

# Citraconic anhydride as a new antigen retrieval solution A human skin experience

**Gwenaël ROLIN**<sup>1,2</sup>, Marie KROEMER<sup>2</sup>, Céline VIENNET<sup>2</sup>, Hélène TAUZIN<sup>3</sup>

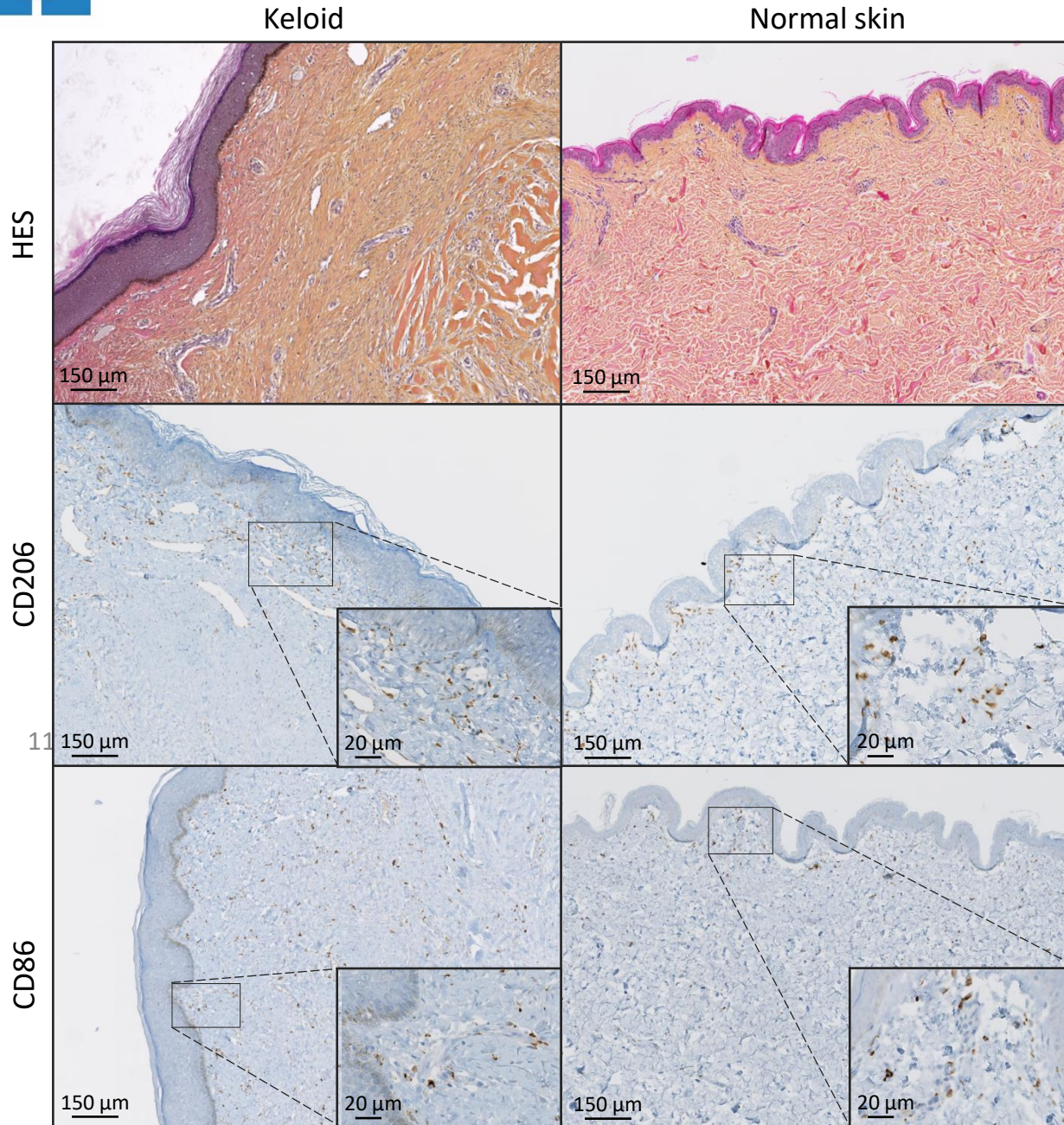
<sup>1</sup> INSERM CIC-1431, CHU Besançon, F-25000 Besançon, France

<sup>2</sup> Univ. Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, RIGHT Interactions Greffon-Hôte- Tumeur / Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000, Besançon, France

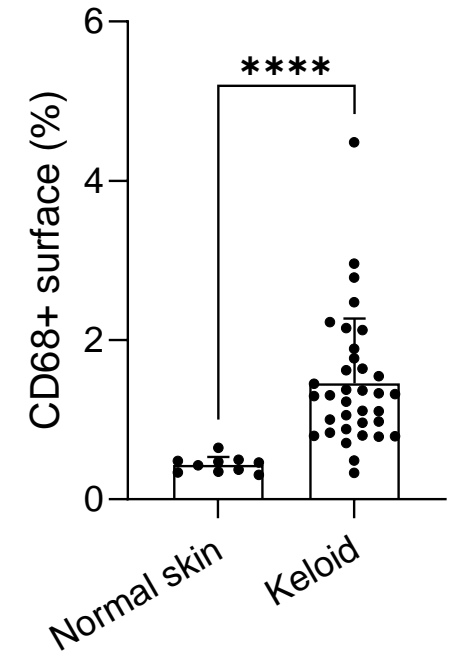
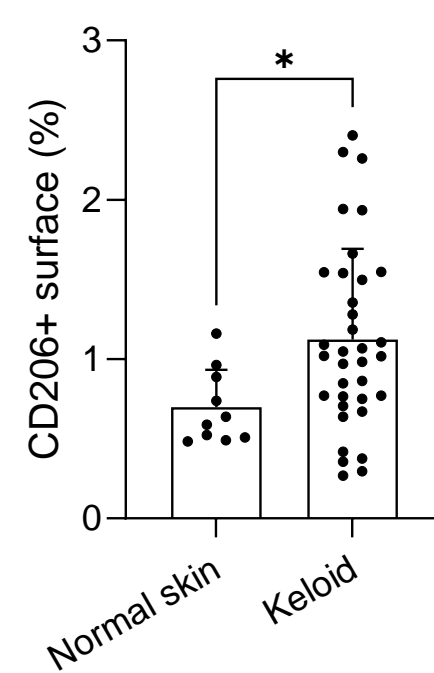
<sup>3</sup> Département de cardiologie, CHU Besançon, F-25000 Besançon, France

- Chéloïde
- Fibrose cutanée
- Inflammatoire chronique
- Pseudo cancéreuse





- Chéloïde
- Fibrose cutanée
- Inflammatoire chronique
- Pseudo cancéreuse

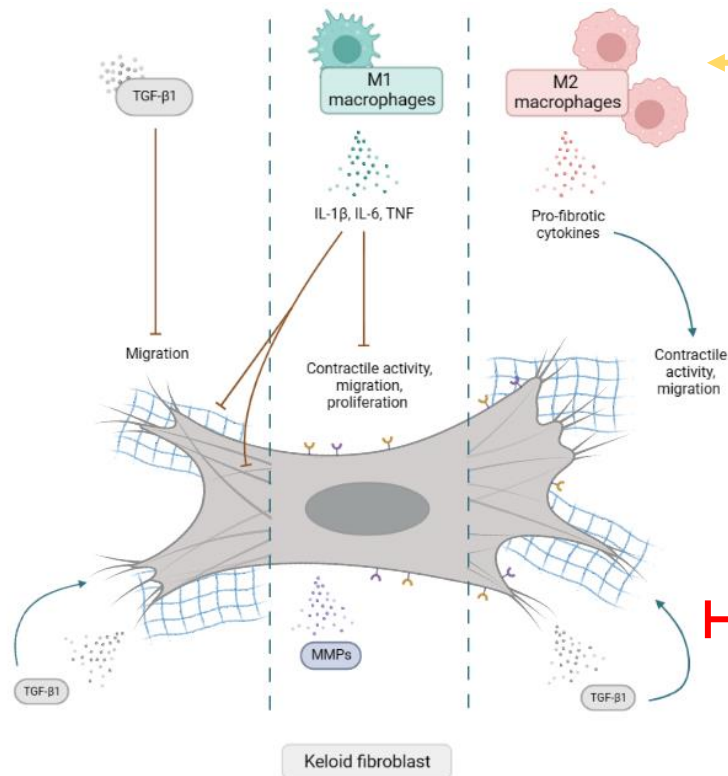
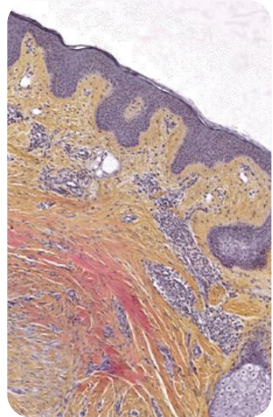


