

La peau est l'organe sensoriel le plus développé de notre organisme. Responsable du toucher, elle intervient dans la perception de l'environnement ; miroir de l'expression de nos émotions, elle participe à notre communication. Représentant près du sixième de notre poids corporel, elle joue, par ses multiples fonctions, un rôle essentiel dans le bon fonctionnement de l'organisme. Barrière face à l'environnement, elle protège des agressions extérieures, qu'elles soient d'origines bactériennes ou mécaniques. Elle participe à la régulation de la température du corps par la transpiration, et évite la déshydratation. Lorsqu'elle est endommagée, elle se reconstruit naturellement sauf quand une trop grande surface est lésée. Reconstruire l'épiderme, voire les différentes couches de la peau, est un enjeu majeur, notamment pour le traitement des grands brûlés. En effet, chaque année en France, 10 000 personnes sont admises dans des centres spécialisés pour les brûlures et 3 000 patients sont susceptibles de nécessiter une greffe.

L'urgence est alors de redonner à l'organisme sa barrière protectrice afin d'éviter la perte en eau et les infections. Dans le cas où les zones brûlées ne sont pas trop étendues, des autogreffes sont pratiquées : de la peau est prélevée sur des parties saines pour couvrir les plaies. Si la surface brûlée profonde est supérieure à la moitié de la surface du corps, il ne reste plus suffisamment de zones saines pour couvrir la plaie, et il faut recourir à une culture d'épiderme, dit autologue, c'est-à-dire issu du patient. Comment réalise-t-on des cultures de peau ? À partir de quelles cellules, sur quel substrat, dans quel milieu ? Les peaux reconstruites ont-elles les mêmes propriétés que la peau qu'elles remplacent ?

Toutes ces questions fondamentales qui touchent la peau de remplacement ou encore l'ingénierie tissulaire de la peau seront évoquées ici. Nous examinerons d'abord la peau normale et ses constituants, puis les étapes clés de l'histoire des peaux reconstruites, les résultats que ces modèles ont apportés sur le plan de l'étude des mécanismes biologiques impliqués dans le fonctionnement de la peau normale, sur le plan de l'étude des maladies de la peau et sur le plan clinique du traitement des grands brûlés. Nous terminerons par les espoirs que soulèvent les cellules souches de l'épiderme.

1. La peau est constituée de trois compartiments, l'épiderme, le derme et l'hypoderme, et des annexes cutanées, le poil (ou follicule pileux), la glande sébacée (qui produit le sébum) et la glande sudoripare (qui produit la sueur). Dans l'épiderme, les kératinocytes de la couche basale se divisent et se différencient en migrant vers la surface pour former la couche cornée qui protège la peau de l'environnement. En fin de parcours, les cellules de la surface (les cornéocytes) sont éliminées par le processus de desquamation. Les cellules de Langerhans sont des acteurs du système immunitaire, tandis que les mélanocytes produisent les pigments qui protègent l'ADN cellulaire contre le rayonnement solaire. Le derme confère à la peau sa résistance et sa souplesse ; il contient des fibroblastes qui synthétisent les différents constituants de la matrice extracellulaire (les fibres de collagène et d'élastine, ainsi que les protéoglycanes).

La peau représente une surface de près de deux mètres carrés et pèse environ quatre kilogrammes (sans l'hypoderme) chez un adulte de 75 kilogrammes. Elle est formée de l'épiderme et du derme sous-jacent. Sous l'influence de facteurs dermiques se développent, à partir de l'épiderme, les annexes cutanées, telles que les follicules pileux, les glandes sébacées et les glandes sudoripares. L'ensemble repose sur du tissu adipeux. L'épiderme, la couche la plus externe, est un épithélium stratifié qui se renouvelle toutes les trois à quatre semaines, et dont l'épaisseur varie de 0,05 millimètre pour les paupières à 1,5 millimètre pour la plante des pieds. Il est surtout composé de kératinocytes qui se divisent au niveau de la couche basale de l'épiderme, puis, suivant un programme de différenciation, migrent vers la surface. Au cours de la différenciation des kératinocytes, des protéines et des lipides spécifiques sont synthétisés afin que se forme la couche cornée qui confère à la peau sa fonction de barrière.

Les constituants de la peau et leur fonction

Les autres types cellulaires de l'épiderme sont les mélanocytes responsables de la couleur de la peau, les cellules de Langerhans, impliquées dans les réactions immunitaires, et les cellules de Merkel qui jouent un rôle de récepteurs mécaniques, sensibles à la pression. Les mélanocytes sont situés dans l'assise basale de l'épiderme. Ces cellules dendritiques (les dendrites sont des prolongements cellulaires) synthétisent un pigment, la mélanine, produite dans des structures spécialisées, nommées mélanosomes. Ces derniers sont transférés aux kératinocytes voisins *via* les dendrites des mélanocytes. Ils se rassemblent ensuite au-dessus du noyau des kératinocytes en formant une sorte de « casque » qui protège l'ADN contre l'action des ultraviolets. Un mélanocyte fabrique de la mélanine pour une quarantaine de kératinocytes. La protection contre les ultraviolets est fonction du type de mélanine formée : l'eumélanine présente dans les peaux de phototype foncé protège mieux que la phéomélanine majoritaire dans les peaux de phototype clair.

