



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -  
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

**THESE**

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 2 juin 2014

par

Mlle ARDISSON Oriane

Née le 12 décembre 1989

A Chartres

\*\*\*\*\*

**Intérêt des cellules souches du tissu adipeux sur la cicatrisation cutanée :  
Étude expérimentale chez la souris *nude***

\*\*\*\*\*

JURY

Mme BOLZINGER Marie-Alexandrine, Maître de Conférences

Mme DAMOUR Odile, Docteur en Pharmacie

Mme LEQUEUX Charlotte, Docteur en Pharmacie

Mme SIGAUDDO-ROUSSEL Dominique, Docteur en Sciences

M. MOJALLAL Ali, Docteur en Médecine

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président de l'Université M. François-Noël GILLY
- Vice-Président du Conseil d'Administration M. Hamda BEN HADID
- Vice-Président du Conseil Scientifique M. Germain GILLET
- Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire M. Philippe LALLE

### Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

#### SANTE

- UFR de Médecine Lyon Est Directeur : M. Jérôme ETIENNE
- UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux Directeur : Mme Carole BURILLON
- Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
- UFR d'Odontologie Directeur : M. Denis BOURGEOIS
- Institut des Techniques de Réadaptation Directeur : M. Yves MATILLON
- Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine Directeur : Anne-Marie SCHOTT

#### SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- Faculté des Sciences et Technologies Directeur : M. Fabien DE MARCHI
- UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) Directeur : M. Yannick VANPOULLE
- Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL) Directeur : M. Pascal FOURNIER
- I.U.T. LYON 1 Directeur : M. Christophe VITON
- Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA) Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
- ESPE Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**  
**ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon**  
**Directrice : Madame la Professeure Christine VINCIGUERRA**  
**Directeurs Adjointes : Madame S. BRIANCON, Monsieur P. LAWTON, Monsieur P. NEBOIS**  
**Madame S. SENTIS, Monsieur M. TOD**

**Directrice Administrative : Madame P. GABRIELE**

### **LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES**

#### **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE**

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)  
Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr - PAST)  
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)  
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU)  
Madame Christelle MACHON (AHU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)  
Madame Françoise FALSON (Pr)  
Monsieur Hatem FESSI (Pr)  
Madame Joëlle BARDON (MCU - HDR)  
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (MCU - HDR)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU - HDR)  
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)  
Monsieur Fabrice PIROT (MCU - PH - HDR)  
Monsieur Patrice SEBERT (MCU - HDR)

- **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU – PH)  
Madame Laurence HEINRICH (MCU)  
Monsieur David KRYZA (MCU – PH)  
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)  
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU - HDR)

#### **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE**

- **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)  
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)  
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)  
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**  
Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)
- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**  
Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)
- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**  
Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)  
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**  
Madame Alexandra CLAYER-MONTEBAULT (MCU)  
Monsieur François COMET (MCU)  
Monsieur Vincent GROS (MCU PAST)  
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**  
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)  
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)  
Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

#### **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT**

- **CHIMIE ORGANIQUE**  
Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)  
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)  
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)  
Madame Christelle MARMINON (MCU)  
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)  
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**  
Monsieur Roland BARRET (Pr)  
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)  
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)  
Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**  
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)  
Madame Isabelle KERZAON (MCU)  
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**  
Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)  
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)  
Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)  
Madame Catherine RIOUFOL (MCU - PH - HDR)

## DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

### - TOXICOLOGIE

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)  
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)  
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)  
Madame Léa PAYEN (MCU -HDR)

### - PHYSIOLOGIE

Monsieur Christian BARRES (Pr)  
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)  
Madame Kiao Ling LIU (MCU)  
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

### - PHARMACOLOGIE

Monsieur Bernard RENAUD (Pr)  
Monsieur Michel TOD (PU – PH)  
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)  
Madame Bernadette ASTIER (MCU - HDR)  
Monsieur Roger BESANCON (MCU)  
Madame Evelyne CHANUT (MCU)  
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)  
  
Monsieur Olivier CATALA (Pr PAST)  
Monsieur Pascal THOLLOT (MCU PAST)  
Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)

## DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

### - IMMUNOLOGIE

Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)  
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)  
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)  
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)

### - HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE

Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU - PH)  
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)  
Monsieur Olivier ROUALDES (AHU)

### - MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIE INDUSTRIELLES

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)  
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)  
Madame Florence MORFIN (PU – PH)  
Monsieur Didier BLAHA (MCU)  
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU)  
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)  
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU)  
Madame Ghislaine DESCOURS (AHU)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)  
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)  
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B**

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)  
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)  
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)  
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH)  
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)  
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)  
Monsieur Benoit DUMONT (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)  
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr - HDR)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Monsieur Patrice SEBERT (MCU – HDR)  
Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**

Madame Emilie BLOND  
Madame Christelle MOUCHOUX  
Madame Florence RANCHON

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Monsieur Eyad AL MOUAZEN 85<sup>ème</sup> section  
Monsieur Boyan GRIGOROV 87<sup>ème</sup> section  
Madame Mylène HONORAT 85<sup>ème</sup> section  
Monsieur Abdalah LAOUINI 85<sup>ème</sup> section  
Madame Marine CROZE 86<sup>ème</sup> section

**Pr : Professeur**

**PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier MCU : Maître de Conférences des Universités**

**MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier HDR : Habilitation à Diriger des Recherches**

**AHU : Assistant Hospitalier Universitaire**

**PAST : Personnel Associé Temps Partiel**

# REMERCIEMENTS

---

*Aux membres du jury :*

**A Mme Marie-Alexandrine BOLZINGER,**

Merci pour l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury de thèse. J'en profite également pour vous remercier de m'avoir accueillie dans votre laboratoire de Dermopharmacie et Cosmétologie à la fin de ma 4<sup>ème</sup> année de pharmacie. Une première expérience en recherche qui m'a donné envie de poursuivre dans ce domaine. J'en garde un très bon souvenir.

**A Odile DAMOUR,**

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre équipe et de m'avoir fait confiance en me proposant de travailler sur les sujets de thèse et de stage. Cette expérience a été très importante pour mon avenir professionnel et j'ai réellement aimé le travail que vous m'avez confié. Ces dix mois ont été très enrichissants et formateurs. Je vous remercie également pour votre soutien lors de ma recherche de stage de Master 2. Cette thèse est pour moi l'occasion de vous exprimer mon profond respect, ma reconnaissance et mon admiration pour vos compétences et votre rigueur scientifique.

**A Charlotte LEQUEUX,**

Travailler à tes côtés a été très agréable. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée en me confiant ce travail expérimental. Tu m'as formée et guidée avec beaucoup de patience et de gentillesse. Je te remercie pour ta disponibilité, ton aide et tes précieux conseils, notamment lors du choix de mon orientation et ma recherche de stage de Master 2. Sois assurée de toute ma reconnaissance et de mon amitié.

**A Dominique SIGAUDDO-ROUSSEL,**

Je vous remercie de m'avoir accueillie chaleureusement dans votre équipe, de votre implication et de votre aide dans l'analyse et l'interprétation des résultats. Soyez assurée de toute ma reconnaissance.

**A Ali MOJALLAL,**

Merci d'avoir accepté de prendre part à ce jury. Merci également de m'avoir prêté l'appareil photo pendant toute l'étude et de m'avoir permis d'assister à une opération chirurgicale dans votre bloc.



Merci à toute l'équipe du **laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique de Laennec** pour votre accueil. **Audrey**, tu as pris soin des animaux et a pris beaucoup de ton temps à la réalisation des expérimentations. Merci pour ta participation, ton aide et ta patience.

Merci à l'équipe du **laboratoire de physiologie de Rockefeller** pour votre accueil.

**Bruno** et **Charles**, je vous remercie chaleureusement pour votre aide, votre bonne humeur et votre gentillesse que vous m'avez témoignés lors de la réalisation des plaies, des soins et du suivi des souris.

A toute l'équipe du **laboratoire des Substituts Cutanés** :

**Elodie** et **Sandrine**, vous avez toujours été très disponibles et à l'écoute tout au long de ma présence au laboratoire. Un grand merci à toutes les deux de m'avoir formée, aidée et conseillée. C'était génial de travailler avec vous.

**Jonathan**, le pro du cyto(mètre). Sincères remerciements pour ta disponibilité, toute l'aide et les conseils que tu m'as apportés depuis ton arrivée au labo, à la fois pour les manips et l'analyse des résultats. Je te souhaite plein de réussites pour la suite.

**Cyrille**, merci pour l'aide que tu m'as apportée pendant ton passage au labo.

Je remercie également **Serge NATAF** pour son implication en cours de route dans ce travail. Merci aussi à **Clémentine** pour m'avoir apporté son aide dans la réalisation des analyses.

Et ma 5-AHU préférée ! Qu'aurais-je fais sans toi **Camille** ! Je n'aurais pas pu espérer mieux comme co-stagiaire. Notre entraide et notre solidarité à toute épreuve a été magique ! Tu respire la joie de vivre et tu as l'art de la communiquer. Merci pour tout ça.

Une grande pensée également à **Maïté, Véro, Amélie, Pascale, Céline,...**

La vie au laboratoire a été plus qu'agréable grâce à votre bonne entente générale, vos rires et sourires et votre complicité. Toutes ces heures passées en ZAC avec vous tous sont gravées dans ma mémoire !

Je remercie également **ma famille** pour leur soutien et leur encouragement tout au long de mes études. Spéciale dédicace à mon cher **Silver**...qui m'a gentiment prêté son ordinateur suite à la panne du mien au plus mauvais des moments.

Enfin, une pensée à **tous mes ami(e)s que j'ai rencontrés au cours de mes études**, Crousti, Camille, Jojo, Mymy, Alex, Emilie, Béa (binôome), Claire, Sonia, Céleste, Lisa, Nicolas, Céline,... avec qui j'ai partagé beaucoup plus qu'un simple amphi ou qu'une simple pipette tout au long de ces 6 années !

