

La peau reconstruite

MARCELLE RÉGNIER • MARIE-JEANNE STAQUET

Aujourd'hui, on sait préparer des peaux de substitution qui contiennent tous les types de cellules de la peau. De plus en plus, on teste les substances cosmétiques et pharmacologiques sur ces modèles de peau.

La peau est un organe vital. Les lésions de la peau, tels les ulcères ou les escarres, sont invalidantes, et l'absence de peau sur de larges surfaces, notamment à la suite de brûlures graves, est mortelle. Pour éviter les risques de déshydratation et d'infection, tout autant que la douleur qui suivent une brûlure, on a mis au point des épidermes de culture que l'on greffe aux personnes brûlées. En laboratoire, on utilise des substituts qui ressemblent de plus en plus à la peau pour évaluer l'activité des nouvelles substances pharmaceutiques et cosmétiques. Nous avons mis au point des modèles qui ont un avantage notable : ils évitent de faire une partie des évaluations indispensables sur des modèles animaux ou sur des volontaires. Sur ces modèles, on peut suivre les cellules quasiment une à une et décrypter les mécanismes de différenciation cellulaire et de migration sous l'effet d'agents tels que le soleil ou des substances allergisantes.

Le revêtement cutané est constitué de l'épiderme, en contact avec le monde extérieur, et du derme, dont il est séparé par la membrane basale. En profondeur se trouve l'hypoderme, un tissu graisseux sous-cutané qui contient les adipocytes (les cellules qui stockent les graisses). L'épiderme est constitué de 90 pour cent de kératinocytes, cellules qui assurent le renouvellement cutané et la cicatrisation. Il contient aussi des structures spécialisées, tels les glandes sudoripares et sébacées, et les phanères (poils et ongles).

La couche cornée, superficielle, composée de kératinocytes vieillissants, dépourvus de noyaux et nommés cornéocytes, recouvre l'épiderme : elle constitue une barrière contre les agressions de

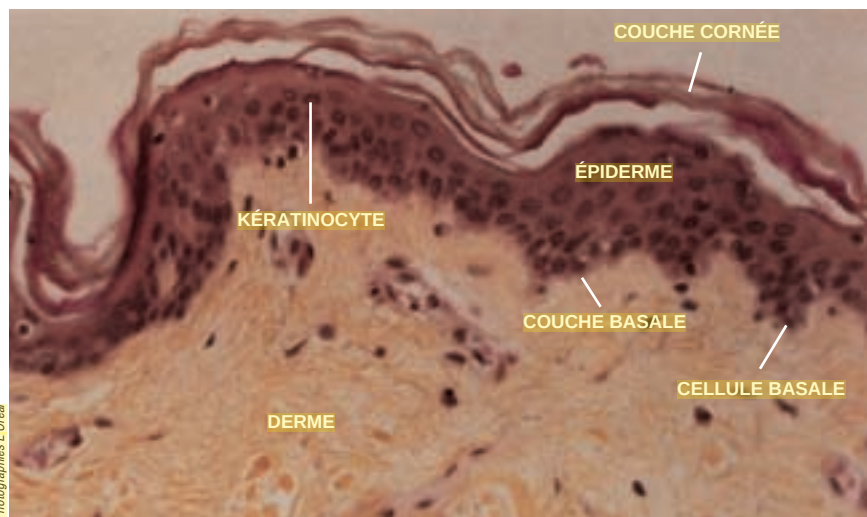
l'environnement. L'épiderme contient trois autres types de cellules : les mélanocytes produisent un pigment, la mélanine, qui détermine la couleur de la peau et protège contre les rayonnements du soleil ; les cellules de Langerhans, sentinelles immunitaires, capturent les substances étrangères et les transportent jusqu'aux lymphocytes *T* présents dans les ganglions ; les cellules de Merkel, minoritaires, sont généralement en contact avec les terminaisons nerveuses. Le derme est composé d'une matrice faite de fibres de collagène et d'élastine, synthétisées par les fibroblastes, les principales cellules de cette couche cutanée. Les vaisseaux sanguins, les glandes, les fibres nerveuses assurent à la peau ses fonctions tactiles et sensorielles.

Depuis une vingtaine d'années, on sait cultiver les kératinocytes en grande quantité : en 1975, une équipe américaine a réussi à faire survivre ces cellules en les plaçant en présence d'une couche de cellules dermiques nourricières prélevées sur des souris

et placées dans un milieu enrichi en facteurs de croissance. Elle a obtenu un épiderme stratifié, constitué de plusieurs couches de kératinocytes humains en culture. Ce substitut de l'épiderme se présente sous forme de lambeaux épidermiques (voir la figure 2).