**Preuve de concept *in vivo* du rôle potentiel des macrophage M2 dans la mise en place de la fibrose chéloïde**

# LA RESOLUTION DE L'INFLAMMATION POUR TRAITER LA FIBROSE TISSULAIRE



Chéloïde



## Approche biologique: polarisation du macrophage

- Régulation du phénotype des fibroblastes pathologiques f° (polarisation des macrophages)
- Evaluation des sécrétomes de sous-types de M<sub>2</sub>

## Approche pharmacologique: contrôle du fibroblaste

- Screening de nouvelles drogues anti-fibrotiques (vs TGF- $\beta$ )
- Evaluation de l'halofuginone
- Evaluation d'inhibiteurs d'arginase

## 2 financements majeurs

**FIBROLUTION** - Cibler la reprogrammation des macrophages pour résoudre la fibrose

**S-Keloïd** - Comprendre la maladie chéloïde : Une approche multi-échelle in vitro/in vivo/in silico

REGION  
BOURGOGNE  
FRANCHE  
COMTE

anr

3 articles originaux / 1 thèse de sciences / 1 thèse d'exercice / 2 thèses en cours de co-encadrement

Marty P, et al., *Biomed Pharmacother.* 2021

Chambert, J et al., *J Mech Behav Biomed Mater*, 2019

Suttho, D., et al., *Arch. Dermatol. Res.*, 2017

3 articles en préparation

AFH - Dijon

Collaborations principales  
France – Luxembourg – Italie

femto-st  
SCIENCES &  
TECHNOLOGIES

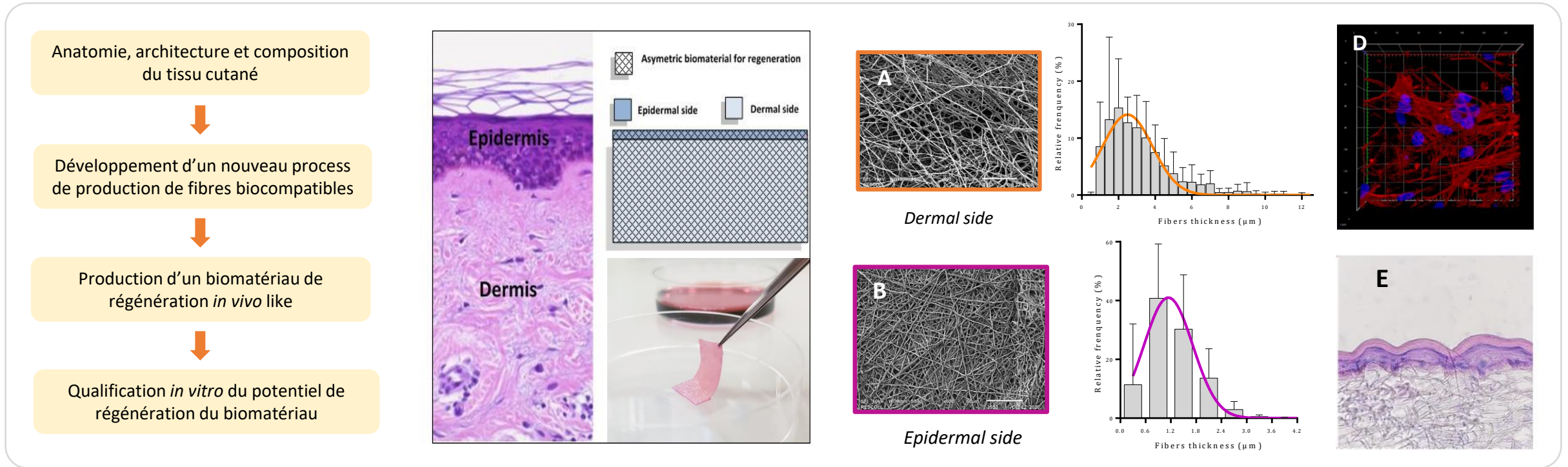
UPO

(Lm<sup>B</sup>)

UNIVERSITÉ DU  
LUXEMBOURG

## Dermatologie

➔ Rétro-engineering de la peau pour la production d'un biomatériau de régénération



### 3 financements majeurs

**Mecaskin** - Clinical Feasibility of an ATMP Preparation for Autologous Skin Regeneration in Case of Chronic Leg Ulcers

**TissYou (1)** - Développement technologique d'un biomatériau innovant pour la médecine régénératrice

**TissYou (2)** - Industrial production of a biomimetic matrix for cutaneous regenerative medicine and in vitro research



### Valorisation

Rolin *et al.*, Skin Res Technol, 2012 ;

Rolin *et al.*, J Biomech, 2014,

Rolin *et al.*, Biodevices, 2023;