# SOMMAIRE

---

|  |           |
|--|-----------|
| LISTE DES ABREVIATIONS .....   | 11        |
| LISTE DES TABLEAUX .....   | 12        |
| LISTE DES FIGURES .....  | 13        |
| INTRODUCTION .....   | 14        |
| <b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....                                      | <b>17</b> |
| <b>1. PHYSIOLOGIE DE LA PEAU</b> .....                                   | <b>18</b> |
| <b>1.1. Epiderme</b> .....   | 18        |
| 1.1.1. Cellules caractéristiques : les kératinocytes .....               | 18        |
| 1.1.2. Kératinisation épidermique.....                                   | 20        |
| 1.1.3. Autres cellules de l'épiderme .....                               | 23        |
| <b>1.2. Jonction dermo-épidermique</b> .....                             | 24        |
| <b>1.3. Derme</b> .....  | 24        |
| <b>1.4. Hypoderme</b> .....  | 27        |
| <b>1.5. Vascularisation de la peau</b> .....                             | 27        |
| <b>2. LE TISSU ADIPEUX</b> .....   | <b>30</b> |
| <b>2.1. Composition</b> .....  | 30        |
| 2.1.1. Tissu adipeux médullaire.....                                     | 30        |
| 2.1.2. Tissu adipeux brun.....   | 30        |
| 2.1.3. Tissu adipeux blanc.....  | 31        |
| <b>2.2. Fonctions</b> .....  | 32        |
| 2.2.1. Barrière mécanique et thermique .....                             | 32        |
| 2.2.2. Régulation de l'homéostasie énergétique .....                     | 32        |
| 2.2.3. Organe endocrinien.....   | 34        |
| <b>3. LES CELLULES SOUCHES DU TISSU ADIPEUX</b> .....                    | <b>35</b> |
| <b>3.1. Les cellules souches mésenchymateuses (MSC)</b> .....            | 35        |
| 3.1.1. Définition .....  | 35        |
| 3.1.2. Le tissu adipeux comme source de MSC .....                        | 37        |
| <b>3.2. Propriétés des cellules souches du tissu adipeux (ASC)</b> ..... | 38        |
| 3.2.1. Caractérisation phénotypique.....                                 | 38        |
| 3.2.2. Capacité de différenciation.....                                  | 40        |
| 3.2.3. Activité paracrine.....   | 41        |
| <b>4. LA CICATRISATION CUTANEE</b> .....                                 | <b>41</b> |
| <b>4.1. Cicatrisation physiologique</b> .....                            | 41        |

|                             |   |           |
|-----------------------------|---|-----------|
| 4.1.1.                      | Phase vasculaire.....   | 42        |
| 4.1.2.                      | Phase inflammatoire .....   | 42        |
| 4.1.3.                      | Phase de prolifération .....  | 44        |
| 4.1.3.1.                    | Prolifération dermique.....   | 44        |
| 4.1.3.1.1.                  | Formation du tissu de granulation .....   | 44        |
| 4.1.3.1.2.                  | Angiogénèse .....   | 45        |
| 4.1.3.2.                    | Prolifération épidermique : réépithélialisation .....   | 47        |
| 4.1.4.                      | Phase de remodelage .....   | 47        |
| <b>4.2.</b>                 | <b>Cicatrisation anormale : les plaies chroniques.....</b>                                    | <b>48</b> |
| 4.2.1.                      | Facteurs de risques.....  | 48        |
| 4.2.2.                      | Exemples de plaies chroniques : les ulcères de jambes .....                                   | 50        |
| 4.2.2.1.                    | Physiopathologie.....   | 50        |
| 4.2.2.2.                    | Mécanismes de non cicatrisation .....   | 52        |
| 4.2.2.3.                    | Traitements actuels .....   | 54        |
| <b>5.</b>                   | <b>INTERET DES CELLULES SOUCHES ADULTES DANS LA CICATRISATION .....</b>                       | <b>56</b> |
| 5.1.                        | Etudes précliniques sur l'utilisation des ASC dans la cicatrisation.....                      | 56        |
| 5.2.                        | Rôles des ASC dans la cicatrisation .....   | 59        |
| 5.2.1.                      | Rôles sur la revascularisation cutanée.....   | 59        |
| 5.2.2.                      | Rôles dans la réparation cutanée.....   | 61        |
| <b>PARTIE EXPERIMENTALE</b> |   | <b>68</b> |
| <b>1.</b>                   | <b>MATERIELS ET METHODES .....</b>  | <b>70</b> |
| 1.1.                        | Obtention de la SVF et des ASC .....  | 70        |
| 1.1.1.                      | Recueil du tissu adipeux abdominal.....   | 70        |
| 1.1.2.                      | Extraction de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux et amplification des ASC ..... | 70        |
| 1.2.                        | Caractérisation phénotypique des cellules administrées .....                                  | 72        |
| 1.3.                        | Protocole expérimental <i>in vivo</i> chez la souris nude.....                                | 74        |
| 1.3.1.                      | Réalisation des plaies et administration des traitements.....                                 | 74        |
| 1.3.2.                      | Suivi des animaux et observations des plaies.....   | 75        |
| 1.3.2.1.                    | Suivi des animaux .....   | 75        |
| 1.3.2.2.                    | Observations macroscopiques et microscopiques de la cicatrisation.....                        | 77        |
| 1.4.                        | Laser Doppler Flowmetry (LDF) couplé à la iontophorèse.....                                   | 77        |
| 1.5.                        | Test de compression .....   | 80        |
| 1.6.                        | Analyses statistiques .....   | 82        |
| 1.7.                        | Analyses immunohistologiques des zones cicatricielles .....                                   | 82        |
| 1.7.1.                      | Coloration à l'HPS.....   | 82        |
| 1.7.2.                      | Marquage alpha-SMA .....  | 82        |
| 1.7.3.                      | Coloration au rouge sirius .....  | 83        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>2. RESULTATS</b> .....   | <b>84</b>  |
| <b>2.1. Caractérisation phénotypique des cellules administrées</b> .....                    | <b>84</b>  |
| <b>2.2. Suivi de l'expérimentation animale</b> .....  | <b>85</b>  |
| 2.2.1. Analyse de la perfusion du tissu cicatriciel .....                                   | 85         |
| 2.2.1.1. Laser Doppler Flowmetry (LDF) couplé à la iontophorèse .....                       | 85         |
| 2.2.1.2. Test de compression .....  | 87         |
| 2.2.2. Etude de la qualité du tissu cicatriciel obtenu : analyses immunohistologiques ..... | 89         |
| 2.2.2.1. Epaisseur du derme .....   | 89         |
| 2.2.2.2. Densité vasculaire .....   | 90         |
| 2.2.2.3. Etude qualitative des fibres de collagènes .....                                   | 90         |
| 2.2.3. Tolérance .....  | 92         |
| 2.2.4. Efficacité des cellules souches sur la cicatrisation .....                           | 92         |
| <b>DISCUSSION</b> .....   | <b>75</b>  |
| <b>CONCLUSION</b> .....   | <b>99</b>  |
| <b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....  | <b>102</b> |
| <b>ANNEXES</b> .....  | <b>114</b> |

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

ADN : Acide Désoxyribonucléique  
AH : Acide Hyaluronique  
ARNm : Acide Ribonucléique Messenger  
ASC : Adipose Derived Stem Cells  
ASC-CM : Adipose Derived Stem Cells- Cultured Medium  
CFU-F : Colony Forming Unit-Fibroblast  
EGF : Epidermal Growth Factor  
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
FDA : Food and Drug Administration  
FGF : Fibroblast Growth Factor  
GAG : Glycosaminoglycane  
HGF : Hepatocyte Growth Factor  
HLA : Human Leucocyte Antigen  
IFATs : International Federation for Adipose Therapeutics and Science  
IGF : Insulin Growth Factor  
IL : Interleukine  
ISCT : International Society for Cellular Therapy  
JDE : Jonction Dermo-Epidermique  
KGF : Keratinocyte Growth Factor  
MEC : Matrice Extra-Cellulaire  
MMP : Matrix Metallo Proteinase  
MSC : Mesenchymal Stem Cells  
MSC-CM : Mesenchymal Stem Cells- Cultured Medium  
PDGF : Platelet Derived Growth Factor  
PIGF : Placental Growth Factor  
PRP : Platelet Rich Plasma  
RT-PCR : Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction  
SMA : Smooth Muscle Actin  
SVF : Stromal Vascular Fraction  
TA : Tissu Adipeux  
TGF : Transforming Growth Factor  
TIMP : Tissue Inhibitor of Metallo-Protease  
TNF : Tumor Necrosis Factor  
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

# LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau I : Caractérisation phénotypique de la SVF et des ASC (en passage 3)

Tableau II : Etudes précliniques de la bibliographie des 5 dernières années sur le rôle des ASC dans la cicatrisation cutanée : modèles expérimentaux, types de plaies, produits administrés, résultats et indication potentielle

Tableau III : Répartition des traitements administrés aux groupes de souris

# LISTE DES FIGURES

---

Figure 1 : Structure de la peau

Figure 2 : Schéma représentatif de la kératinisation épidermique

Figure 3 : Schéma représentatif de la microcirculation cutanée

Figure 4 : Morphologie d'un adipocyte blanc

Figure 5 : Représentation schématique du tissu adipeux blanc

Figure 6 : Aspect des ASC en culture *in vitro* (passage 1)

Figure 7 : Représentation schématique et chronologie des différentes phases de la cicatrisation et différents évènements survenant

Figure 8 : Représentation schématique de l'angiogénèse

Figure 9 : Activité paracrine des cellules souches mésenchymateuses

Figure 10 : Rôle des MSC dans les différentes phases de la cicatrisation

Figure 11 : Schéma du déroulement expérimental

Figure 12 : Extraction des cellules souches

Figure 13 : Exemple type d'une plaie réalisée selon le modèle de Galiano utilisé dans notre étude

Figure 14 : Photographie du dispositif de mesure de la vasodilatation induite par l'Acétylcholine (ACh) par iontophorèse

Figure 15 : Mécanisme de vasodilatation induite par l'Acétylcholine et le SNP

Figure 16 : Disposition de l'aimant : (a) Modèle d'ulcère de pression d'après Wong et *al.* [141] (b) Représentation schématique de la pose de l'aimant

Figure 17 : Profil phénotypique de la SVF et des ASC en fin de P0, avant congélation (P1) et après congélation (P2)

Figure 18 : Réponse vasodilatatrice (%) dans les tissus cicatriciels après stimulation par l'ACh (a) et le SNP (b) comparés au niveau de base. (\*= $p < 0,05$  test de Mann-Whitney)

Figure 19 : Variation (%) du flux sanguin dans les tissus cicatriciels immédiatement après compression (a) et 24H après (b), comparés à la perfusion avant compression

Figure 20 : Variation de l'épaisseur du derme (%) des zones cicatricielles des différentes conditions par rapport à une zone saine

Figure 21 : Nombre moyen de vaisseaux dans le tissu cicatriciel après différents traitements

Figure 22 : Photographies de microscopie optique (x200) avec lumière polarisée après coloration au rouge Sirius des cicatrices d'un témoin positif (souris saine) (A), d'une plaie non traitée (B), d'une plaie traitée avec Cytocare (C), avec la SVF (D) et avec les ASC (E)

# INTRODUCTION

---



Aujourd'hui, les plaies chroniques sont devenues un problème majeur de santé publique. Leur incidence ne cesse d'augmenter en raison d'une population vieillissante et d'une augmentation de la survenue de maladies sous-jacentes. Dans le monde entier, 200 millions de plaies difficiles à traiter sont recensées chez les personnes âgées souffrant d'ulcères (ulcère diabétique, ulcère de pression ou d'origine vasculaire) [1]. Selon les estimations, environ 2% de la population des pays industrialisés sera touché par des blessures chroniques dans leur vie [2].

