was applied to the cell layers for 24, 48 and 72 hours. Cytotoxicity was evaluated by an MTT test, and cell proliferation by incorporation of tritiated thymidine. The effects on fibroblasts' ultrastructure were analyzed using confocal laser microscopy. Results: TLC Contact does not present any cell cytotoxicity after 24, 48 and 72 hours. In addition, TLC Contact significantly stimulates fibroblasts' proliferation after 24, 48 and 72 hours of culture. This result is confirmed by the observation of numerous dividing cells in confocal laser microscopy. Conclusion: This study established that the new micro-adherent absorbent dressing Urgocell Contact, thanks to the presence of the TLC Contact, stimulates the proliferation of human fibroblasts *in vitro*, a key activity for guaranteeing optimum healing *in vivo*.

## INTRODUCTION

La cicatrisation est un processus biologique complexe mettant en jeu des interactions entre des cellules de l'épiderme et du derme, coordonné par un ensemble de cytokines et facteurs de croissance. Une des phases clés du processus de cicatrisation est la formation du tissu de granulation. La formation de ce

tissu est nécessaire au comblement du site lésé. En effet, lors de cette phase, les fibroblastes migrent au sein de la zone lésée, prolifèrent puis synthétisent la matrice extracellulaire pour former le tissu de granulation. Puis, les fibroblastes se différencient *in situ* en myofibroblastes, permettant la contraction de ce tissu de granulation et ainsi le rappro-

chement des berges de la plaie [1,2]. Lors de travaux précédents, il a été démontré que Urgotul®, grâce à sa technologie lipido-colloïde TLC, était capable de stimuler la prolifération de fibroblastes dermiques humains normaux cultivés en monocouche. Une nouvelle technologie issue de la TLC, la TLC Contact, composant du nouveau pansement Cellosorb® NA

microadhérent, a été développée. L'effet de cette TLC Contact sur la prolifération des fibroblastes humains a donc été examiné, de manière à confirmer que cette technologie TLC Contact présente les mêmes propriétés pro-cicatrisantes que la TLC d'Urgotul®.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Culture cellulaire

Des fibroblastes dermiques humains normaux (NHDF) ont été cultivés en DMEM (Dubecco's modified Eagle's medium) supplémenté de 10% de serum de veau foetal, 2mM de glutamine et 50 UI/ml de pénicilline. Dans tous les tests, la TLC Contact a été appliquée sur les tapis cellulaires pendant les temps définis (24, 48 ou 72 heures) et maintenue à l'aide d'un petit bouchon plastique. Des témoins sans pansement (avec un petit bouchon de plastique) ont été également réalisés.

### Viabilité cellulaire

Les NHDF ont été cultivés jusqu'à confluence dans des plaques de culture de 12 puits. A la fin de la période d'incubation avec la TLC Contact (24, 48 et 72 heures), l'activité métabolique des cultures a été mesurée grâce à un test MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl-tetrazolium bromide).

### Prolifération cellulaire

Les NHDF ont été cultivés jusqu'à confluence moyenne (environ 60%) dans des plaques de culture de 12 puits avant application de la TLC Contact. Pour chaque temps d'incubation, la thymidine tritiée ([méthyl-3H]-thymidine, 100 µCi/ml final) a été ajoutée pendant les 24 heures dernières heures d'incubation. L'ADN des tapis cellulaires a été extrait, et purifié puis la radioactivité incorporée dans l'ADN a été comptée à l'aide d'un compteur à scintillation (chaque condition a été répétée 3 fois, sur 3 lots différents de TLC Contact).

### Microscopie confocale laser

Les NHDF ont été ensemencés dans des chambres de culture Labtek™ à densité moyenne (60% de confluence). La TLC Contact a été appliquée comme décrit précédemment durant 48 et 72 heures. Après incubation, les tapis cellulaires ont

été fixés par du Tris Buffer Saline (TBS)-4% paraformaldehyde, puis perméabilisés par du TBS-0,1% Triton X100. Les sites non spécifiques ont été saturés par un lavage en TBS-0,5% Serum Albumine Bovine. L'α-tubuline a été reconnue par l'anticorps monoclonal anti-α-tubulin puis révélée par l'anticorps secondaire chèvre anti-souris couplé fluores-

ceine isothiocyanate. La β-actine a été marquée par la sonde phalloïdine Alexa Fluor 680. Les images ont été observées sur un microscope confocale laser Bio-Rad MRC 1024.