2 articles en préparation, 1 nouveau brevet à venir

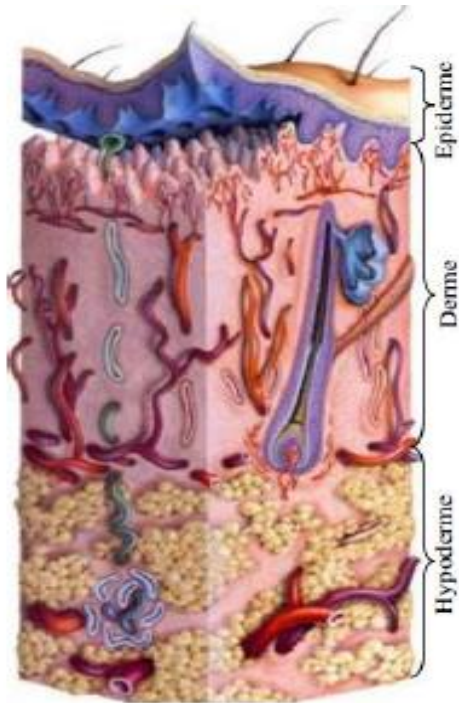
### Collaborations principales

France – Belgique – Autriche



Ludwig Boltzmann Institute  
Experimental and Clinical Traumatology

# Structure de la peau humaine : généralités



Coupe de peau  
d'après Géras, In Dermatology, 1990

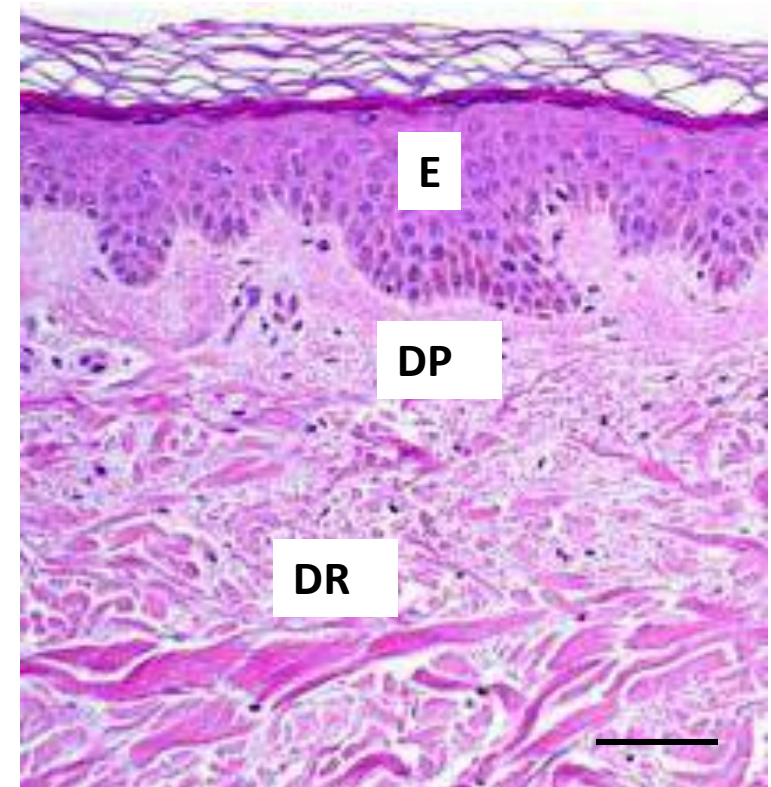
## **Epiderme: Fonction de protection**

- Protection (couche cornée)
- Cellules de Merkel (Sensibilité)
- Mélanocytes (Photoprotection)
- Cellules de Langerhans (immunoprotection)

## **Derme: Tissu de soutien et Nourricier**

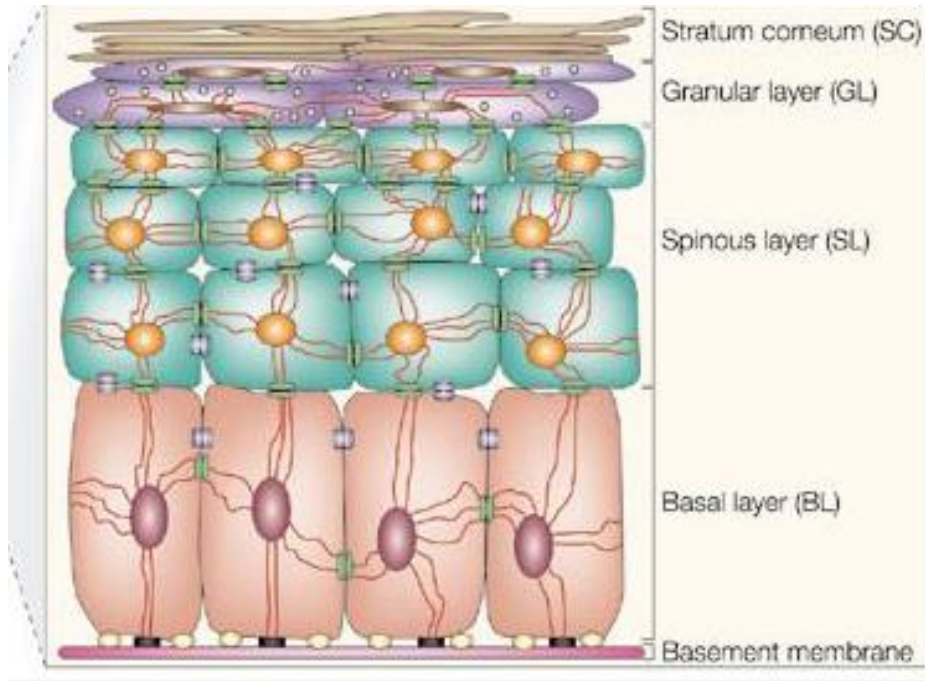
- Matrice extracellulaire : Propriétés mécaniques
- Fibroblastes:
  - synthèse et remodelage matriciel
  - Croissance et différenciation des kératinocytes
- Sensibilité
- Vascolarisation (apports de nutriments)