Une patiente reconstruction

Aujourd'hui, on utilise de telles cultures de kératinocytes pour accélérer la cicatrisation des plaies des grands brûlés et des ulcères. Comme de nombreuses greffes, celles de l'épiderme sont rejetées quand les kératinocytes ne proviennent pas de la personne à traiter. Ainsi, en cas de brûlures graves, on prélève un lambeau de peau saine sur la personne brûlée, et l'on en fait la culture dans des conditions bien contrôlées pour obtenir des lambeaux d'épiderme suffisamment étendus pour recouvrir les plaies : à partir d'une biopsie de peau de deux centimètres



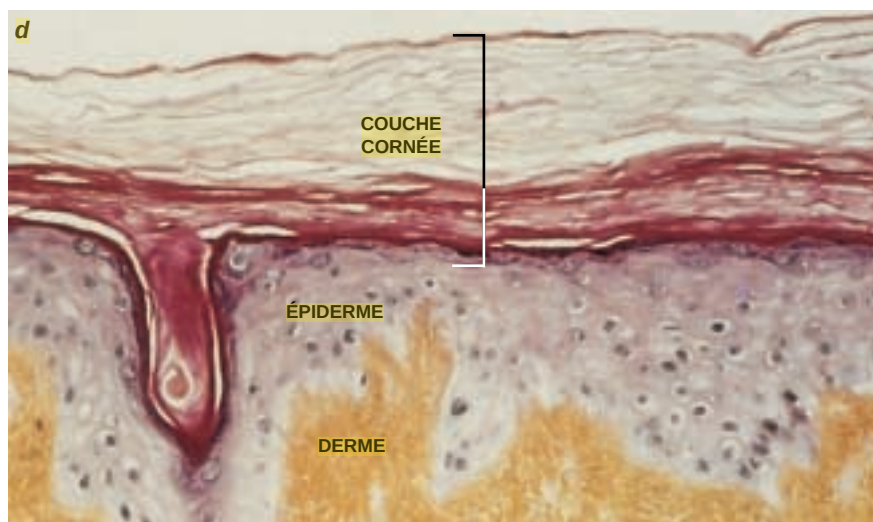
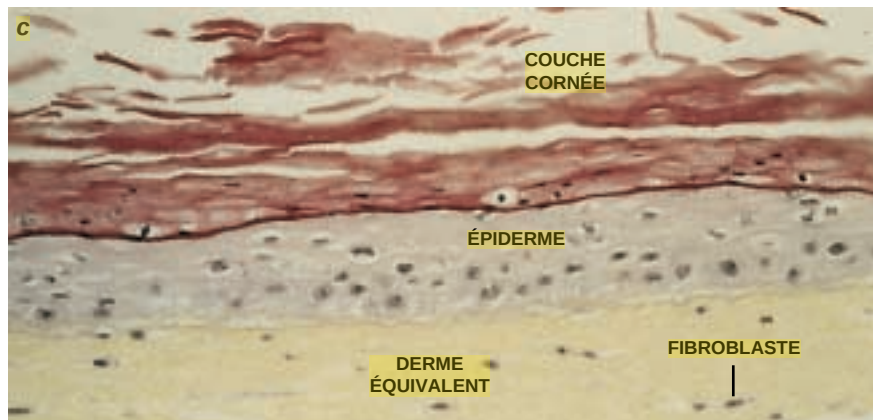
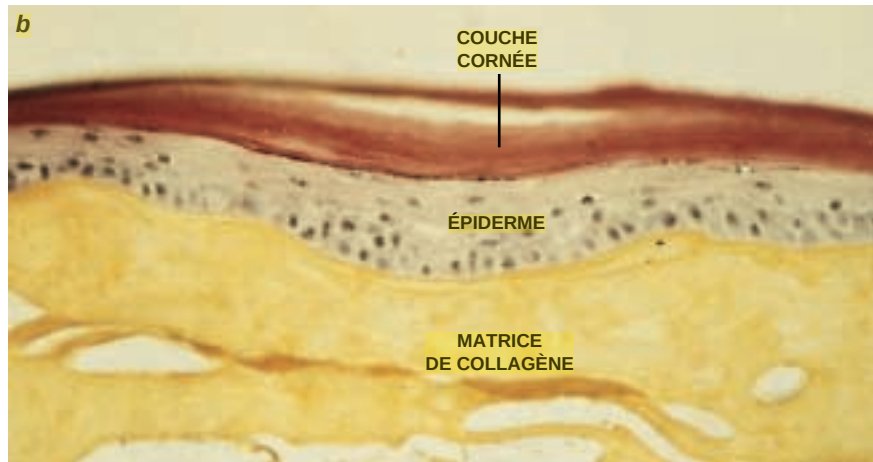
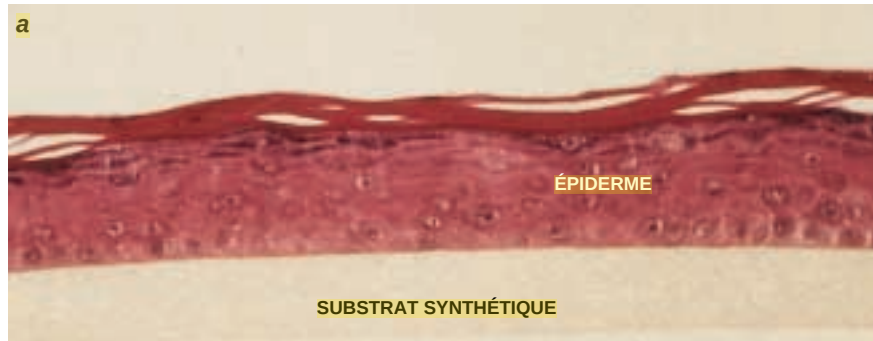
carrés prélevée sur une zone indemne, on obtient un mètre carré d'épiderme de culture (par fragments carrés de 20 centimètres de côté environ). Ces lambeaux d'épiderme, produits à l'échelle industrielle dans des conditions maximales de sécurité et de stérilité, sont utilisés par les centres de grands brûlés.