L'ulcère de jambe d'origine veineuse est la plaie chronique qui connaît la plus forte prévalence dans les pays occidentaux. Ces ulcérations chroniques, caractérisées par un schéma cyclique de cicatrisation et de récurrence ont un impact socio-économique important, tant en raison de la charge en soins médicaux qu'elles nécessitent que des arrêts de travail qu'elles entraînent [3]. Globalement, ces plaies chroniques sont responsables d'une altération importante de la qualité de vie.

La prise en charge de l'ulcère de jambe repose sur son traitement étiologique, la compression lorsqu'elle est d'origine veineuse et des techniques de revascularisation lorsqu'elle est artérielle (pontage, angioplastie). Malgré des soins appropriés, 50 à 60 % des ulcères de jambe d'origine veineuse nécessitent un délai de plus de 20 à 24 semaines pour parvenir à cicatrisation [3]. Malgré les conséquences médicales graves, aucune nouvelle entité chimique pour cicatriser les plaies chroniques les plus fréquentes n'a été homologuée par la Food and Drug Administration (FDA) depuis plus d'une décennie, en partie en raison de la difficulté à atteindre le critère d'évaluation de la FDA de « fermeture complète de la plaie » [4].

Les avancées de la médecine régénérative et du génie tissulaire ont apporté un grand espoir dans le domaine de la cicatrisation. Si les différents modèles appliqués sur la plaie tels que les feuillets épidermiques, les dermes équivalents contenant les fibroblastes dermiques sont efficaces dans les plaies aiguës (brûlures) [5], certaines plaies chroniques récidivent ou sont réfractaires à la plupart des traitements. En effet, les ulcères sont caractérisés par une mauvaise vascularisation de la plaie qui entraîne sa nécrose. C'est pourquoi, l'injection de cellules souches à fort potentiel angiogénique pourrait améliorer les atteintes vasculaires des plaies chroniques.

Le tissu adipeux est identifié comme étant une source riche en cellules souches mésenchymateuses multipotentes (MSC) appelées ASC (*Adipose derived Stem Cells*). Celles-ci ont une forte potentialité angiogénique et régénérative. En effet, elles ont des capacités de sécrétion de facteurs de croissance, d'immunomodulation mais aussi de régénération par leur capacité à se différencier *in vitro* entre autre, en cellules endothéliales, en cellules du derme (fibroblastes), et de l'épiderme (kératinocytes) [6].

Jusqu'à présent, la fraction stromale vasculaire (SVF ou *Stromal Vascular Fraction*) du tissu adipeux a été utilisée en injection notamment pour la réparation de tissus mésodermiques, ainsi que pour la revascularisation ou le traitement de l'ischémie des membres [7, 8, 9]. Cependant, la SVF est une suspension cellulaire hétérogène contenant un pourcentage faible de cellules souches (entre 1 et 3%). L'avantage principal des ASC cultivées par rapport à celui de la SVF est d'apporter un traitement maîtrisé par un nombre connu de cellules souches purifiées (>90%).

Chez l'animal, les ASC cultivées ont été montrées efficaces dans de nombreux modèles expérimentaux de cicatrisation. Récemment, le Laboratoire des Substituts Cutanés (LSC) a démontré dans une étude préliminaire qu'elles amélioraient la perfusion sanguine des zones cicatricielles, ce qui a permis de poser l'hypothèse que ces cellules agissaient par sécrétion de facteurs proangiogéniques ou bien par différenciation en cellules endothéliales.

Le but de ce travail est de confirmer cette stimulation de la perfusion sur un plus grand nombre d'animaux et de préciser le mécanisme d'action des ASC.

Afin de bien comprendre ce travail expérimental, nous ferons dans la partie bibliographique un rappel de la physiologie de la peau et du tissu adipeux considéré comme un réservoir de cellules souches adipeuses. Puis, nous détaillerons le processus de cicatrisation cutanée en précisant les mécanismes de non cicatrisation rencontrés dans les plaies chroniques, avant d'évoquer l'intérêt des cellules souches mésenchymateuses dans la cicatrisation cutanée.

# **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

# 1. PHYSIOLOGIE DE LA PEAU

Bien plus qu'une simple enveloppe de notre corps, la peau est l'organe le plus étendu de l'organisme représentant une surface de 1.5 à 2 m<sup>2</sup> et pesant environ 3 à 4 kg. D'architecture complexe, sa structure comprend, avec ses annexes, tous les tissus histologiques, sauf les tissus osseux et cartilagineux. Elle se subdivise en quatre régions superposées qui sont de la superficie vers la profondeur, l'épiderme, la jonction dermo-épidermique, le derme et l'hypoderme [10,11] (Figure 1).

Elle est considérée comme un véritable organe imperméable qui assure de multiples fonctions fondamentales :

- **Protectrice**, contre les traumatismes mécaniques (chocs, pression, frottement...), thermiques, et chimiques. Elle assure en permanence son propre renouvellement et sa réparation en cas de blessure. Riche en cellules immunologiques, elle participe à la défense de l'organisme contre les agressions infectieuses.
- **Thermorégulatrice**, elle régule la température corporelle par sudation et vasomotricité et par la présence de graisse sous-cutanée.
- **Métabolique**, elle synthétise de la vitamine D sous l'influence des rayons ultraviolets B et constitue une réserve énergétique grâce au tissu adipeux sous cutané constituant l'hypoderme.
- **D'échange**, de par sa perméabilité elle permet l'absorption transcutanée de différentes molécules et limite les déperditions hydriques.
- **Sensorielle**, elle contient des récepteurs tactiles, nociceptifs et thermiques [12].

## 1.1. Epiderme

L'épiderme dérive de l'ectoderme et a pour fonction principale la protection de l'organisme. Il est décrit comme un épithélium de revêtement, stratifié, pavimenteux et kératinisé dont l'épaisseur est d'environ 100 µm mais celle-ci varie selon la localisation anatomique (il est plus fin au niveau des paupières et plus épais au niveau des paumes et plantes de pieds où il peut atteindre 1 millimètre), l'âge (il devient plus fin en vieillissant) et le sexe (il est plus épais chez l'homme) [11,14].

### 1.1.1. Cellules caractéristiques : les kératinocytes

Les cellules caractéristiques de l'épiderme sont les kératinocytes, qui représentent 80% des cellules.

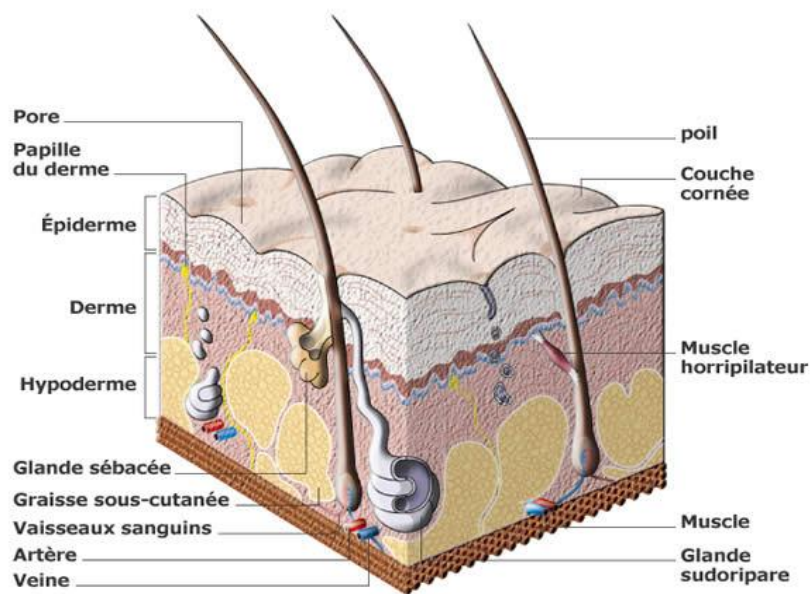


Figure 1 : Structure de la peau [13]

Ils se répartissent dans 5 couches dénommées de la profondeur à la superficie : la couche basale (*stratum basale*), la couche spineuse ou corps muqueux de Malpighi (*stratum spinosum*), la couche granuleuse (*stratum granulosum*), la couche claire (*stratum lucidum*, présente uniquement dans les peaux épaisses) et la couche cornée (*stratum corneum*).

Cette stratification correspond aux changements de forme et d'aspect des kératinocytes lorsqu'ils migrent en se différenciant de la profondeur vers la superficie de l'épiderme. Les deux couches les plus internes (couche basale et spineuse) constituent les couches germinatives de l'épiderme. Les cellules de la couche basale peuvent soit entrer dans un processus irréversible de différenciation qui les amènera à la desquamation, soit proliférer en subissant une mitose continue qui assure le renouvellement de la peau en 27 jours et la compensation des pertes en surface. Les cellules migrant progressivement vers la surface meurent du fait de la différenciation progressive, et deviennent des cornéocytes à partir de la couche granuleuse [12].

Ce processus de différenciation, qui aboutit à la formation de la couche cornée est couramment appelé « **kératinisation** ». Les nombreuses kératines fabriquées par les kératinocytes sont des protéines fibreuses du cytosquelette, insoluble à l'eau (*i.e* hydrophobes), qui confèrent une certaine résistance et cohésion à l'épiderme [15].

### 1.1.2. Kératinisation épidermique

Au cours de leur migration au sein de l'épiderme, les kératinocytes deviennent riches en organites cellulaires (d'où leur aspect basophile), et contiennent des grains de mélanine (mélanosomes). Des tonofilaments de kératine (figure 2 (2), (3)) s'organisent en faisceaux dans leur cytoplasme et permettent l'ancrage des kératinocytes basaux à la matrice extracellulaire basale par les « hémidesmosomes » et des kératinocytes entre eux par les « desmosomes » (Figure 2(4)).

La **couche basale** de l'épiderme est formée de trois populations de cellules basales aux fonctions différentes :

- les cellules souches de l'épiderme, multipotentes, à haut potentiel prolifératif, particulièrement abondantes au niveau des crêtes épidermiques interpapillaires et aussi en région supérieure des follicules pileux. Elles peuvent migrer hors de leur « niche » en cas de lésion et permettent la reconstitution de l'épiderme [15].