**Hypoderme** : Propriétés mécaniques et thermiques

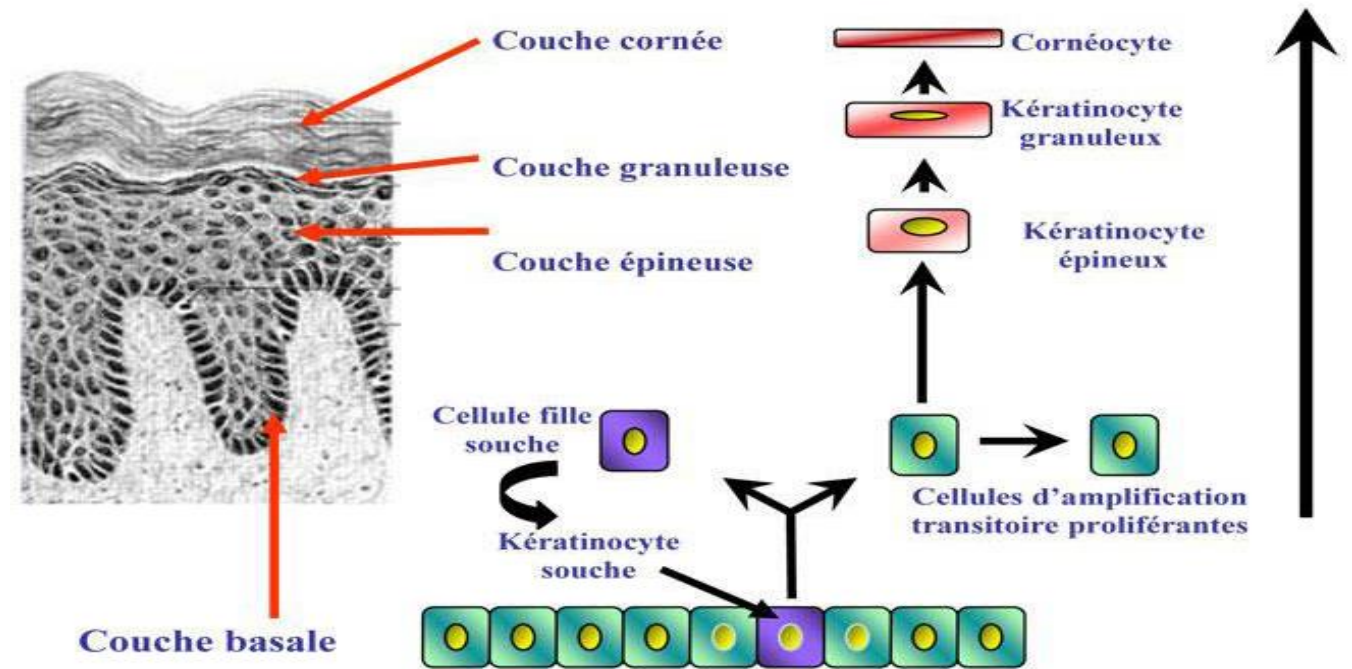


***E: épiderme / DP: derme papillaire / DR: derme réticulaire***

# Structure de la peau humaine: l'épiderme

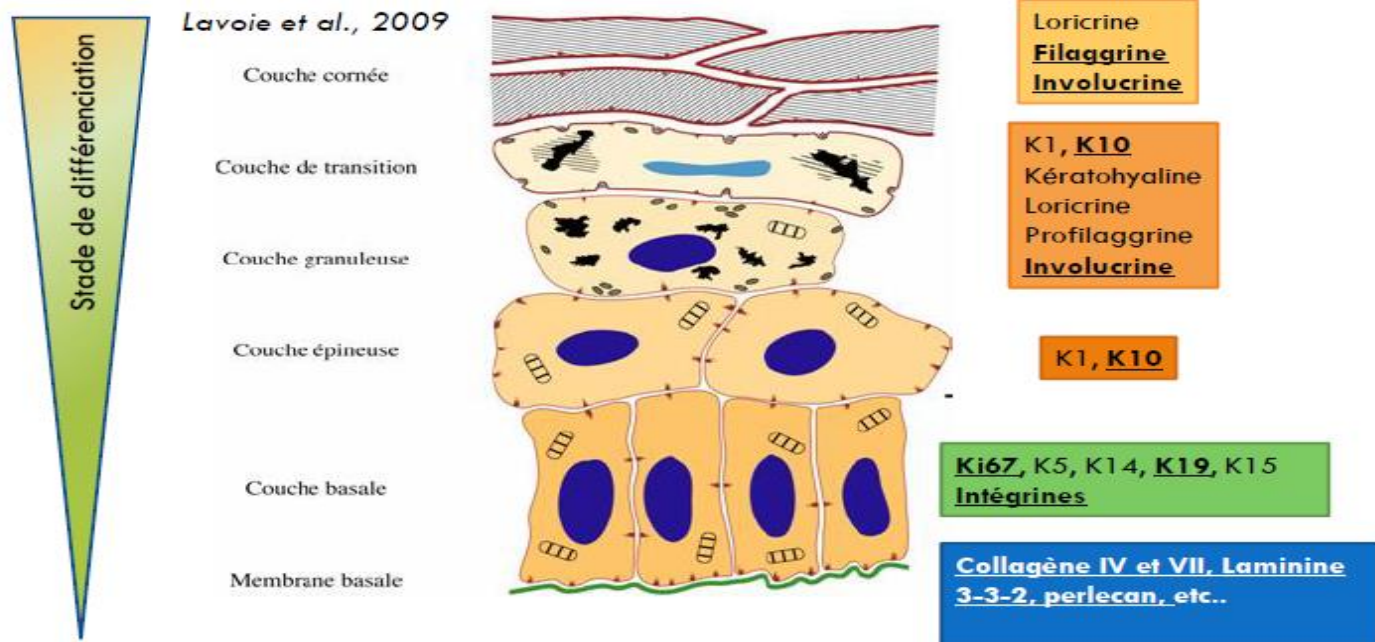


**Epiderme:**  
**épithélium pluristratifié différencié**  
**JDE: jonction dermo-épidermique**

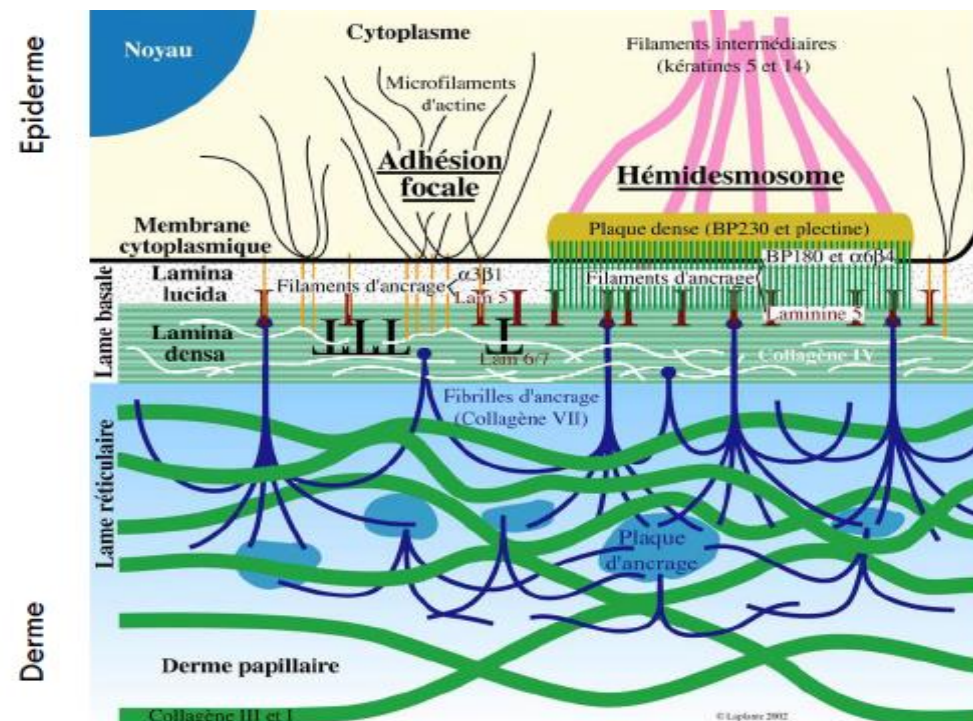


**Différenciation de kératinocytes basaux**

# Structure de la peau humaine : marqueurs de différenciation épidermique



Marqueurs de différenciation épithélial



Marqueurs protéiques de la JDE



# Notre problématique

---

- Grand nombre de protéines caractéristiques de chacune des strates de l'épiderme et de la lame basale
- Pour la caractérisation du tissu cutané *in vivo* ou pour la validation de l'architecture d'un épiderme reconstruit *in vitro*.
- Problématique principale: Fixation de nos peaux reconstruites au paraformaldéhyde (PFA)
  - ➔ préservation de l'architecture
  - ➔ masquage des épitopes de nos cibles [Ramos-Vara, 2005].

# Notre problématique

- Grand nombre de protéines caractéristiques de chacune des strates de l'épiderme et de la lame basale
- Pour la caractérisation du tissu cutané *in vivo* ou pour la validation de l'architecture d'un épiderme reconstruit *in vitro*.
- Problématique principale: Fixation de nos peaux reconstruites au paraformaldéhyde (PFA)
  - ➔ préservation de l'architecture
  - ➔ masquage des épitopes de nos cibles [Ramos-Vara, 2005].
- Solution : «démasquer» ces sites antigéniques et ainsi rendre possible la reconnaissance des antigènes par leur anticorps [O'Leary *et al.*, 2009].
- De nombreuses techniques disponibles (chimiques, enzymatiques, chaleur....)

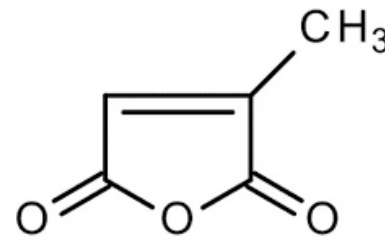
Pathology (January 2010) 42(1), pp. 77-81

## TECHNICAL REPORT

### Citraconic anhydride: a new antigen retrieval solution

ANTHONY S-Y. LEONG AND ZENOBIA HAFFAJEE

*Immunohistology Unit, Hunter Area Pathology Service and University of Newcastle, Newcastle, New South Wales, Australia*