Outre son intérêt dans ces applications médicales, ce modèle de culture reste utilisé dans les laboratoires pour l'étude de la toxicité de diverses substances appliquées sur la peau et de leurs métabolites.

Toutefois, cet épiderme est incomplet, puisqu'il est, notamment, dépourvu de couche cornée. En 1979, Michel Prunieras et ses collègues des laboratoires *L'Oréal* ont préparé des épidermes reconstruits sur la membrane basale d'un derme humain : on utilise un derme privé de fibroblastes, de sorte que les cellules épidermiques, retrouvant leur substrat naturel, y adhèrent et se multiplient. En fait, les kératinocytes prolifèrent sur de nombreux substrats, à condition qu'ils y adhèrent. En outre, la culture est placée sur une grille, à la surface du milieu nutritif enrichi en substances nécessaires à la croissance cellulaire et au contact de l'air. L'épiderme obtenu est constitué d'une couche basale correctement orientée, de plusieurs couches qui ont les caractéristiques de l'épiderme normal et, en surface, d'une couche cornée compacte. La couche cornée ne se développe que si la face supérieure de la culture d'épiderme est exposée à l'air.

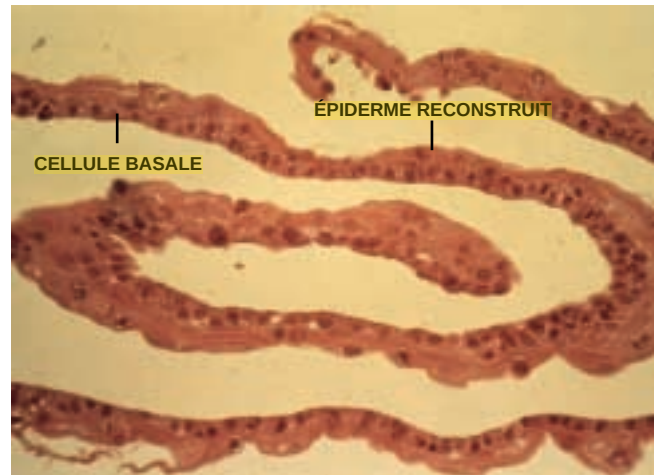
Ainsi, on dispose de modèles constitués des principales cellules de

1. LES MODÈLES DE PEAU ont été progressivement améliorés. Un des modèles contient un épiderme sur un film de collagène qui repose sur un substrat synthétique (a). Dans un autre (b), l'épiderme repose sur une matrice épaisse de collagène, dépourvue de fibroblastes (les cellules du derme). Dans un troisième modèle (c), l'épiderme se développe sur un derme équivalent contenant des fibroblastes vivants. Enfin, dans un autre modèle mis au point par les laboratoires *L'Oréal* (d), les kératinocytes se développent sur un derme humain dont on a détruit les fibroblastes : les cellules se développent correctement, même en l'absence de fibroblastes. L'aspect de ce dernier épiderme est proche de celui d'une peau normale (ci-contre, à gauche). On distingue le derme, la couche basale, l'épiderme et la couche cornée. Tous les éléments essentiels de la peau sont présents.