- les cellules amplificatrices ou d'amplification transitoire, issues des cellules souches, sont unipotentes et capable de se diviser avant d'entrer dans le compartiment de différenciation ; ces cellules se situent le long de la jonction dermoépidermique.

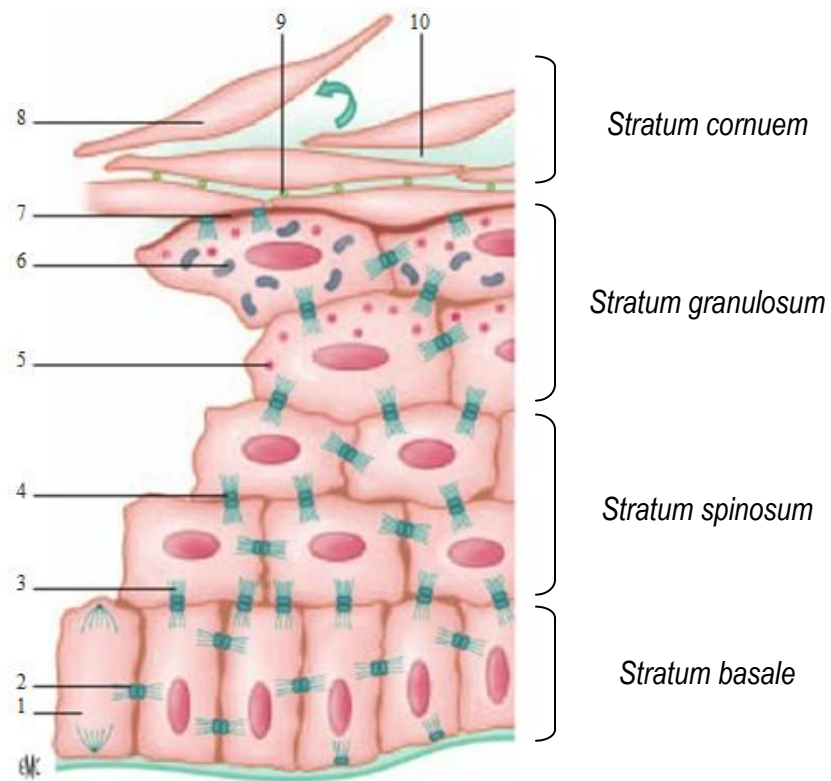


Figure 2 : Schéma représentatif de la kératinisation épidermique [15]  
 (1) cellules souches ; (2) et (3) : filaments de kératine; (4) desmosomes ; (5) corps lamellaires ;  
 (6) grains de kératohyaline; (7) enveloppe cornée ; (8) cornéocytes ; (9) cornéodesmosomes ;  
 (10) ciment lipidique

Elles forment une seule assise de cellules cylindriques, relativement claires, au cytoplasme et au noyau allongé implantées perpendiculairement sur la membrane basale.

- les cellules post-mitotiques qui restent en position basale.

En quittant la membrane basale, les kératinocytes perdent leur capacité de division cellulaire, migrent et entament leur programme de différenciation dans la **couche spinieuse**. Leur cytoplasme contient des mélanosomes et un nombre de tonofilaments plus important que celui des cellules basales [10,11].

Progressivement, le cytoplasme et le noyau des kératinocytes s'aplatissent, leur grand axe devenant parallèle à la jonction dermo-épidermique. C'est l'apparition de granules denses basophiles, appelés « grains de kératohyaline » (figure 2 (6)) dans le cytoplasme des kératinocytes qui définit la couche suivante, dite **couche granuleuse**. Ils sont formés par les dépôts de profilaggrine, précurseur de la filaggrine, protéine matricielle des cornéocytes [10,15].

La **couche cornée**, compacte en profondeur au contact de la couche granuleuse et desquamante en surface, est constituée, selon la localisation, de 4 à 20 couches de cellules aplaties totalement kératinisées et dépourvues de noyaux et d'organites, les cornéocytes [10,11]. Les desmosomes sont modifiés, notamment au niveau de leur ligne dense extracellulaire qui s'épaissit, ils prennent alors le nom de cornéodesmosomes (figure 2(9)). Ceux-ci sont détruits dans les parties les plus superficielles de la couche cornée, par l'action de diverses enzymes glycolytiques et protéolytiques, permettant aux cornéocytes de perdre leur adhérence au fur et à mesure qu'ils approchent de la surface de l'épiderme, puis de desquamer, un par un, de façon ordonnée et invisible à l'œil nu [11].

Bien que l'épiderme contienne approximativement 70% d'eau, le *stratum corneum* n'en contient que 15%. C'est lors de la transformation des cellules granuleuses en cellules cornéennes qu'intervient cette perte hydrique accompagnée de l'autolyse du contenu cytoplasmique et des noyaux. L'hydratation de la couche cornée est cependant assurée par la filaggrine qui se dégrade en de nombreux acides aminés hydrophiles, et confère aux cornéocytes un aspect condensé via la réticulation des filaments de kératine permettant la rétention d'eau [14].

Les kératinosomes ou corps lamellaires (figure 2(5)), déchargent leur contenu cellulaire dans les espaces intercellulaires, notamment des lipides (céramides, cholestérol, acide gras) qui s'organisent en bicouches multiples et scellent les espaces entre les cornéocytes, jouant un rôle de **ciment intercellulaire** (figure 2(10)) pour permettre la cohésion cellulaire et l'étanchéité de la couche cornée [11,15].



La fonction barrière de la couche cornée est renforcée à sa surface par l'existence d'un film invisible. Ce film hydrolipidique est constitué de sueur et de sébum (formé de cellules sébacées matures éclatées : tryglycérides, squalène, cholestérol,...) et assure l'acidité de la peau, la rend pratiquement imperméable à l'eau et est le support de la flore cutanée [15].

### 1.1.3. Autres cellules de l'épiderme

L'épiderme est également constitué d'autres types de cellules spécialisées, dispersées entre les kératinocytes, telles que :

#### - **les mélanocytes**

D'aspect dendritique et exclusivement situés dans la couche basale de l'épiderme, ils assurent la synthèse des mélanines (phéomélanines et eumélanines) au sein d'organites spécialisés, les mélanosomes. Leur corps cellulaire est situé entre les kératinocytes basaux de l'épiderme et leurs prolongements dendritiques entre les kératinocytes supra-basaux. L'ensemble forme une unité de mélanisation (1 mélanocyte pour 36 kératinocytes basaux et supra-basaux).

Les mélanines sont responsables de la pigmentation « constitutive » de la peau (les phéomélanines étant des pigments jaunes-rouges et les eumélanines, des pigments brun-noirs) qui s'oppose à la pigmentation « facultative » communément appelée bronzage qui apparaît après irradiation par les ultraviolets : les mélanosomes sont transférés aux kératinocytes supra-basaux via leurs prolongements dendritiques, formant un écran au dessus des noyaux des kératinocytes protégeant ainsi leur ADN des rayonnements. Le bronzage correspond à une augmentation de synthèse des eumélanines, suivie d'une augmentation du nombre des mélanosomes et de leur persistance dans les couches superficielles de l'épiderme [10].

#### - **les cellules immunocompétentes (cellules de Langerhans et lymphocytes)**

Les cellules de Langerhans représentent 3 à 8% des cellules épidermiques et sont situés le plus souvent au niveau de la couche granuleuse. Elles appartiennent au groupe des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T.

Leur fonction est de capturer les exoantigènes par endocytose, de les apprêter et de les exposer à leur surface en association avec les molécules de classe II du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Elles migrent ensuite à travers l'épiderme, puis le derme vers le système lymphatique, gagnent le cortex profond des ganglions lymphatiques, où elles prennent le nom de cellules interdigitées, et présente alors l'antigène sous forme de peptide, activant ainsi les lymphocytes T.

## - les cellules de Merkel

Ce sont des cellules neuro-épithéliales qui sont ubiquitaires mais irrégulièrement réparties dans l'épiderme interfolliculaire. Elles sont situées entre les kératinocytes basaux, au contact d'une terminaison nerveuse et ont une fonction de mécanorécepteur. Ces cellules sont particulièrement abondantes au niveau des lèvres, des paumes, de la pulpe des doigts et du dos des pieds [10].

## 1.2. Jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique (JDE) sépare l'épiderme du derme et forme une ligne ondulée, fine et homogène, de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, où alternent les saillies de l'épiderme dans le derme dites "crêtes épidermiques" et les saillies du derme dans l'épiderme dites "papilles dermiques" [10].

Examinée de l'épiderme vers le derme, elle comprend :

- la *lamina lucida*, de 20 à 40 nm d'épaisseur, constituée d'intégrines et de laminines,
- la *lamina densa*, d'épaisseur variable avec l'âge (30 à 60 nm), constituée majoritairement de collagène de type IV et de laminines.

Ces éléments constitutifs (laminines, intégrines, collagène) permettent le maintien de l'intégrité dermo-épidermique.

En plus de cette ultrastructure basique, la jonction dermo-épidermique présente au niveau des kératinocytes basaux des complexes d'ancrage du côté de l'épiderme, les hémidesmosomes, et des fibres d'ancrage du côté de derme (collagène de type VII) formant des plaques qui piègent le collagène (type I et III) du derme [10].

Elle assure ainsi une fonction de support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme au derme, de barrière sélective permettant le contrôle des échanges moléculaires et cellulaires entre les deux compartiments, ainsi qu'un rôle fondamental de support pour l'adhésion et la migration des kératinocytes lors de la réépidermisation pendant le processus de cicatrisation cutanée.

## 1.3. Derme

Le derme est un tissu conjonctivo-élastique dont le rôle de soutien est essentiel, donnant à la peau sa consistance. Il dérive d'un feuillet embryonnaire différent de celui de l'épiderme, le mésoderme.

Les principales fonctions de la peau précédemment citées sont en partie assurées par le derme puisqu'il renferme les vaisseaux sanguins et lymphatiques, les cellules immunitaires, les fibres nerveuses et les récepteurs sensoriels.

L'épaisseur moyenne du derme est de 1 à 2 mm et varie en fonction de l'âge (augmentation au cours de l'enfance et de l'adolescence, puis stabilisation et diminution après 50 ans), et de la topographie : le derme du dos des paumes et des plantes est plus épais que celui des membres et des paupières [10, 11].

Il se compose de deux couches très différentes :

- en surface, le *stratum* papillaire ou derme papillaire ;
- en profondeur, le *stratum* réticulaire ou derme réticulaire qui représente les quatre cinquièmes du derme [11].