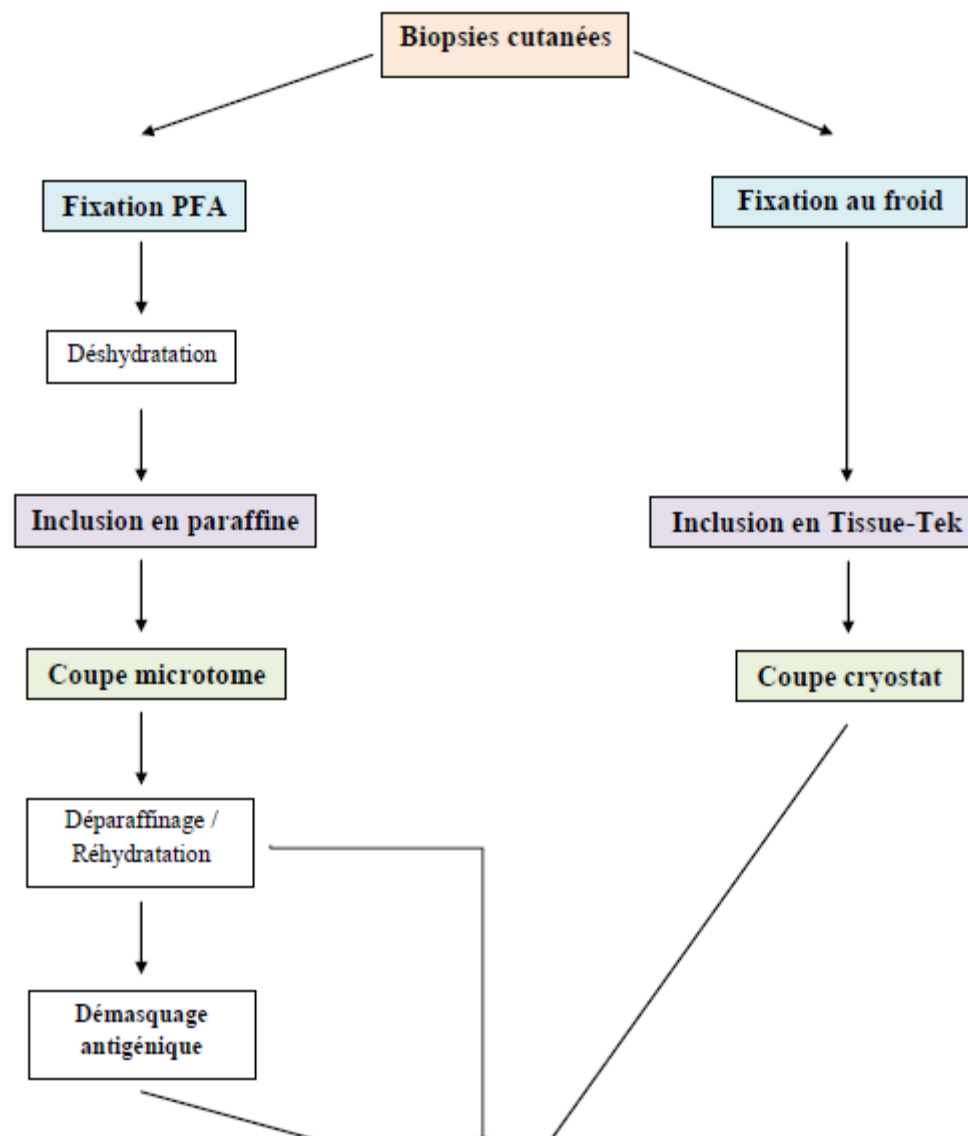


➔ **Objectif: comparer l'efficacité du démasquage antigénique par l'AC vs techniques de référence**

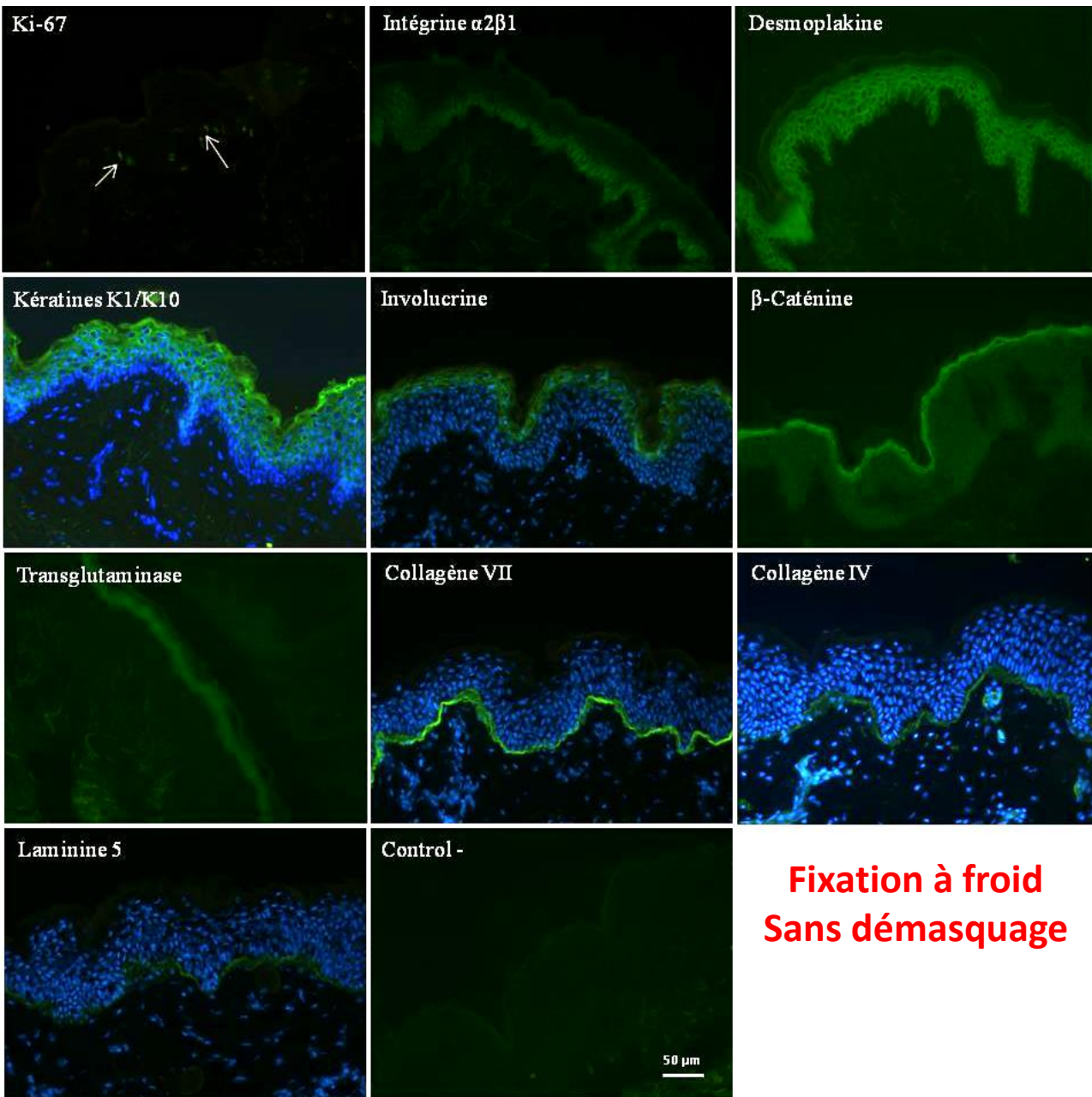
➔ **Mise en évidence de marqueurs cutanés**

## Flowchart experimental

Anticorps	Références	Dilution / Concentration
Mouse anti-human collagène IV	Millipore (MAB 1910)	1/500
Mouse anti-human collagène VII	Sigma (C6805)	1/1000
Mouse anti-human laminine 5	USBiological (L1225-35)	1/100
Mouse anti-human Ki-67	Millipore (MAB 4190)	10 µg/ml
Mouse anti-human kératine K1 / K10	Chemicon International (CBL 266)	1/50
Mouse anti-human involucrine	Tebu-Bio (SY5) : SC-21748	1/50
Mouse anti-human transglutaminase	Harbor Bioproducts (5003)	1/20
Mouse anti-human intégrine $\alpha 2\beta 1$	Millipore (MAB 1998Z)	1/200
Mouse anti-human desmoplakine	Millipore (CBL 173)	1/10
Mouse anti-human $\beta$ -caténine	Millipore (05-665)	1/300