Les cellules de Langerhans appartiennent à la famille des cellules dendritiques. Elles assurent la surveillance immunologique de la peau. Localisées dans les couches suprabasales de l'épiderme, ces cellules présentatrices d'antigènes capturent les substances étrangères qui pénètrent dans la peau et les transportent jusqu'aux lymphocytes T présents dans les ganglions. Ces cellules sont notamment impliquées dans les réactions d'allergie de contact ou de sensibilisation, ainsi que dans les réactions allergiques en cas de surexposition au soleil.

Beaucoup plus épais que l'épiderme, le derme sous-jacent (un à quatre millimètres) est le tissu de soutien de la peau. Ses propriétés d'élasticité et de résistance à la pression sont dues à une matrice extracellulaire produite par les fibroblastes. Cette matrice contient surtout des fibres

de collagène et des fibres d'élastine ; elle est parcourue par de nombreux capillaires qui assurent le transport des facteurs de croissance et des nutriments jusqu'aux kératinocytes de l'épiderme.

L'aventure des peaux reconstruites

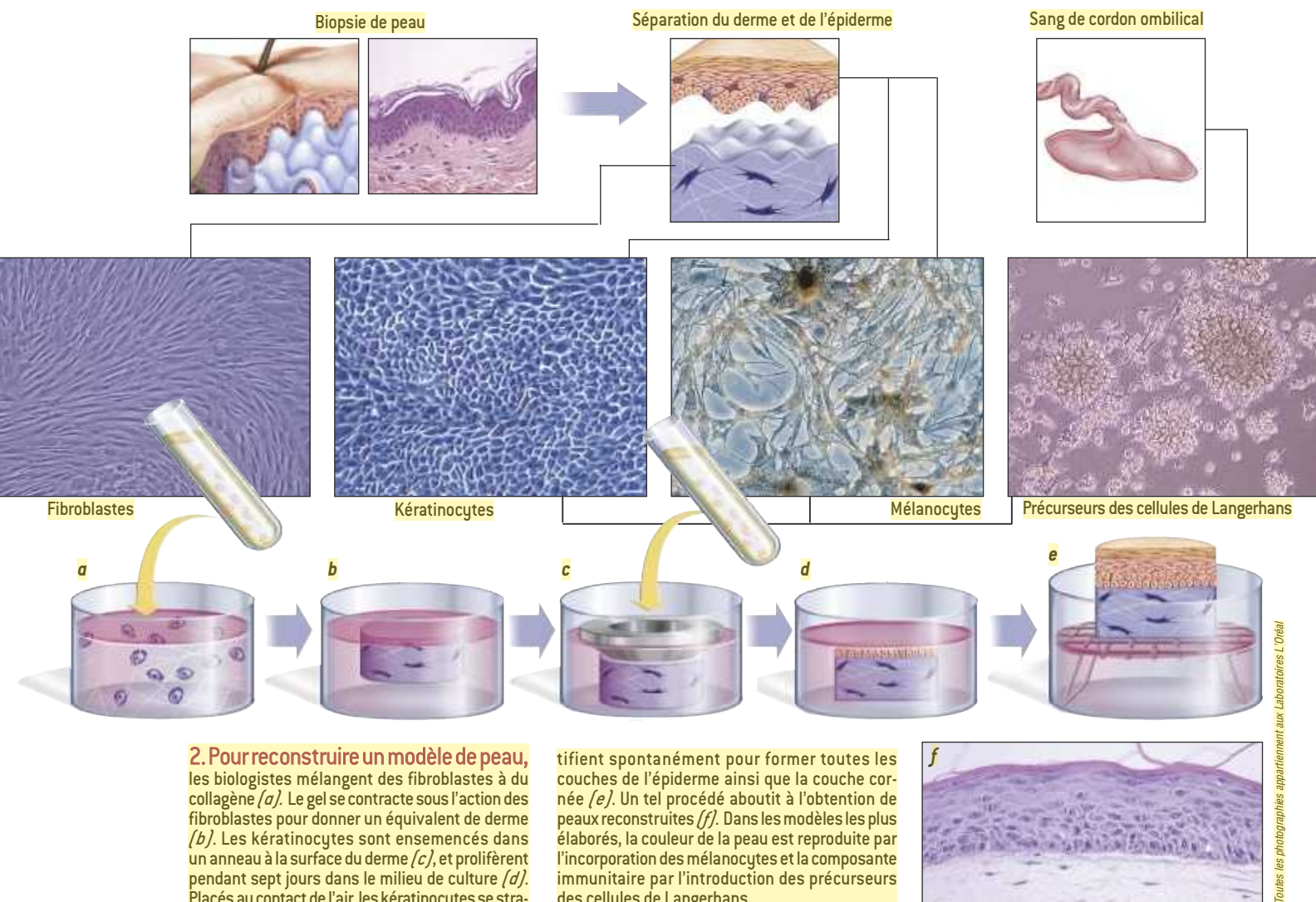
L'aventure des peaux reconstruites a commencé en 1975 avec les travaux de James Rheinwald et Howard Green, à la Faculté de médecine de Harvard, qui réussirent à obtenir un substitut d'épiderme constitué de plusieurs couches de kératinocytes. Le premier modèle d'épiderme reconstruit a été obtenu en 1979 par Michel Pruniéras et Marcelle Régner. Depuis, les modèles ont été perfectionnés par l'ajout des différents types cellulaires permettant de simuler diverses fonctions de la peau.