**Le derme papillaire** est solidement rattaché à la couche basale de l'épiderme par les papilles conjonctives qui permettent d'augmenter considérablement la surface d'échanges épiderme-derme et de s'adapter aux étirements [12].

Le derme papillaire renferme des fibres de réticuline et de collagène lâches, fines, isolées et disposées verticalement ou obliquement par rapport au plan de la membrane basale. Il contient également l'arborisation terminale du réseau élastique, des fibroblastes, des cellules d'origine hématopoïétique, les anses capillaires terminales et des terminaisons nerveuses. [10,11,16].

**Le derme réticulaire** est moins cellulaire et plus épais que le derme papillaire. Il est composé d'un réseau très dense de fibres épaisses de collagène et d'élastine qui s'entrecroisent et qui s'orientent parallèlement à la surface cutanée [12]. Il contient aussi de petites artérioles et veinules, des petits nerfs, des follicules pilo-sébacés (sauf au niveau des paumes et des plantes) et les canaux excréteurs des glandes sudorales [10].

Quel que soit la localisation, le derme est constitué de cellules fixes et de cellules mobiles auxquelles s'associent des macromolécules qui entrent dans la composition de la matrice extracellulaire (MEC) [14].

#### ➤ *Cellules du derme*

Les cellules sont plus abondantes au niveau du derme papillaire que du derme réticulaire.

- Les fibroblastes, cellules fusiformes qui se différencient en fibrocytes et dont le rôle est la synthèse du collagène, de l'élastine et des glycoprotéines entrant dans la constitution de la matrice extracellulaire [11].

- Les cellules migratrices, impliquées dans les mécanismes de défense : lymphocytes, mastocytes, macrophages, monocytes et polynucléaires éosinophiles.

➤ *Matrice extracellulaire*

La MEC est un assemblage d'eau, de sels minéraux et de macromolécules qui lient les cellules dermiques et les organisent en tissu [17]. Ces macromolécules sont regroupées en quatre catégories :

- **les fibres de collagènes**, dont le rôle est de résister à la tension des tissus. Il en existe 27 types, mais dans le derme, les types I (fibres de collagène) et III (fibres de réticuline) sont prédominants (60 à 80% et 15 à 25% respectivement) [10,17]. Le type I, plus que le type III est responsable de la majeure partie de la tension élastique du corps. Les filaments de collagène sont constitués d'unités de tropocollagène arrangés de manière très ordonnée. Ces filaments se combinent entre eux pour former des fibrilles, qui s'agrègent pour former les fibres de collagène [18]. Le derme contient aussi du collagène VI à proximité des lames basales vasculaires.

- **les fibres élastiques**, qui assurent l'élasticité du tissu conjonctif et s'organisent en réseau. Elles sont composées d'une protéine, l'élastine, qui possède une résistance physique modulable : elle peut s'allonger ou se rétrécir [11].

- **les polysaccharides** : protéoglycanes et glycosaminoglycanes (GAG). Les protéoglycanes sont formés par un noyau protéique sur lequel sont liées une à plusieurs dizaines de chaînes GAG. Le principal GAG est l'acide hyaluronique, composant essentiel de la MEC qui participe aux propriétés visco-élastiques de la peau, jouant un rôle d'amortisseur et de régulateur de la tension de la peau. L'acide hyaluronique a également un rôle pivot dans la cicatrisation [17,19].

- **les glycoprotéines de structure**, dont la fibronectine, qui jouent un rôle majeur dans l'adhérence des différents constituants de la matrice avec les cellules ou entre eux, et les laminines qui contrôlent l'adhésion, la prolifération, la différenciation et la polarisation des cellules avec lesquelles elles interagissent.

La MEC est un ensemble dynamique, en constant remodelage lors de processus physiologiques comme la cicatrisation où elle permet la migration des cellules inflammatoires. En plus de participer à l'architecture, le soutien mécanique, la nutrition, et le stockage moléculaire de la peau, elle a un rôle majeur dans les interactions avec et entre les cellules, en générant et transmettant de nombreux signaux qui régulent l'ensemble du comportement cellulaire (survie, division, différenciation, migration) [17].

Enfin, le derme contient des vaisseaux, des nerfs et du tissu musculaire (tissu musculaire lisse des muscles érecteurs des poils et tissu musculaire strié squelettique au niveau du visage (muscle paupiers)). Il renferme également les annexes de la peau qui sont d'origine épidermique (poils, glandes sébacées et sudorales) [10,14].

## 1.4. Hypoderme

L'hypoderme est le compartiment le plus profond et le plus épais de la peau. Ce tissu graisseux est traversé par des fibres nerveuses et richement irrigué par la circulation sanguine. Il est constitué de lobes, divisés eux-mêmes en lobules graisseux, séparés par des cloisons conjonctives de collagène et d'élastine issues du derme qui se fixent aux muscles et aux os, et permettent le passage des nerfs et des vaisseaux.

Son abondance dépend du sexe et des régions du corps ; chez l'homme, il se situe préférentiellement en position abdominale, alors que chez la femme, il est prédominant au niveau des hanches, des cuisses, des fesses ou de la partie basse de l'abdomen. Il est absent au niveau des paupières, des oreilles et des organes génitaux masculins [10].

C'est ce tissu graisseux qui nous intéresse et que nous allons développer par la suite et expliquer son intérêt dans la médecine régénérative.

## 1.5. Vascularisation de la peau

Le réseau vasculaire cutané est extrêmement abondant et participe à l'oxygénation et à la nutrition des différentes structures de la peau qu'il irrigue. Il participe aussi, par contrôle du débit sanguin, au maintien de la thermorégulation et de la pression artérielle [11, 12].

Comme nous l'avons évoqué, la circulation cutanée siège exclusivement dans le derme et l'hypoderme. Aucun vaisseau ne pénètre dans l'épiderme dont les besoins métaboliques (nutriments, oxygène) sont assurés par diffusion à travers la jonction dermo-épidermique depuis les vaisseaux sanguins du derme, qui représente un véritable tissu nourricier.

La vascularisation de la peau est variable selon la région anatomique. Cependant, l'organisation générale est la même. L'apport de sang **artériel** provient des artères sous-cutanées, eux même résultant de gros troncs artériels, et cheminent en profondeur parallèlement à la surface cutanée et envoient des collatérales dans les septa de l'hypoderme.

Au niveau de la jonction dermo-hypodermique, ces artères s'entrelacent et forment le plexus profond (figure 3 (2)). De ce plexus partent des artéioles, plus fines, qui montent dans le derme et forment, à la jonction des dermes réticulaire et papillaire, le plexus superficiel (figure 3 (3)). De ce dernier naissent les capillaires artériels qui se distribuent dans les papilles dermiques et se prolongent par les capillaires veineux en formant une anse capillaire (Figure 3 (4))

L'architecture de la circulation **veineuse** est semblable et parallèle à la circulation artérielle (capillaires papillaires, plexus superficiel, plexus profond, veines sous-cutanées).

La régulation du débit sanguin est assurée par les glomus neurovasculaires de Masson, constitués d'anastomoses artério-veineuses (ou shunts artério-veineux) entourées de fibres nerveuses et musculaires lisses (figure 3 (5)). La perfusion sanguine est régulée de façon directe par le système nerveux sympathique (dont la stimulation entraîne une vasoconstriction), et de manière indirecte par certains stimuli mécanique (le grattage), physique (la température) ou chimique (la pression partielle en oxygène, en gaz carbonique, ou le pH) [11,12].

L'**endothélium** joue également un rôle clé dans l'autonomie vasomotrice des microvaisseaux. La cellule endothéliale a une action de vasorégulation par libération notamment d'endothéline vasoconstrictive, et de prostacyclines (PGI<sub>2</sub>) et monoxyde d'azote (NO), vasodilatatrices.

Le processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés à partir de vaisseaux préexistants ou de progéniteurs endothéliaux circulants est appelé « **angiogénèse** ». Il faut le distinguer de la « vasculogénèse », processus qui correspond à la différenciation *in situ* de précurseurs mésenchymateux (angioblastes) en cellules endothéliales et la formation d'un réseau primitif de structures vasculaires.

Ces progéniteurs circulants sont mobilisés à partir de la moelle osseuse et attirés sur le site où s'effectue la néovascularisation. C'est un processus physiologique normal crucial qui se produit au cours du développement embryonnaire, et chez l'adulte lors de la croissance des tissus (développement des muscles, du tissu adipeux), de la placentation, du cycle ovarien, et du processus de régénération tissulaire post-lésionnelle.

Ce processus est complexe et contrôlé par une panoplie de facteurs de croissance pro-angiogéniques et anti-angiogéniques sécrétés dans leur environnement extracellulaire et agissant de façon paracrine sur les vaisseaux environnants. Le contrôle de l'équilibre entre ces facteurs est très important et sa dérégulation entraîne des pathologies graves, puisqu'ils sont alors impliqués dans la croissance des tumeurs malignes et le développement des métastases.

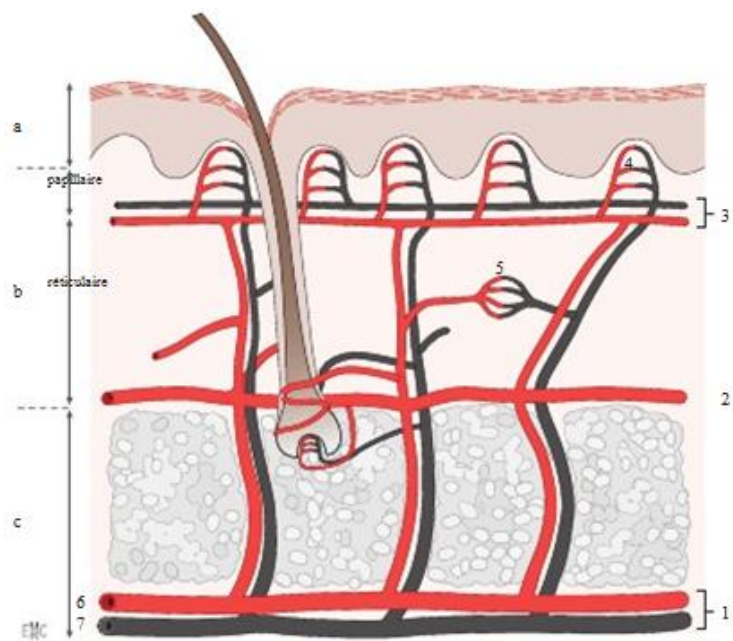


Figure 3 : Schéma représentatif de la microcirculation cutanée [11]

1. Vaisseaux sous-cutanés ; 2. plexus vasculaire dermique profond ; 3. plexus vasculaire dermique superficiel ; 4. anse capillaire ; 5. glomus de Masson ; 6. artère ; 7. veine.  
 a. épiderme ; b. derme ; c. hypoderme.