2. UN LAMBEAU D'ÉPIDERME (à gauche) reconstruit ressemble à un voile mince. Ici, il s'est détaché du milieu de culture (en noir). Quand on fait une coupe de ce lambeau selon l'épaisseur et que l'on colore



les cellules, on observe (à droite) une couche basale et des kératinocytes partiellement différenciés. En revanche, ce substitut de peau, l'un des premiers réalisés, est dépourvu de couche cornée et de derme.

l'épiderme. Ces cellules sont vivantes, puisqu'elles se multiplient, se différencient et migrent correctement de la couche basale à la couche cornée. Elles ont le même comportement que les kératinocytes de la peau.

Sur des coupes de tels épidermes, on peut observer la différenciation des cellules de l'épiderme et, notamment, comment les kératinocytes prolifératifs deviennent des cornéocytes dépourvus de noyau ; on étudie l'action des modulateurs de la différenciation des kératinocytes, telles la vitamine C, la vitamine D et les substances contenant de l'acide rétinoïque, en faisant varier leur concentration dans le milieu de culture.

Cette peau reconstruite, bien qu'imparfaite, imite la peau *in vivo*. On dépose sur l'épiderme reconstruit les substances à analyser et on suit leur pénétration dans le tissu de culture. Ainsi, on a montré, sur de tels modèles, que l'acide rétinoïque agit sur la prolifération et sur la différenciation des kératinocytes. Quand on l'applique sur un substitut de peau, il accélère la prolifération des kératinocytes et perturbe leur différenciation.

Pour évaluer l'efficacité des écrans solaires, on compare le comportement des kératinocytes, des fibroblastes et du collagène de plusieurs échantillons de substitut de peau sur lesquels on applique ces écrans et que l'on expose au même rayonnement : les mieux protégés présentent le moins de lésions cellulaires, et l'on en déduit lequel des écrans solaires est le plus efficace.

Aujourd'hui, des modèles d'épidermes reconstruits sont disponibles sous forme de kits, largement utilisés par certaines sociétés cosmétiques ou pharmaceutiques, pour étudier la toxicité, la tolérance et l'efficacité de nouveaux produits : on évalue leur action sur cette peau biosynthétique, au lieu de l'étudier sur des animaux.

Ces modèles d'épidermes reconstruits sont en cours de validation par plusieurs équipes internationales : ils remplaceraient les modèles animaux, devenant une nouvelle méthode d'évaluation des réactions de la peau aux molécules étudiées.

Les épidermes pigmentés

Progressivement les épidermes reconstruits ont été améliorés, notamment avec l'introduction d'un deuxième type de cellules : les mélanocytes. Extraits de l'épiderme humain normal, les mélanocytes sont cultivés et multipliés *in vitro*. Mélangés aux kératinocytes dans un rapport identique à celui de l'épiderme normal (dix kératinocytes pour un mélanocyte), les cellules sont ensemencées sur un substrat dermique, afin de former un épiderme reconstruit pigmenté. Dans ces épidermes, les mélanocytes sont localisés dans la couche basale, comme ils le sont *in vivo*. Ils transfèrent leur pigment aux kératinocytes par l'intermédiaire de leurs dendrites, de longs prolongements qui leur permettent d'atteindre des couches cellulaires éloignées et d'être en contact avec de très nombreuses cellules de l'épiderme.

Ces épidermes reconstruits pigmentés ouvrent un vaste champ de recherches, celui de l'activité des modulateurs de la mélanogenèse : on observe et on quantifie les effets éclaircissants ou pigmentants de molécules appliquées sur la peau ; on évalue l'effet des rayonnements ultraviolets sur ces épidermes reconstruits pigmentés. On a réussi à reproduire les différents phototypes cutanés, c'est-à-dire les différents types de peau et étudié l'effet protecteur du bronzage contre le rayonnement solaire. On teste l'efficacité des produits éclaircissants de la peau selon les différents phototypes.

Dans l'Unité INSERM 346, nous avons récemment proposé un modèle de « mélanome » reconstruit à l'aide de mélanocytes d'origine maligne. Il permet d'étudier comment se forment les mélanomes, comment les cellules tumorales traversent la membrane basale et comment elles envahissent le derme. D'autres modèles reconstruits à partir de kératinocytes d'origine pathologique et cultivés sur un substrat dermique ressemblent beaucoup aux lésions d'origine. Ces épidermes « pathologiques » reconstruits seront des outils précieux pour l'étude de ces maladies et pour les tests de l'efficacité potentielle des médicaments.

La peau de reconstruction a d'abord été constituée de kératinocytes, puis ces cellules ont été associées à un derme. On y a ensuite introduit des mélanocytes. Il manquait encore les cellules de défense : les cellules de Langerhans. Si elles ont été décrites par le pathologiste