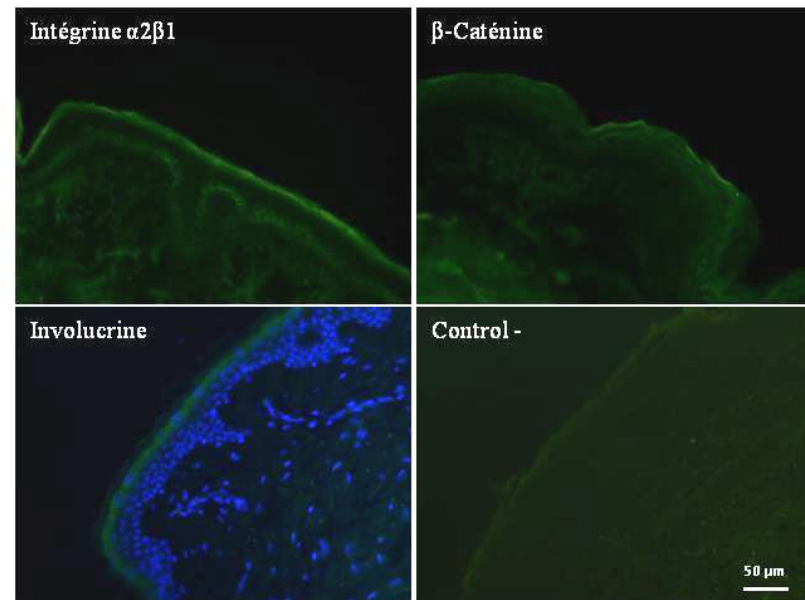


**Immunomarquage – marqueurs de différenciation épidermique**



**Fixation à froid  
Sans démasquage**

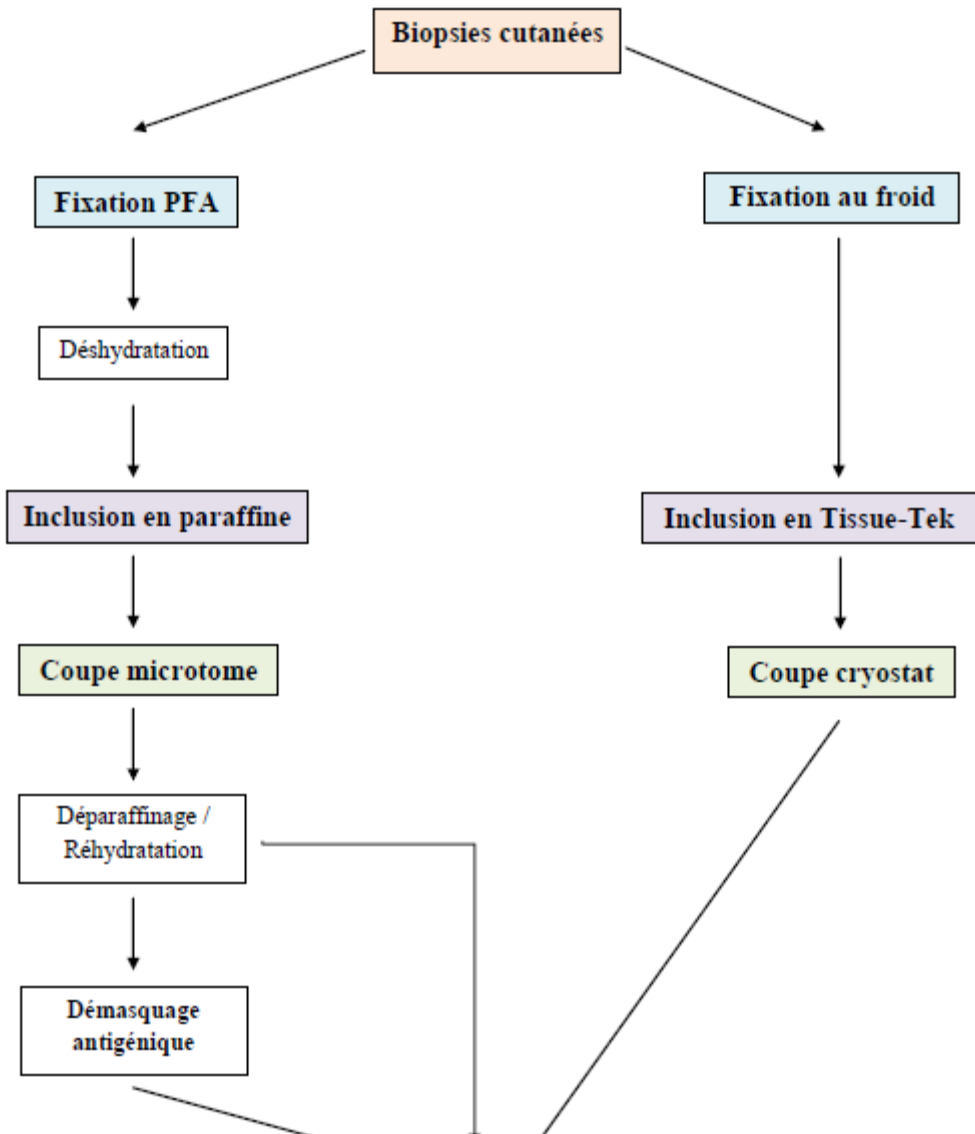
Marqueur	Fixation à froid	Fixation PFA 3%
Collagène IV	+++	-
Collagène VII	+++	-
Laminine 5	+++	-
Ki-67	+++	-
K1/K10	+++	-
Involucrine	+++	+++
Transglutaminase	+++	-
Intégrine α2β1	+++	+
Desmoplakine	+++	-
β-caténine	+++	+



