

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

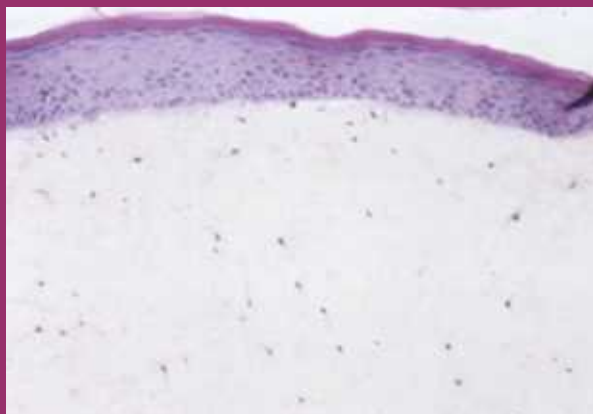
L'utilisation des épidermes reconstruits la plus remarquable est celle des épidermes utilisés pour le traitement des grands brûlés. Les premiers essais cliniques de greffes d'épithéliums autologues obtenus en culture remontent à 1979. Depuis des sociétés de biotechnologie, telles que *Genzyme Biosurgery*, 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.

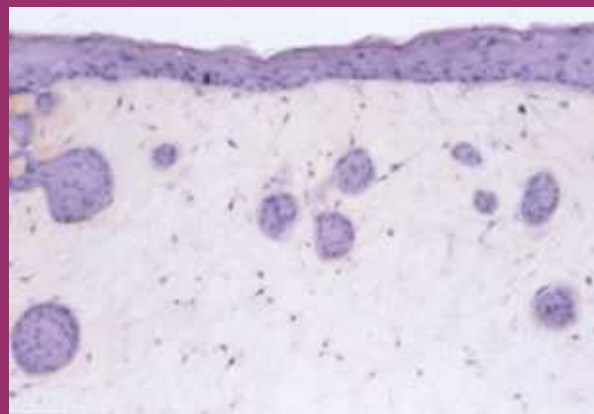
La fabrication d'épiderme de culture à partir de cheveux épilés est un autre moyen intéressant d'obtention des peaux reconstruites. Les kératinocytes situés le long de la gaine externe du cheveu ont une grande capacité de multiplication, quel que soit l'âge du patient. Après plusieurs semaines de culture,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



5. Comparée à une peau reconstruite normale (à gauche), la peau reconstruite avec des cellules d'un sujet atteint de la maladie génétique



Xeroderma pigmentosum (à droite) présente des invaginations de l'épiderme dans le derme. C'est le signe des phénomènes de cancérisation précoce.

épidermes de culture qui sont greffés sur les plaies et participent à la fermeture de l'ulcère. Ces modèles de peaux reconstruites sont aussi utilisés pour traiter les plaies aiguës qui apparaissent parfois après une intervention chirurgicale visant à retirer une zone de peau cancéreuse ou un tatouage.

À ce jour, la thérapie tissulaire à partir des peaux reconstruites a permis de sauver des milliers de vies humaines dans le cas des grands brûlés et a apporté de nouvelles façons de traiter les ulcères. Toutefois, la reconstruction n'est généralement ni parfaite ni complète. C'est pourquoi les biologistes étudient de nouveaux substrats qui facilitent la culture et la transplantation des épithéliums, par exemple des films de fibrine, et qui favorisent la réorganisation et la revascularisation du derme.

Les cellules souches, matériau de reconstruction de demain ?

Dans les tissus adultes, des cellules souches pluripotentes persistent. Elles assurent la survie et le renouvellement du tissu tout au long de la vie de l'individu. Capables d'autorenouvellement, elles donnent naissance à des cellules dont la capacité de prolifération est limitée et qui sont à la source de cellules différenciées. Les cellules souches épidermiques sont localisées au niveau du follicule pileux et dans l'épiderme interfolliculaire. Elles ont un important potentiel de prolifération *in vitro*. Aujourd'hui, les cellules souches sont difficiles à isoler parce qu'elles ne sont que partiellement caractérisées : elles n'expriment quasiment pas de marqueurs de surface à l'exception de certaines protéines d'adhérence qui les maintiennent à leur place. Disposer d'une carte d'identité plus précise des cellules souches épidermiques nous permettra de les sélectionner plus aisément. Bien qu'elles soient déjà engagées dans une voie de différenciation (celle des cellules de l'épiderme), elles conservent une plasticité notable. Ainsi sous l'influence de signaux dermiques appropriés, il est possible d'orienter leur différenciation en follicules pileux, en glandes sébacées et en glandes sudoripares.

Toutefois, la multiplication de ces cellules est régulée par un mécanisme naturel, une « horloge mitotique » qui limite le nombre possible des divisions cellulaires. Cette horloge est contrôlée par la perte progressive des séquences d'ADN situées à l'extrémité des chromosomes, les télomères. L'étude de cette horloge montre que le potentiel de division

des cellules est réduit lorsque les cellules sont multipliées en culture, et l'un des principaux enjeux du futur sera de décrypter et de maîtriser l'horloge mitotique de ces cellules.

Malgré les nombreuses similitudes entre la peau humaine normale et les modèles de peaux reconstruites, certaines limites existent, et, selon l'application, les paramètres à améliorer diffèrent. Dans le cas de l'utilisation de ces modèles pour des applications *in vitro*, il est nécessaire de renforcer la fonction barrière, et d'activer les enzymes responsables de la desquamation. Dans le cas des applications cliniques, les biologistes cherchent à optimiser le support de greffe en préparant le lit de greffe avec des pansements biologiques, et à développer un substrat dermique qui aura les propriétés élastiques du derme. Bien que des améliorations aient déjà été apportées au niveau du substrat dermique, la prise de greffe est toujours délicate, et l'aspect esthétique limité. Disposer des annexes cutanées, notamment des glandes sudoripares essentielles pour la régulation thermique et des follicules pileux, est un défi à relever.

L'ingénierie tissulaire de la peau progressera quand on maîtrisera mieux l'identification, l'isolement et la multiplication des cellules souches adultes, et le rôle de leur microenvironnement. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le vieillissement de la peau et une amélioration du traitement des grands brûlés en sont deux enjeux majeurs.

Corinne FERRARIS dirige l'équipe Nouveaux modèles du Département des peaux reconstruites des Laboratoires L'Oréal.

V. FACY et al., *Langerhans cells integrated into human reconstructed epidermis respond to known sensitizers and ultraviolet exposure*, in *J. Invest. Dermatol.*, vol. 122, pp. 552-553, 2004.

N. FORTUNEL et al., *Long-term expansion of human functional epidermal precursor cells: promotion of extensive amplification by low TGF- β 1 concentrations*, in *J. Cell Sciences*, vol. 116, pp. 4043-4052, 2003.

F. BERNERD et al., *Clues to epidermal cancer proneness revealed by reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin in vitro*, in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 98 (14), pp. 7817-22, 2001.

V. RONFARD et al., *Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on fibrin matrix*, in *Transplantation*, vol. 70, pp. 1588-1598, 2000.

C. FERRARIS et al., *Adult epidermal keratinocytes are endowed with pilosebaceous forming abilities*, in *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 41, pp. 491-498, 1997.

M. RÉGNIER et al., *Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis*, in *J. Invest. Dermatol.*, vol. 109, pp. 510-512, 1997.