### Analyse statistique

Les comparaisons intergroupe ont été réalisées à l'aide d'un test de Student (\* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

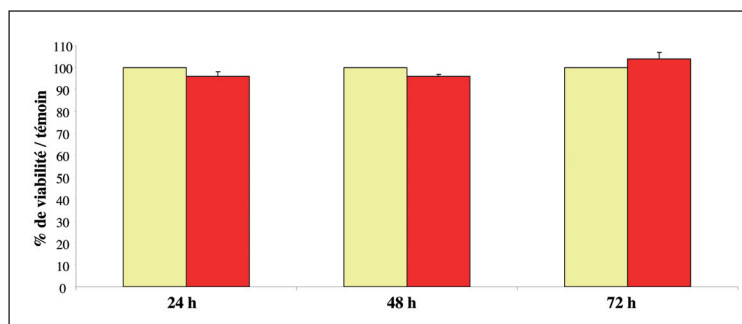


Figure 1: Effet de la TLC Contact sur la viabilité des fibroblastes dermiques humains normaux en culture. En jaune les conditions témoins, en rouge les conditions TLC Contact (n=6 pour chaque condition).

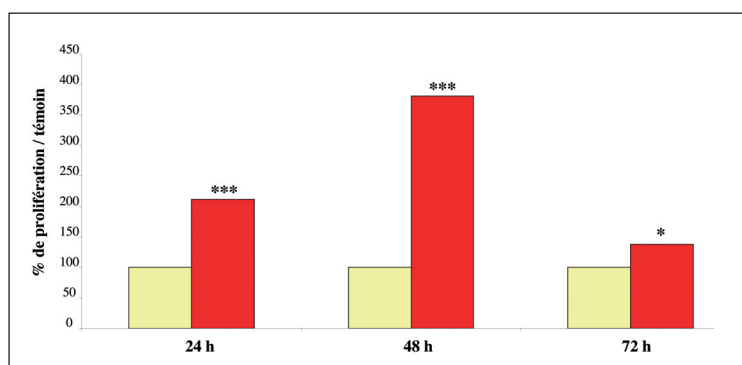


Figure 2: Effet de la TLC Contact sur la prolifération des fibroblastes dermiques humains normaux en culture. En jaune les conditions témoins, en rouge les conditions TLC Contact (n=3 pour chaque condition). \* =  $p < 0,05$  \*\*\* =  $p < 0,001$

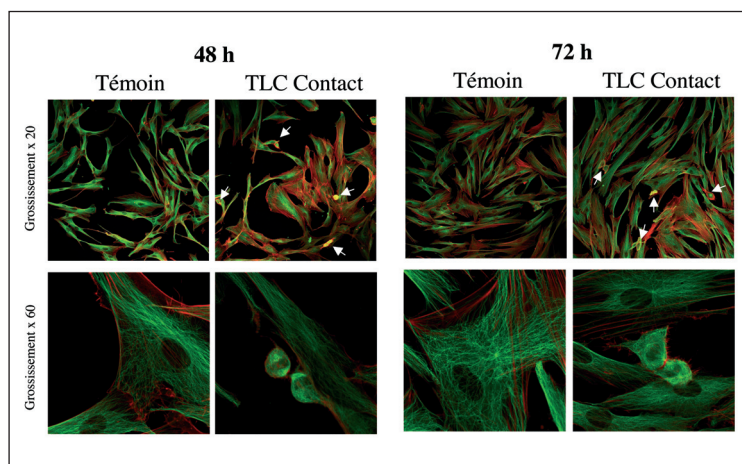


Figure 3: Ultrastructure des fibroblastes dermiques humains normaux en microscopie confocale laser. En vert le marquage de l'α-tubuline et en rouge de la β-actine. Les flèches blanches indiquent les cellules en division.