**PFA 3%  
Sans  
démasquage**

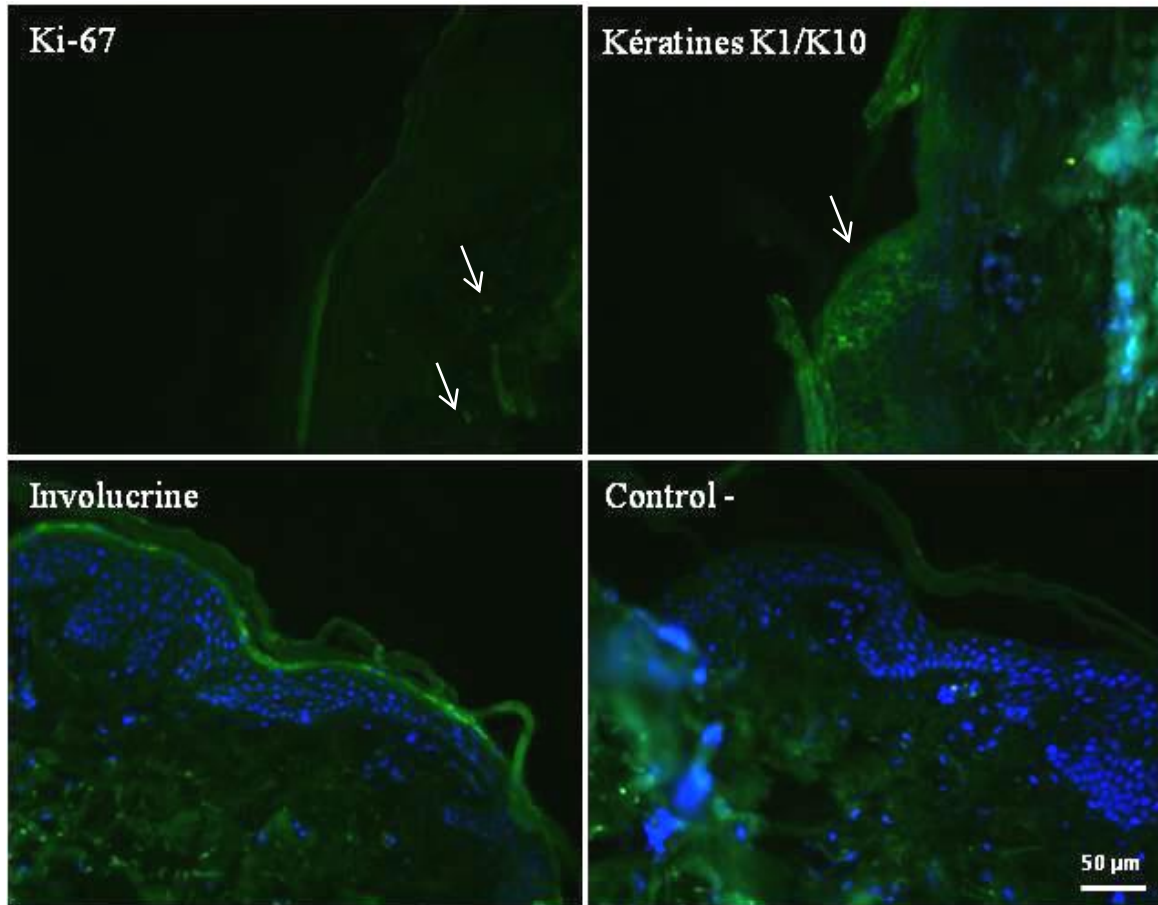
# Flowchart experimental

Solution de démasquage	Mode d'utilisation
<b>H<sub>2</sub>O</b> (Hazelbag <i>et al.</i> , 1995)	Micro-ondes (2450W/800Hz) 2x5 min
<b>Tampon acide citrique (1,8 mM / Citrate de sodium (8,2 mM)</b> (Shi <i>et al.</i> , 1993)	Micro-ondes (2450W/800Hz) 3x10 min
<b>Tampon tris-HCl (0,1M) / urée (5%)</b> (Taylor <i>et al.</i> , 1996)	Micro-ondes (2450W/800Hz) 4x5 min
<b>Anhydre citraconique 0,05%, pH 2</b> (Namimatsu <i>et al.</i> , 2005 ; Leong <i>et al.</i> , 2010)	Micro-ondes (2450W/800Hz) 2x5 min
	Bain-marie 98°C 45 min
<b>Anhydre citraconique 0,05%, pH 7,4</b> (Namimatsu <i>et al.</i> , 2005 ; Leong <i>et al.</i> , 2010)	Micro-ondes (2450W/800Hz) 2x5 min
	Bain-marie 98°C 45 min

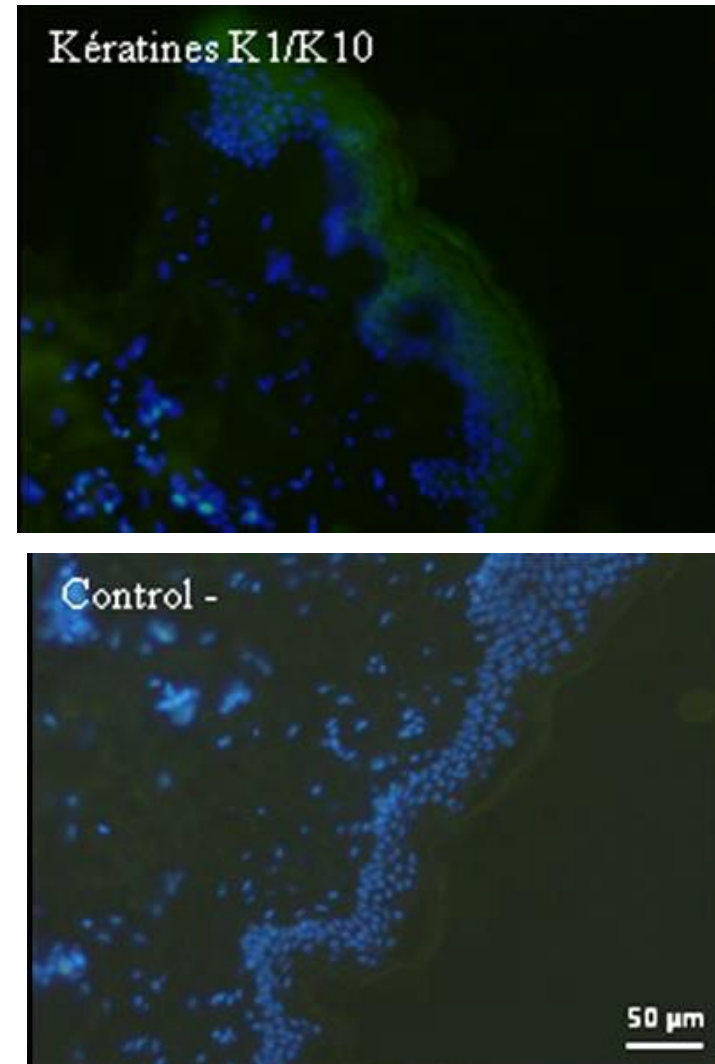


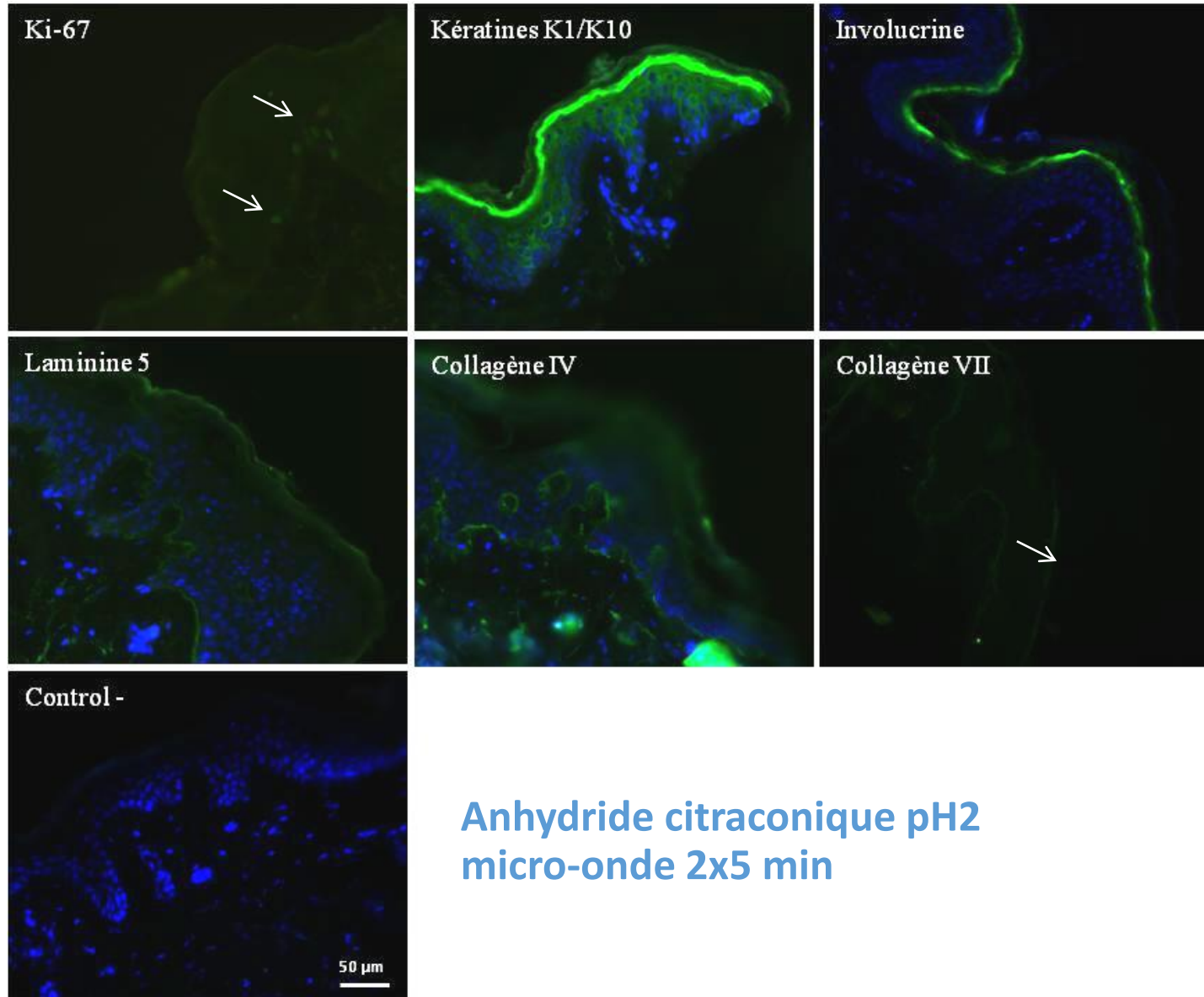
**Immunomarquage – marqueurs de différenciation épidermique**