## 2. LE TISSU ADIPEUX

### 2.1. Composition

Le tissu adipeux (TA) se développe durant le dernier trimestre de la vie intra-utérine et dérive du feuillet mésodermique de l'embryon. Il est parmi les tissus les plus importants du corps humain puisqu'il peut atteindre 15 à 25% du poids total, et jusqu'à 50% dans les cas d'obésité morbide. Qualitativement, le TA possède deux fonctions principales au sein de l'organisme. Premièrement, il joue un rôle primordial dans le stockage et la libération des lipides, gérant ainsi les réserves énergétiques de l'organisme selon les besoins et les approvisionnements. Deuxièmement, c'est un organe endocrinien qui synthétise et sécrète des adipokines, qui peuvent agir au niveau local ou systémique et influencer tous les autres organes impliqués dans la physiologie [20].

Chez les mammifères, trois types de tissus adipeux sont classiquement distingués morphologiquement et fonctionnellement : le tissu adipeux médullaire, le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc, qui nous intéresse particulièrement.

#### 2.1.1. Tissu adipeux médullaire

Les cellules caractéristiques du tissu adipeux sont les adipocytes. Dans le tissu adipeux médullaire, ils sont présents en périphérie des espaces médullaires de la moelle osseuse laissant le centre de l'espace au tissu hématopoïétique. Ils sont à la fois source d'énergie, de facteurs de croissance, de cytokines et de produits lipidiques qui participent aux processus hématopoïétiques.

Chez l'adulte, la moelle rouge, à forte activité hématopoïétique, contient des adipocytes uniloculaires dispersés. Au cours du vieillissement, la moelle rouge, dite active, évolue vers un phénotype de moelle jaune dans laquelle le processus hématopoïétique s'est arrêté. Cette moelle jaune est constituée en grande majorité par des adipocytes [21].

#### 2.1.2. Tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun est présent chez tous les mammifères à l'exception du porc. Ce tissu est localisé majoritairement autour des gros troncs artériels et des organes vitaux (coeur, rein). Bien que cela soit controversé, il semblerait qu'il soit présent que chez les nouveau-nés et se convertirait en tissu adipeux blanc au cours des semaines qui suivent la naissance.



Cependant, chez des animaux exposés au froid (hibernants, rongeurs), les adipocytes bruns persistent et apparaissent en nombre important au sein des dépôts adipeux blancs. La même observation a été faite chez l'Homme (présence d'adipocytes bruns chez des bûcherons exposés au froid) [22].

Les adipocytes bruns sont petits (environ 15 à 50  $\mu\text{m}$ ) et possèdent un noyau central et un cytoplasme contenant plusieurs gouttelettes lipidiques ainsi que de nombreuses mitochondries [21].

Le rôle de ce tissu est spécifique, il participe de manière active au phénomène de thermogénèse dite de non-frisson, par opposition à la production de chaleur assurée par le frissonnement musculaire.

L'activité thermogénique est sous le contrôle du système nerveux, qui innerve le tissu brun par des fibres nerveuses sécrétant de la noradrénaline. Dans les mitochondries des adipocytes bruns, ce neuromédiateur stimule d'une part la lipolyse afin de générer des acides gras qui seront oxydés et serviront de substrat pour la production de chaleur. D'autre part, il augmente l'expression et l'activité de la protéine découplante UCP1 (*Uncoupling Protein 1* ou thermogénine), exprimée dans les mitochondries, qui va dissiper le gradient de protons afin de produire de la chaleur plutôt que de l'ATP. La chaleur est alors évacuée vers les diverses zones de l'organisme grâce aux nombreux vaisseaux qui irriguent le tissu adipeux brun [23].

### 2.1.3. Tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc se développe principalement après la naissance et représente la majeure partie du tissu adipeux total, soit 10 à 15 kg chez un jeune individu adulte de poids moyen.

Sa masse peut varier de manière considérable en fonction du statut énergétique de l'organisme et dans les situations pathologiques comme l'obésité ou la cachexie.

Il existe sous une forme diffuse constituée de cellules plus ou moins isolées (par exemple, le tissu adipeux intramusculaire) et une forme de dépôts localisés dans différents sites anatomiques sous-cutanés (fesses, abdomens, cuisses) ou profonds [21].

Les cellules caractéristiques de ce tissu sont les adipocytes blancs qui sont des cellules sphériques, d'un diamètre d'environ 100 microns (Figure 4). Elles possèdent une grosse inclusion (gouttelette) lipidique uniloculaire constituée de triglycérides, et sont entourées par une mince couronne cytoplasmique contenant un appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique granulaire et lisse, des mitochondries et un noyau aplati. Une fine membrane basale entoure la membrane plasmique.

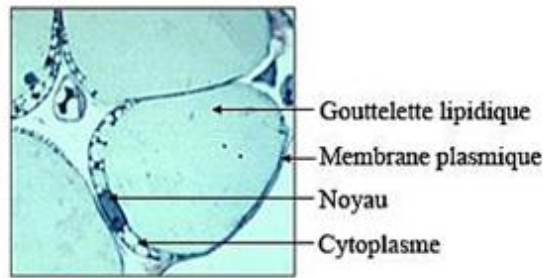


Figure 4 : Morphologie d'un adipocyte blanc [24]

Le tissu adipeux blanc est aussi composé de cellules précurseurs (les préadipocytes), de capillaires sanguins, de terminaisons nerveuses, de tissu conjonctif, de cellules fibroblastiques et de cellules hématopoïétiques dont les macrophages (Figure 5).

*In vitro*, les cellules du tissu adipeux blanc peuvent être séparées après digestion enzymatique en deux populations : les adipocytes matures et la fraction stromale vasculaire ou *Stromal Vascular Fraction* (SVF) contenant entre autre des cellules souches d'origine mésenchymateuse. Nous détaillerons ce dernier point par la suite.

## 2.2. Fonctions

Longtemps considéré comme un simple tissu de remplissage, il a été négligé par les scientifiques mais il est maintenant avéré que le tissu adipeux agit en collaboration au sein d'un véritable organe adipeux qui contribue de façon significative à la régulation de l'homéostasie.

### 2.2.1. Barrière mécanique et thermique

Le tissu adipeux est en premier lieu considéré comme un isolant thermique contre l'agression par le froid, et un amortisseur de chocs mécaniques (paumes des mains, plantes des pieds).

### 2.2.2. Régulation de l'homéostasie énergétique

La fonction de réserve énergétique du tissu adipeux blanc est assurée par les adipocytes. Au sein de leur vacuole, ils constituent un stock d'énergie sous forme de triglycérides qu'ils vont pouvoir mobiliser en fonction des besoins métaboliques de l'organisme.

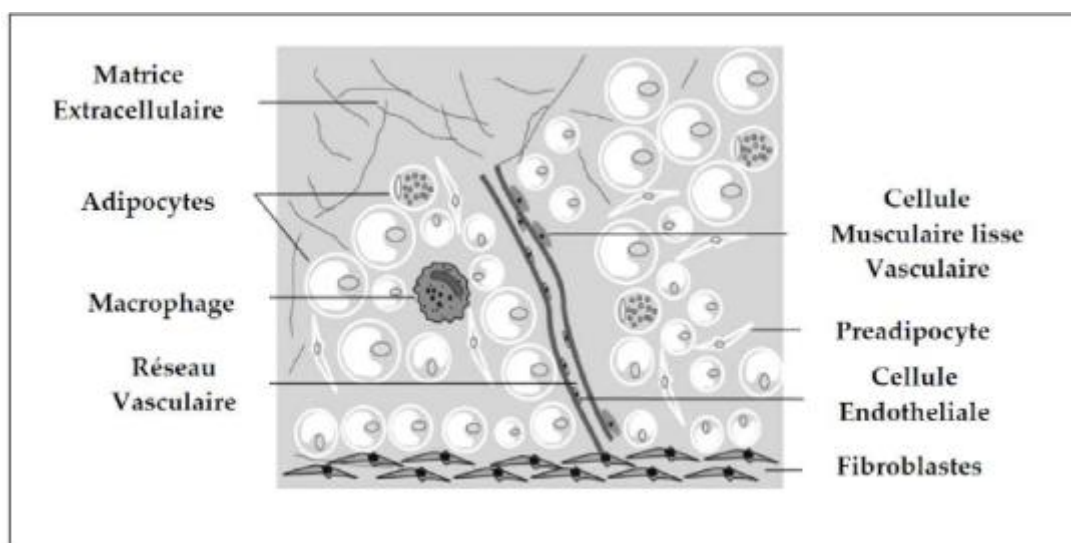


Figure 5 : Représentation schématique du tissu adipeux blanc [23]

Lorsque les apports caloriques sont supérieurs aux dépenses, les adipocytes sont capables de stocker d'énormes quantités d'acides gras sous forme de triglycérides (TG), c'est la lipogenèse. A l'inverse, dans les situations physiologiques où les besoins énergétiques sont importants (période inter prandiale, exercice physique, stress, exposition au froid), le catabolisme des TG libère de l'énergie sous forme d'acides gras libres et de glycérol, c'est la lipolyse. Ces processus sont régulés par des hormones, des cytokines et d'autres facteurs impliqués dans le métabolisme énergétique [21].

### 2.2.3. Organe endocrinien

Le TA apparaît aujourd'hui comme un véritable organe endocrinien capable d'intégrer des signaux hormonaux venant de différentes parties de l'organisme et d'y répondre en sécrétant ses propres peptides de signalisation appelés adipokines.

C'est la découverte de la leptine, en 1994 par Zhang et ses collaborateurs, qui a révélé la fonction sécrétoire du tissu adipeux [25]. Depuis, de très nombreux facteurs synthétisés par les adipocytes ont été découverts. Ceux-ci agissent par voie autocrine et/ou paracrine (cytokines) ou au niveau systémique par une action endocrine (libération d'hormones). La capacité sécrétoire et le profil des sécrétions de l'adipocyte varient au cours de la différenciation adipocytaire et avec l'inflammation du tissu adipeux associée à l'obésité [22].

Deux protéines sont principalement sécrétées par l'adipocyte : la leptine et l'adiponectine.

