

–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).

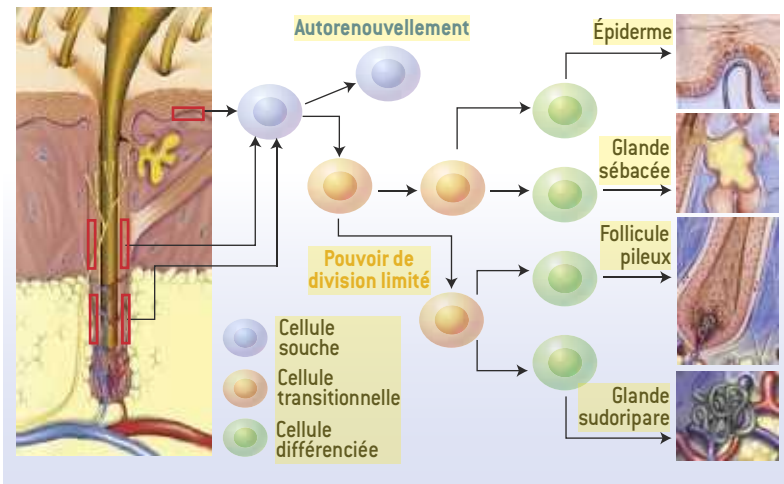
Des outils de test et de recherche

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

libres très réactifs), ils endommagent les fibroblastes et favorisent la synthèse de protéines responsables de la dégradation du collagène. Grâce aux modèles de peaux reconstruites contenant l'épiderme et le derme, on a montré que les kératinocytes de l'épiderme participent indirectement aux phénomènes de photovieillessement : ils sécrètent, sous l'action des ultraviolets B, des facteurs solubles qui entraînent la synthèse d'enzymes de dégradation du collagène par les fibroblastes du derme.

L'étude des maladies de la peau

Les peaux reconstruites sont aussi des modèles d'étude pour des maladies de peau, telles que *Xeroderma pigmentosum* (XP). C'est une maladie génétique rare due à une déficience de réparation des lésions induites dans l'ADN par les ultraviolets. Alors que les cellules normales réparent les lésions (mutations) induites par les ultraviolets grâce à des enzymes de réparation spécifiques, les cellules XP en sont incapables. Les patients ont une sensibilité exacerbée vis-à-vis du soleil et développent très tôt dans l'enfance des cancers cutanés sur les zones exposées. L'équipe d'Alain Sarasin, du CNRS-UPR 2169, à l'Institut Gustave Roussy, en collaboration avec l'équipe de Françoise Bernerd et D. Asselineau, des Laboratoires *L'Oréal*, ont mis au point un modèle de peau reconstruite à partir de kératinocytes et de fibroblastes de patients atteints de la maladie. Les résultats montrent des altérations spontanées de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes. De plus, les fibroblastes de ces patients semblent interagir de façon particulière avec les kératinocytes : l'épiderme s'invagine anormalement dans l'équivalent de derme en formant des kystes qui évoquent les toutes premières étapes de la formation d'une tumeur.

Quand la peau reconstruite à partir de cellules XP est exposée aux ultraviolets, les mutations de l'ADN perdurent alors que, dans les peaux normales, elles sont réparées au bout de quatre jours. Les biologistes mènent des essais de corrections génétiques en introduisant le gène de réparation normal dans les kératinocytes XP. Ils cherchent à savoir si les peaux reconstruites avec les cellules génétiquement corrigées se comportent comme des peaux normales vis-à-vis de la réparation des lésions de l'ADN induites par les ultraviolets.

Le mélanome, dû à la prolifération des mélanocytes, est une autre pathologie de la peau dont la compréhension a

progressé grâce à l'utilisation de modèles de peau reconstruite. Le bon fonctionnement de l'épiderme, comme celui de tous les tissus, est régi par l'équilibre qui règne entre la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules. Cet équilibre permet de conserver l'architecture tissulaire et en particulier de maintenir la bonne localisation des différents types cellulaires dans les tissus.

Dans la peau normale, la division des mélanocytes est sous le contrôle des kératinocytes, lesquels favorisent l'expression de protéines impliquées dans la communication intercellulaire : l'une d'elles est l'E-cadhérine. Grâce aux peaux reconstruites, il a été montré que les mélanocytes échappent au contrôle des kératinocytes en exprimant non plus l'E-cadhérine, mais la N-cadhérine, et qu'ils se mettent à communiquer avec les fibroblastes. En conséquence, les mélanocytes migrent dans le derme au lieu de rester dans l'épiderme. Cette modification du dialogue entre cellules participe au développement du processus de cancérisation.

Les applications cliniques

L'utilisation des épidermes reconstruits la plus remarquable est celle des épidermes utilisés pour le traitement des grands brûlés. Les premiers essais cliniques de greffes d'épithéliums autologues obtenus en culture remontent à 1979. Depuis des sociétés de biotechnologie, telles que *Genzyme Biosurgery*, ont vu le jour et produisent des épithéliums de culture pour les greffes. L'hôpital envoie au laboratoire quelques centimètres carrés d'échantillon de peau du patient, et après deux à trois semaines de culture, plus de un mètre carré d'épiderme est produit et peut être appliqué sur le patient. Cela indique que les kératinocytes se sont multipliés par 10 000. La qualité du système de culture des cellules et, en particulier, le maintien des kératinocytes souches, ceux qui conservent la capacité de régénérer l'épiderme tout au long de la vie, est primordiale pour assurer la prise des greffes et la pérennité de l'épiderme.

Le domaine d'application des peaux reconstruites en clinique concerne essentiellement le traitement des plaies chroniques, par exemple les ulcères de la jambe chez les sujets diabétiques ou les ulcères variqueux. Deux types de produits peuvent être utilisés : des cellules du patient (autologues) ou des cellules d'une autre personne (allogéniques). La Société *Organogenesis* produit de façon industrielle des peaux équivalentes allogéniques pour traiter les ulcères de jambe. Cette peau artificielle est composée d'un compartiment dermique et d'un compartiment épidermique. Appliquée sur la plaie, elle agit comme un pansement biologique. Elle libère des facteurs de croissance et stimule les propres cellules du patient : ces dernières se mettent à sécréter aussi des facteurs de croissance qui favorisent la cicatrisation et stimulent la multiplication des cellules du bord de la plaie et leur migration pour refermer l'ulcère.

La fabrication d'épiderme de culture à partir de cheveux épilés est un autre moyen intéressant d'obtention des peaux reconstruites. Les kératinocytes situés le long de la gaine externe du cheveu ont une grande capacité de multiplication, quel que soit l'âge du patient. Après plusieurs semaines de culture, il est possible d'obtenir des pétits



4. Les modèles de peau contenant des mélanocytes « bronzent » quand ils sont exposés aux ultraviolets, la coloration étant d'autant plus intense que l'exposition est prolongée (à droite).