## Tampon citrate, pH 6



## Tris-HCl 0,1 M / urée (5%)





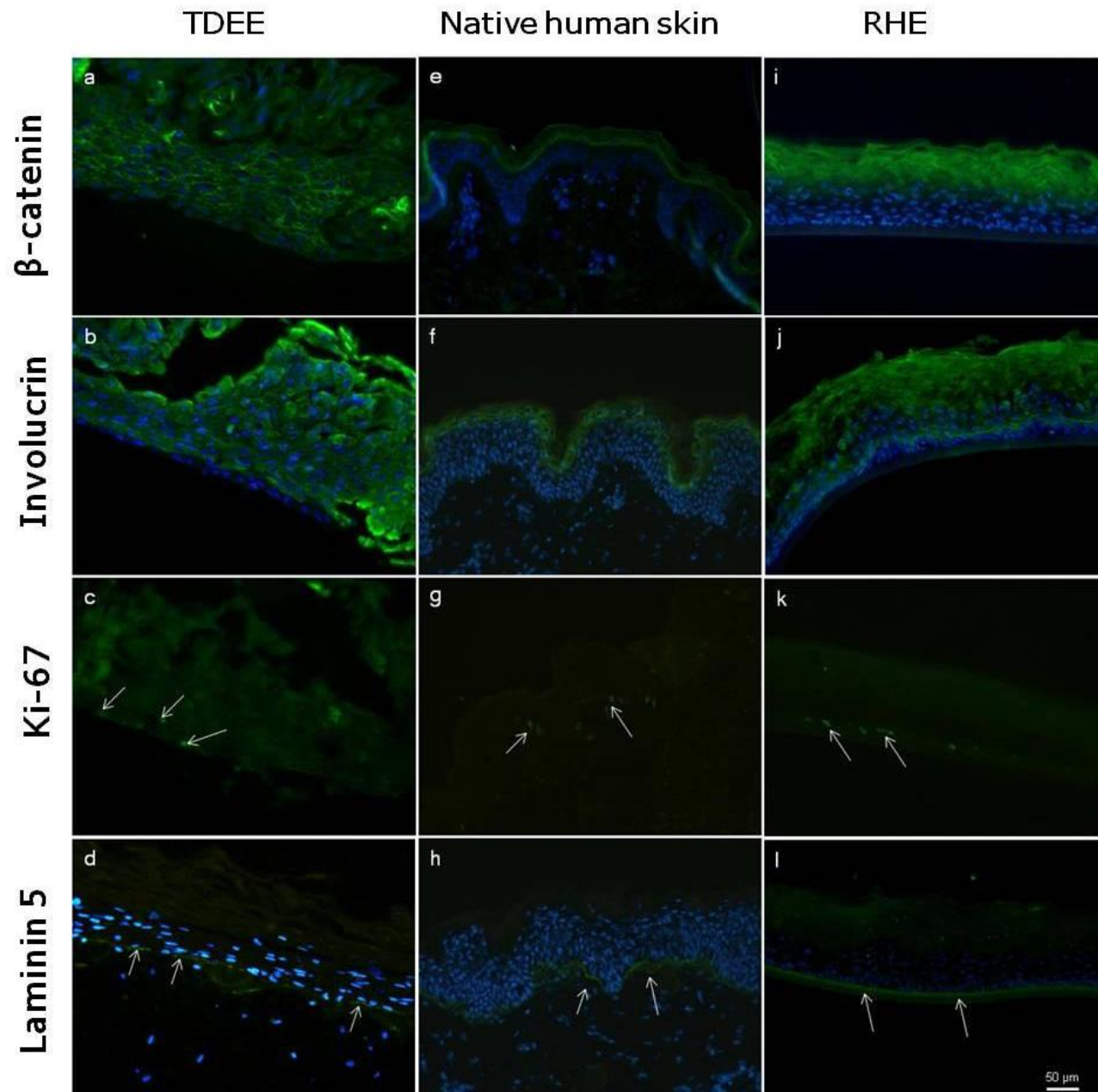
# Conclusion

Marqueur	Fixation à froid	Fixation PFA 3% sans demasquage	Fixation PFA 3% + tampon citrate	Fixation PFA 3% + eau	Fixation PFA 3% + tris-HCl / urée
Collagène IV	+	-	-	-	-
Collagène VII	+	-	-	-	-
Laminine 5	+	-	-	-	-
Ki-67	+	-	+	-	-
K1/K10	+	-	+	-	+
Involucrine	+	+	+	-	-
Transglutaminase	+	-	NT	NT	NT
Intégrine $\alpha 2\beta 1$	+	+	NT	NT	NT
Desmoplakine	+	-	NT	NT	NT
$\beta$ -caténine	+	+	NT	NT	NT

Marqueur	Fixation à froid	Fixation PFA 3% + AC pH 7,4 BM	Fixation PFA 3% + AC pH 2 BM	Fixation PFA 3% + AC pH 2 MO
Collagène IV	+	-	-	+
Collagène VII	+	-	-	+
Laminine 5	+	-	-	+
Ki-67	+	-	+	+
K1/K10	+	+	+	+
Involucrine	+	+	+	+
Transglutaminase	+	NT	NT	-
Intégrine $\alpha 2\beta 1$	+	NT	NT	-
Desmoplakine	+	NT	NT	-
$\beta$ -caténine	+	NT	NT	+

- Le démasquage au tampon citrate est satisfaisant pour certains marqueurs
- **Supériorité de l'AC pH2 – MO pour la majorité des marqueurs d'intérêt**
- Difficulté technique: problème de décollement d'échantillon
- Application à la caractérisation de nos modèles reconstruits





TDEE: modèle home made  
d'épiderme reconstruit in vitro

RHE: épiderme humain  
reconstruit du commerce  
(Episkin®)



Dr. DECHSUPA NATHUPAKORN  
Dr. KANTAPAN JIRAPORN  
MISS INNUAN PHATTARAWADEE



**UMR1098 RIGHT  
research team**

**Zélie Dirand**  
**Dr Céline Viennet**  
**Franck Monnier**

Dr Sylvain Perruche  
Dr Francis Bonnefoy  
Dr Cécile Chagué  
Dr Audrey Wetzel

**University hospital of Besançon**

Thomas LIHOREAU, Inserm CIC 1431  
Pr Lionel PAZART, Inserm CIC 1431  
Dr Brice CHATELAIN, MD,  
Pr Christophe MEYER, MD

Marion Tissot  
Mélissa Maraux  
Blandine Baffert  
Ludivine Dal Zuffo  
Mathieu Vetter  
Maxime Tristant

### Funding

Fibrolution project – Région Bourgogne-Franche-Comté  
French Agency for Research (ANR S-Keloid PRCI France-Luxembourg)  
PHC SIAM 2022-2023

### Technology

Dimacell Plateform (Dijon Besançon) for cell imaging

**Christophe Houdayer**



11/07/2023