La peau reconstruite est synonyme de vie pour les grands brûlés, mais c'est aussi un précieux outil de recherche pour étudier la physiologie de la peau normale et les différentes maladies de peau, comme le psoriasis, ou des maladies génétiques rares, telles que *Xeroderma pigmentosum*. Ainsi recons-

truite *in vitro*, la peau imite suffisamment la peau « naturelle » pour permettre de tester des molécules et de réaliser des tests toxicologiques, autorisant ainsi le développement de méthodes alternatives aux tests sur animaux.

Quel que soit le modèle de peau reconstruite, la reconstruction suit le même schéma global : les kératinocytes sont isolés de l'épiderme ou de la gaine externe d'un follicule pileux, puis cultivés. Ils sont « ensemencés » à la surface d'un support qui est soit un derme, soit un biomatériau souvent à base de collagène. La première phase de la culture consiste à obtenir une monocouche de kératinocytes en plaçant les cellules en immersion dans le milieu de culture. Aux kératinocytes peuvent être ajoutés les autres types cellulaires de l'épiderme selon le modèle que l'on souhaite obtenir. Ensuite, les kératinocytes sont placés au contact de l'air, où ils se différencient et se stratifient spontanément pour former l'ensemble des couches de l'épiderme, ainsi qu'une couche cornée qui confère à l'épiderme reconstruit sa fonction barrière (voir la figure 2).

Une étape importante a été franchie quand on a adjoint à l'épiderme le compartiment dermique contenant des fibroblastes. L'obtention d'un équivalent de peau comprenant les deux types cellulaires majoritaires de la peau



–les kératinocytes et les fibroblastes– a ouvert des nouveaux champs d’investigation visant à mieux comprendre les interactions entre les deux compartiments de la peau. Du côté épiderme, des mélanocytes et des cellules de Langerhans ont ensuite été ajoutés aux kératinocytes. Côté derme, les biologistes ont recherché des substrats synthétiques, telles des éponges, leur permettant d’introduire non seulement des fibroblastes, mais également des cellules endothéliales qui ont la capacité de former des structures tubulaires imitant la paroi des capillaires sanguins (le derme est abondamment vascularisé).

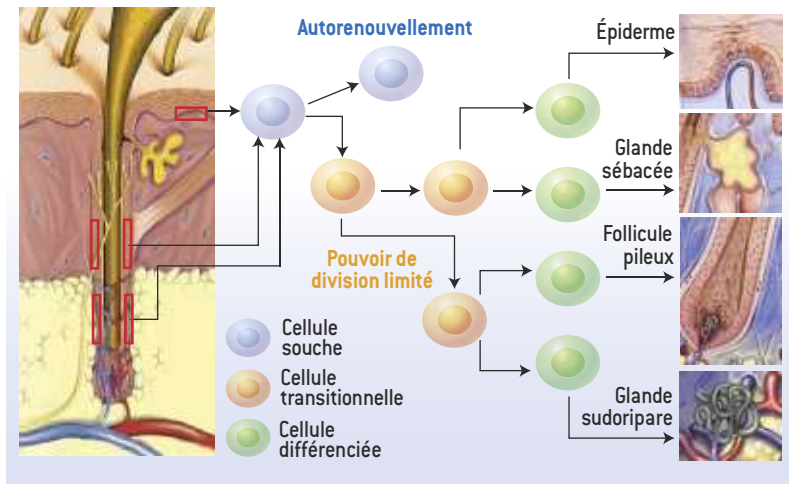
Des outils de test et de recherche

Aujourd’hui, il est possible de reproduire les différents phototypes de peau *in vitro* en sélectionnant les mélanocytes issus de biopsies cutanées d’origines ethniques différentes. Ces modèles sont utilisés pour étudier des modulateurs de la mélanogenèse (c’est-à-dire la production de mélanine par les mélanocytes), tels que l’effet d’agents éclaircissants ou pigmentants comme les ultraviolets, pour évaluer l’efficacité des filtres solaires, et pour comprendre les interactions cellulaires entre les kératinocytes et les mélanocytes.