## RÉSULTATS

### Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire des fibroblastes dermiques humains normaux a été évaluée sur cultures de NHDF confluents (cellules non prolifératives), grâce à un test MTT. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au témoin (contrôle sans pansement mais avec un bouchon de plastique). Comme présenté dans la Figure 1, la TLC Contact ne modifie pas la viabilité des NHDF en culture, et ce quelque soit la durée du traitement.

### Prolifération cellulaire

L'effet de la TLC Contact sur la prolifération des fibroblastes *in vitro* a été évalué par la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des fibroblastes en réplication non confluents. Comme le montre la Figure 2, la présence de la TLC Contact stimule la prolifération des NHDF en culture de manière très significative à 24, 48 et 72 heures. Ces résultats ont été confirmés avec d'autres lots de TLC Contact (résultats non montrés ici).

### Morphologie cellulaire et structure

L'effet de la TLC Contact sur la morphologie et l'ultrastructure des NHDF a été évalué après immunomarquage de la  $\beta$ -actine et de l' $\alpha$ -tubuline, composants du cytosquelette cellulaire, par microscopie confocale laser. La morphologie des

fibroblastes traités par la TLC Contact est normale, de même que la distribution du cytosquelette, comme le révèlent les marquages de la  $\beta$ -actine et de l' $\alpha$ -tubuline (Figure 3). De plus, la présence de nombreuses cellules en division est observée dans les cultures traitées par la TLC Contact à 48 et 72 heures (visualisées par des flèches blanches), confirmant que la TLC Contact stimule la prolifération des NHDF *in vitro*.

## CONCLUSION ET DISCUSSION

La TLC Contact est une nouvelle interface microadhérente issue de la technologie lipido-colloïde des Laboratoires URGO, interface composant le nouveau pansement absorbant Cellosorb® NA microadhérent. Cette TLC Contact ne modifie pas la viabilité cellulaire de fibroblastes dermiques humains normaux en culture et stimule nettement leur prolifération. En effet, les résultats d'incorporation de thymidine tritiée et d'observations en microscopie confocale laser démontrent que la TLC Contact active la prolifération des fibroblastes à 24, 48 et 72h. Cette nouvelle interface possède ainsi les mêmes propriétés pro-cicatrisantes que la TLC des pansements Urgotul®, i.e. un effet activateur de la prolifération des fibroblastes en culture *in vitro* [3]. Une autre phase importante dans le processus de cicatrisation est la synthèse de nouvelle matrice extra-cellulaire, nécessaire à la reformation

du tissu dermique lésé. Comme il a été démontré pour la TLC d'Urgotul® [4], il serait intéressant de poursuivre ce travail par l'analyse de l'effet de la TLC Contact sur la synthèse de composants de la matrice extra-cellulaire tels que la fibronectine, le collagène I ou des glycosaminoglycans. Les propriétés pro-cicatrisantes des technologies TLC, démontrées par des études *in vitro* sur culture de fibroblastes dermiques humains normaux, représentent des activités essentielles pour garantir une cicatrisation optimale *in vivo*, comme observé aujourd'hui en clinique [5]. ■

## Références

- [1] KERSTEIN MD. The scientific basis of healing. *Adv Skin Wound Care* 1997; 10:3, 30-36.
- [2] MENKE NB. Impaired wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 25:1, 19-25.
- [3] BERNARD FX. Stimulation of the proliferation of human dermal fibroblasts *in vitro* by a lipidocolloid dressing. *J Wound Care* 2005; 14, 215-220.
- [4] BERNARD FX. Effets d'un pansement lipidocolloïde sur la production de matrice extracellulaire par des fibroblastes dermiques humains *in vitro*. *JPC* 58,9-11.
- [5] BENBOW M. A clinical evaluation of Urgotul® to treat acute and chronic wounds. *British J Nursing* 13:2, 105-109.