➤ La production de leptine est proportionnelle à la masse adipeuse et donc à la quantité des réserves énergétiques de l'organisme. De ce fait, elle a une fonction « d'adipostat » pour le système nerveux central qui régule la prise alimentaire et la dépense énergétique. En effet, en réponse à l'augmentation des réserves adipeuses, elle agit au niveau de l'hypothalamus et provoque l'arrêt de la prise alimentaire en inhibant l'action du neuropeptide Y, qui dans les conditions normales stimule la prise alimentaire. A l'inverse, une diminution des réserves adipeuses va réduire la sécrétion de leptine entraînant une reprise alimentaire.

De plus, la leptine joue un rôle important dans la fonction de reproduction, la réponse inflammatoire et l'angiogénèse (augmentation de la perméabilité vasculaire). Elle participe également à la régulation des hormones endocrines (hormones de croissance, hypophysaires, thyroïdiennes, surrénaliennes, sexuelles) [26,27].

➤ L'adiponectine agit sur plusieurs tissus cibles (muscles, foie, cellules endothéliales, cellules hématopoïétiques). Elle augmente leur sensibilité à l'insuline (propriété anti-diabétique), améliore la fonction endothéliale et a des propriétés anti-inflammatoires (lui conférant la propriété d'antiathérogène) [28].

Les nombreuses autres substances sécrétées jouent un rôle dans les régulations métaboliques (glucidique et lipidique), neuroendocriniennes, immunitaires et cardiovasculaires.

Parmi ces substances,

- la résistine, l'interleukine 6 (IL-6), et le facteur de nécrose tumorale alfa (TNF- $\alpha$ ), cytokines potentiellement impliquées dans l'insulino-résistance et l'inflammation
- l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1), agent antifibrinolytique
- l'angiotensinogène et l'angiotensine II, impliqués dans la régulation de la pression artérielle
- le TGF-  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), facteur angiogénique

Cependant, la grande majorité de ces adipokines ne sont pas spécifiques du tissu adipeux, comme le TNF- $\alpha$  et l'interleukine 6 (IL-6) sécrétés par les cellules du système immunitaire, et la plupart d'entre elles, produites par le tissu adipeux, proviennent des cellules non adipeuses telles que les macrophages [28,29].

### 3. LES CELLULES SOUCHES DU TISSU ADIPEUX

#### 3.1. Les cellules souches mésenchymateuses (MSC)

##### 3.1.1. Définition

Les cellules souches, existant dans un état indifférencié, sont des cellules capables de **s'auto-renouveler** générant des cellules filles identiques pour maintenir le pool de cellules souches, et de se **différencier** en lignées cellulaires multiples (progéniteurs ayant un potentiel plus restreint).

On parle alors de différenciation asymétrique puisque après chaque division cellulaire, une cellule se renouvelle alors que l'autre entre en différenciation et acquiert les caractéristiques du tissu concerné.

Les cellules souches sont uni-, multi- ou pluripotentes. Seul le zygote est considéré comme totipotent puisque capable de produire toutes les cellules et tissus de l'organisme.

Les cellules pluripotentes produisent des cellules et tissus appartenant aux trois feuilletts embryonnaires (ectoderme, endoderme et mésoderme), c'est le cas des cellules souches embryonnaires. Les cellules souches adultes peuvent être unipotentes (production d'un seul type cellulaire), ou multipotentes, c'est-à-dire pouvant se différencier en différentes lignées cellulaires selon le tissu dans lequel elles résident.

Les cellules souches ont un fort potentiel prolifératif et participent à la régénération et à la réparation durant le développement foetal et le phénomène de cicatrisation chez l'adulte [30].

La découverte des cellules souches mésenchymateuses a été initiée par les travaux de Friedenstein et *al.* en 1968 [31] qui ont montré que les cellules issues de moelle osseuse de rat contenaient une petite population de cellules stromales adhérentes au plastique capables de former des colonies de type fibroblastique. Ces cellules ont tout d'abord été nommées *Colony-Forming Unit Fibroblast* (CFU-F).

Par la suite, dans les années 1980, plusieurs équipes ont démontré leur capacité à se différencier en des cellules appartenant aux lignées du mésenchyme (un tissu de soutien embryonnaire dérivant du mésoderme et à l'origine de certains tissus chez l'adulte comme les vaisseaux, le cartilage ou le squelette), telles que les chondrocytes, les adipocytes et les ostéoblastes. Le terme « cellule souche mésenchymateuse » a ensuite été introduit par Caplan en 1991 [32].

Dans un souci d'harmonisation, l'*International Society for Cellular Therapy* (ISCT) a décidé en 2006 de dénommer ces cellules sous le terme de *multipotent Mesenchymal Stromal Cells* et de déterminer des critères minimums pour les définir [20] :

- l'adhérence au plastique sous des conditions de culture standard,
- la présence d'antigène spécifique à leur surface à plus de 90% : CD73 (5'ectonucleotidase), CD90 (thy-1), CD105 (endoglin) ; et au moins 98% d'entre elles n'expriment pas les marqueurs hématopoïétique suivants : CD45, CD34, CD14, CD19, CD11a et HLA-DR
- la capacité *in vitro* de donner naissance à des lignées cellulaires dérivées du mésenchyme telles que les adipocytes, les osteoblastes et les chondrocytes.

Les MSC de la moelle osseuse (BM-MSK pour *Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells*) ont constitué une référence puisqu'elles ont été les premières décrites et utilisées dans le domaine de la médecine régénérative. Cependant, la récupération de ces cellules souches présente des contraintes pratiques, notamment une douleur au site de récupération, nécessitant parfois une anesthésie générale, ce qui présente des risques [6]. De plus, la moelle osseuse contient peu de cellules souches : alors que l'aspirat de moelle osseuse permet de récupérer environ 6 million de cellules nucléés par millilitre, seulement 0.001 à 0.01% seraient des cellules souches.

D'autres sources de cellules souches multipotentes existent, notamment le tissu adipeux, la peau, le foie, l'intestin, les muscles, le tissu synovial, le tissu pulmonaire, le sang de cordon ombilical, ou encore la cornée [33,34].

### 3.1.2. Le tissu adipeux comme source de MSC

L'étude des cellules souches du tissu adipeux a débuté en 2001 où une équipe de chercheurs ont mis en évidence la présence d'une fraction cellulaire de type fibroblastique dans le lipoaspirat de l'homme qui a la capacité de se différencier en cellules des lignées mésodermiques [35]. Elles ont alors été appelées « *Processed Lipoaspirate Cells* » ou « PLA cells », car elles proviennent du lipoaspirat obtenu par chirurgie esthétique. Aujourd'hui, elles sont récupérées à partir de la graisse, normalement considérée comme un déchet médical et jetée après une opération chirurgicale telle que la liposuction ou la dermolipéctomie abdominale. La liposuction permet de récupérer entre cent millilitres et plusieurs litres de graisses. A titre d'exemple, 10 à 100 millions de cellules souches peuvent être obtenues à partir de 300 millilitres de lipoaspirat dont plus de 90% seraient viables [36].

Le tissu adipeux a ainsi été suggéré comme étant une source idéale et fiable de cellules souches puisque inépuisable, comparativement à la moelle osseuse ou au cordon ombilical. Dans le tissu adipeux, la quantité estimée de progéniteurs cellulaires, basés sur les CFU-F est au moins 500 fois plus importante que celle de la moelle osseuse. De plus, le prélèvement est peu invasif et nécessite simplement une anesthésie locale [37].

Comme nous l'avons mentionné, ces cellules souches sont isolées après digestion enzymatique du tissu adipeux, qui permet l'obtention de la SVF, une fraction hétérogène qui est constituée d'un sous-ensemble de cellules telles que [36] :

- des préadipocytes, cellules relativement immatures qui se différencient en adipocytes
- des cellules vasculaires et endothéliales participant à la néovascularisation du TA et permettant ainsi son développement,
- des péricytes,
- des cellules d'origine hématopoïétique (macrophages, lymphocytes, cellules souches hématopoïétiques),
- des cellules nerveuses (innervation principalement sympathique dont le neurotransmetteur est la noradrénaline régulant, en outre, la lipolyse),
- des fibroblastes,
- des cellules souches mésenchymateuses.

La culture de la SVF dans le temps et dans des conditions définies (milieu de culture nutritif) permet d'éliminer la plupart de ces cellules, résultant en une population composée principalement de cellules souches. En effet, parmi la population cellulaire de la SVF, les cellules souches sont adhérentes au plastique, il est alors possible de les isoler et les maintenir *in vitro* afin de les multiplier (Figure 6).

Un grand nombre de cellules souches peut être obtenu en peu de passages. Ainsi, le risque d'anomalies chromosomiques liées à la sénescence et induites par la culture est peu élevé [20]. De plus, il est possible de conserver les cellules congelées et d'en constituer des stocks importants. Enfin, leur utilisation ne pose pas de problèmes éthiques particuliers, contrairement aux cellules souches d'origine embryonnaire par exemple.

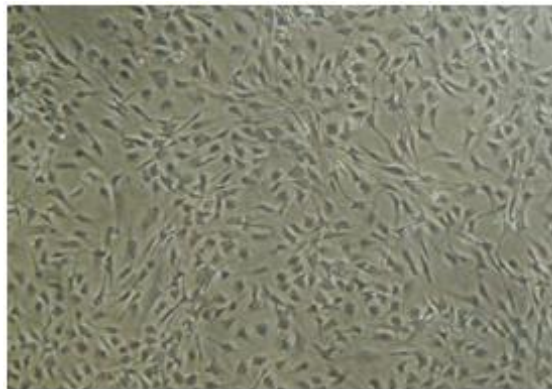


Figure 6 : Aspect des ASC en culture *in vitro* (passage 1)

Depuis leur découverte, des milliers d'articles ont été publiés utilisant plusieurs terminologie, telles que les *adipose-derived stem cells* (ADSCs), *adipose-derived adult stem cells* (ADAS), *adipose-derived mesenchymal stem cells* (AD-MSCs), *adipose MSCs* (AMSCs) et *adipose stromal/stem cells* (ASC). Dans le but d'éviter toute confusion, l'IFATs (*International Federation for Adipose Therapeutics and Science*) a défini le terme ASC pour « *Adipose-derived Stem Cells* » qui réfère ainsi à des cellules stromales multipotentes adhérentes au plastique, isolées à partir de la SVF [38].

## 3.2. Propriétés des cellules souches du tissu adipeux (ASC)

### 3.2.1. Caractérisation phénotypique

Les cellules souches du TA présentent de nombreux antigènes de surface (enzymes ou glycoprotéines). Le tableau I représente les principaux marqueurs exprimés par les ASC et par les cellules contenues dans la SVF.