L’introduction des cellules de Langerhans permet d’obtenir des épidermes reconstruits immunosensibles. Les cellules de Langerhans de l’épiderme ne se multiplient pas *in vitro*, de sorte qu’il est indispensable d’utiliser des précurseurs, les cellules CD34⁺ issues du sang. Une première phase de culture favorise la prolifération et la différenciation de ces précurseurs notamment en cellules dendritiques. Ensemencées avec les kératinocytes sur le substrat dermique, ces cellules dendritiques poursuivent leur différenciation en cellules de Langerhans pendant la phase de reconstruction de l’épiderme. Ces cellules sont fonctionnelles, car elles réagissent à l’application d’allergènes à la surface de l’épiderme reconstruit. Comme dans la peau normale, l’activation des cellules de Langerhans se traduit par un raccourcissement des dendrites, voire, dans certains cas, par la diminution du nombre de ces cellules au sein de l’épiderme. Un tel modèle ouvre des perspectives pour étudier les premières étapes des réactions de l’allergie de contact.

Les modèles tridimensionnels d’épiderme reconstruit ont une fonction de barrière qui permet d’imiter *in vitro* le comportement de la peau humaine en réponse à un traitement ou à un stress. Des protocoles utilisant un test simple de cytotoxicité permettent aujourd’hui de prédire le potentiel corrosif de telle ou telle molécule chimique, et le champ d’application des modèles d’épiderme reconstruit dans le domaine de la sécurité s’élargit progressivement à l’étude de la biodisponibilité des produits et du potentiel toxique des molécules pour le génome des cellules.

L’apport d’un équivalent de derme a ouvert la voie à d’autres applications, telles que l’étude de la cicatrisation, du vieillissement dû au temps et à l’exposition aux ultraviolets, ainsi que de certains cancers cutanés, tel le mélanome. Lors du vieillissement cutané dû au temps, les modifications les plus visibles interviennent dans le derme superficiel. La jonction entre le derme et l’épiderme s’aplatit, les fibroblastes se raréfient et leur capacité de synthèse du collagène (les fibres de collagène confèrent sa



3. Les cellules souches de l’épiderme sont localisées au niveau du follicule pileux (*zones rouges*) et dans la couche basale de l’épiderme. Au terme de leur différenciation, ces cellules donnent de l’épiderme, des glandes sudoripares, des glandes sébacées ou encore des follicules pileux.

résistance à la peau), de l’élastine (les fibres d’élastine sont responsables des propriétés élastiques) et des protéoglycanes (des protéines qui servent à l’hydratation du derme) diminue. Des réactions de glycation se produisent, c’est-à-dire que le sucre circulant dans le sang réagit avec les acides aminés des protéines et, en particulier, avec les fibres de collagène, établissant des ponts entre les fibres qui rigidifient la trame de collagène. L’équipe de Daniel Asselineau, des Laboratoires L’Oréal, a mis au point un équivalent dermique fabriqué avec des fibres de collagène préglyqué par du ribose (ce sucre réticule le réseau de collagène). Ce modèle permet de comprendre le rôle joué par les produits terminaux de glycation (les molécules qui ont subi une réticulation par le sucre).

L’étude du vieillissement cutané

Dans le derme, différentes sous-populations de fibroblastes coexistent : les fibroblastes papillaires localisés dans le derme superficiel, les fibroblastes réticulaires du derme profond et enfin des fibroblastes spécialisés associés aux follicules pileux. L’intégration des fibroblastes du derme superficiel et du derme profond dans les peaux reconstruites révèle qu’*in vitro* ces deux sous-populations diffèrent : elles n’ont pas les mêmes capacités de prolifération et ne synthétisent pas les mêmes molécules de la matrice extracellulaire. L’ensemble de ces travaux démontre l’intérêt de ces modèles pour la compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans le vieillissement dû au temps.

Le vieillissement dû à l’exposition aux ultraviolets A et B est également étudié. Pendant longtemps, les ultraviolets B ont été tenus comme les seuls dangereux pour la peau. Les ultraviolets B sont responsables des coups de soleil : au sein de l’épiderme, les cellules dont l’ADN a été endommagé entrent en apoptose (déclenchent leur propre mort). Puis les biologistes ont constaté que les ultraviolets A qui pénètrent davantage dans la peau sont également nocifs, parce qu’ils altèrent directement le compartiment dermique. Par un processus de stress oxydatif (créant des radicaux