Tout comme les MSC de la moelle osseuse et comme l'a décrit l'ISCT, elles sont caractérisées par l'expression de CD73, CD90, et CD105 [39]. Certains auteurs ont montré qu'elles exprimaient également à plus de 97% le HLA-ABC [40].

Cependant, le marquage de ces cellules est délicat, car il n'existe pas de marqueur membranaire spécifique à ce jour, la plupart étant également exprimés par d'autres types cellulaires.



**Tableau I :** Caractérisation phénotypique de la SVF et des ASC (en passage 3), adapté de H.Mizuno et al [43]

| Marqueurs     | Type de protéine     | Nom alternatif   | SVF | ASC |
|---------------|----------------------|--|-----|-----|
| <b>CD9</b>    | Molécule d'adhésion  | MRP-1<br>(Motility-related protein)                      | +   | +   |
| <b>CD10</b>   | Enzyme de surface    | NEP<br>(neutral endopeptidase)                           | +   | +/- |
| <b>CD13</b>   | Enzyme de surface    | ANPEP<br>(alanyl membrane amino-peptidase)               | +   | +   |
| <b>CD14</b>   | Enzyme de surface    | LPS-receptor<br>(lipopolysaccharide receptor)            | +   | -   |
| <b>CD24</b>   | Molécule d'adhésion  | HSA<br>(Heat Stable Antigen)                             | +   | -   |
| <b>CD29</b>   | Molécule d'adhésion  | Integrin $\beta$ 1                                       | +   | +   |
| <b>CD31</b>   | Molécule d'adhésion  | PECAM-1<br>(Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) | -   | -   |
| <b>CD34</b>   | Molécule d'adhésion  | HPCA-1<br>(Hematopoietic Progenitor Cell Antigen)        | +   | +/- |
| <b>CD44</b>   | Molécule d'adhésion  | ECMR-II<br>(Extracellular Matrix Receptor)               | +   | +   |
| <b>CD45</b>   | Enzyme de surface    | PTPRC<br>(Proteine Tyrosine Phosphatase Receptor)        | -   | -   |
| <b>CD49d</b>  | Molécule d'adhésion  | Integrin $\alpha$ 4                                      | +   | +   |
| <b>CD71</b>   | Récepteur            | TFR<br>(Transferrin Receptor)                            | +   | +   |
| <b>CD73</b>   | Enzyme de surface    | Ecto 5' nucleotidase                                     | +   | +   |
| <b>CD86</b>   |                      | B7-2   | +   | -   |
| <b>CD90</b>   | Molécule d'adhésion  | Thy1<br>(Thymocyte-1)                                    | +   | +   |
| <b>CD105</b>  | Molécule d'adhésion  | Endogline  | +/- | +   |
| <b>CD106</b>  | Molécule d'adhésion  | VCAM-1<br>(Vascular Cell Adhesion Protein)               | -   | +/- |
| <b>CD144</b>  | Molécule d'adhésion  | VE-Cadherin  | -   | -   |
| <b>CD146</b>  | Molécule d'adhésion  | MCAM<br>(Melanoma Cell Adhesion Molecule)                | -   | +   |
| <b>CD166</b>  | Molécule d'adhésion  | ALCAM  | +/- | +   |
| <b>HLA-DR</b> | Récepteur de surface | /  | +   | -   |

Malgré quelques différences de ce profil décrites entre les auteurs, il y a un consensus général sur le fait que les ASC sont positifs pour CD13, CD29, CD44, CD49d, CD73, CD90, et CD105, et négatifs pour la majorité des antigènes hématopoïétiques comme CD14, CD31, CD45, et CD144 [38].

De plus, leur profil phénotypique change selon le nombre de subculture. En effet, la présence de certains marqueurs comme le CD14, HLA-DR ou CD34 détectés dans la SVF, diminue au fur et à mesure de la culture. Par contre, d'autres marqueurs tels que le CD63, CD73, CD90, CD105 ou CD166, initialement peu exprimés, augmentent significativement avec les passages successifs [41].

Cependant, l'expression de certains marqueurs tels que le CD34 et la molécule d'adhésion CD106 sont controversées. En effet, une étude démontre que l'expression du CD34 peut être maintenue pendant 20 semaines de culture alors qu'il est jusqu'à présent admis que son expression est rapidement perdue *in vitro* [42]. De même, deux rapports prouvent que le CD106 est légèrement exprimé dans des cultures d'ASC alors que d'autres affirment qu'il n'est jamais exprimé [43].

### 3.2.2. Capacité de différenciation

De nombreuses études ont montré la capacité des ASC à se différencier *in vitro* en plusieurs types cellulaires. En effet, après exposition à un environnement approprié, elles sont capables d'apporter des facteurs de croissance permettant de se différencier en divers types cellulaires d'origine mésodermique : myocytes, ostéocytes, adipocytes, chondrocytes, cellules cardiaques et endothéliales. Étonnamment, les ASC ont également le potentiel de se différencier *in vitro* en cellules d'origine non mésodermique : (i) ectodermique : cellules épidermiques (kératinocytes) et neuronales (oligodendrocytes, cellules de Schwann) ; (ii) mais aussi endodermiques : hépatocytes et îlots pancréatiques [43,44].

Une théorie a ainsi été proposée postulant que ces cellules seraient pluripotentes et pas seulement multipotentes puisque capables de générer des cellules issues des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) [44].

L'engagement des ASC vers un type cellulaire est influencé par des facteurs de transcription spécifique du tissu. Par exemple, le PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ) induit leur différenciation en adipocyte [45].

Les ASC possèdent également un potentiel de migration. Après une injection systémique, les ASC peuvent se diriger vers des tissus en réponse à des signaux, qui sont potentialisés dans un contexte lésionnel, et peuvent recruter des cellules souches endogènes. Bien que les mécanismes par lesquels les ASC traversent la couche de cellules endothéliales et s'intègrent aux tissus sont encore mal connus, des chimiokines et leurs récepteurs seraient impliqués [43].

Ainsi, les nombreuses voies de différenciation des ASC permettraient de concevoir la reconstruction fonctionnelle de n'importe quel tissu mais il n'est toutefois pas démontré qu'une telle pluripotence existe *in vivo*.

### 3.2.3. Activité paracrine

Les principaux effets des ASC sont médiés par une activité paracrine. Le profil de sécrétion des ASC identifié par dosages ELISA ou Western Blot dans les milieux de culture des ASC *in vitro*, est composé de nombreux facteurs de croissance tels que le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), l'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), l'IGF (*Insuline-like Growth Factor*), le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), le PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), le TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*), et le TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*) [48].

La sécrétion de ces facteurs dépend de certaines conditions, telles que l'inflammation, qui augmente l'expression de facteurs angiogéniques (VEGF, HGF,...) et inflammatoires (TNF- $\alpha$ ,...) *in vitro* ou l'hypoxie, qui favorise la sécrétion de facteurs angiogéniques et antiapoptotiques (IGF) [8].

De nombreuses protéines (collagènes, protéines du complément, ...) sont également sécrétées [47].

Ces effets paracrines peuvent être fonctionnellement classés comme angiogéniques, immuno-modulateurs, anti-oxydants, anti-fibrotiques et chimioattracteurs, conférant ainsi aux ASC un réel intérêt dans la régénération tissulaire et le processus de cicatrisation [20].

## 4. LA CICATRISATION CUTANEE

### 4.1. Cicatrisation physiologique

La cicatrisation est l'ensemble des phénomènes physiologiques naturels aboutissant à partir d'une plaie à la restauration de la structure cutanée par un tissu conjonctif et épithélial cicatriciel.

Il s'agit d'un processus dynamique comprenant trois phases qui interagissent les unes avec les autres et se chevauchent. Au cours de la première phase vasculaire et inflammatoire, qui dure de 0 à 3 jours, un caillot de fibrine se crée dans la plaie, tandis que sont recrutées des cellules inflammatoires qui assureront par la suite la détersion de la plaie. La deuxième phase (3 à 12 jours) est celle de la réparation tissulaire dermique et épidermique aboutissant au tissu de granulation dermique, à l'épithélialisation de la plaie et à la formation d'un nouveau réseau sanguin (angiogénèse).

La dernière phase est celle du remodelage de la matrice extracellulaire et de la maturation de la cicatrice qui peut durer plusieurs mois voire même quelques années [48]. Chacune de ces phases est contrôlée et régulée par des substances biologiquement actives que sont les facteurs de croissance. Ces derniers sont sécrétés par les thrombocytes, les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes.

Une représentation schématique et chronologique des différentes phases de la cicatrisation est présentée sur la figure 7.

#### 4.1.1. Phase vasculaire

Lorsqu'une blessure survient, la réaction doit être rapide de façon à limiter l'entrée d'agents pathogènes et la perte de liquides physiologiques. Dans un premier temps, la mise à nu du sous-endothélium vasculaire due à la lésion provoque une vasoconstriction transitoire immédiate pour favoriser l'**hémostase** [50]. Dans ce même but, les plaquettes adhèrent au site de la plaie par l'intermédiaire du facteur de Willebrand, de la thrombine, du fibrinogène ainsi que du collagène extravasculaire. Ceci aboutit à un « thrombus blanc » (ou clou plaquettaire), composé d'un amas de plaquettes, de fibrine et fibronectine, constituant une protection temporaire et efficace de la plaie.

La dégranulation des plaquettes activées entraîne la libération de nombreuses cytokines et facteurs de croissance. Les deux principaux facteurs de croissance libérés par les plaquettes sont le PDGF et le TGF- $\beta$ . Le PDGF initie la chimiotaxie des cellules inflammatoires (neutrophiles et macrophages), ainsi que des cellules musculaires lisses et des fibroblastes. Le TGF- $\beta$  attire également les macrophages et les stimule afin qu'ils sécrètent d'autres cytokines et facteurs de croissance tels que le TNF $\alpha$ , l'IL-1 (*Interleukin-1*), le FGF (*Fibroblast Growth Factor*), le PDGF, ainsi que l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) et l'IGF-1 également sécrétés par les plaquettes [48,51].

L'ensemble de ces signaux entraîne une production plus importante de matrice par les cellules afin d'assurer un dépôt rapide d'un nouveau tissu conjonctif sur le site de la blessure durant les phases inflammatoire et proliférative [48].

#### 4.1.2. Phase inflammatoire

Après une vasoconstriction rapide, succède une vasodilatation accompagnée d'une augmentation de la perméabilité vasculaire, permettant aux cellules circulantes d'affluer sur le site de la plaie. Cette vasodilatation est médiée par plusieurs facteurs dont l'histamine, certains dérivés du complément (C3a et C5a) activés par les plaquettes et les prostaglandines [50].

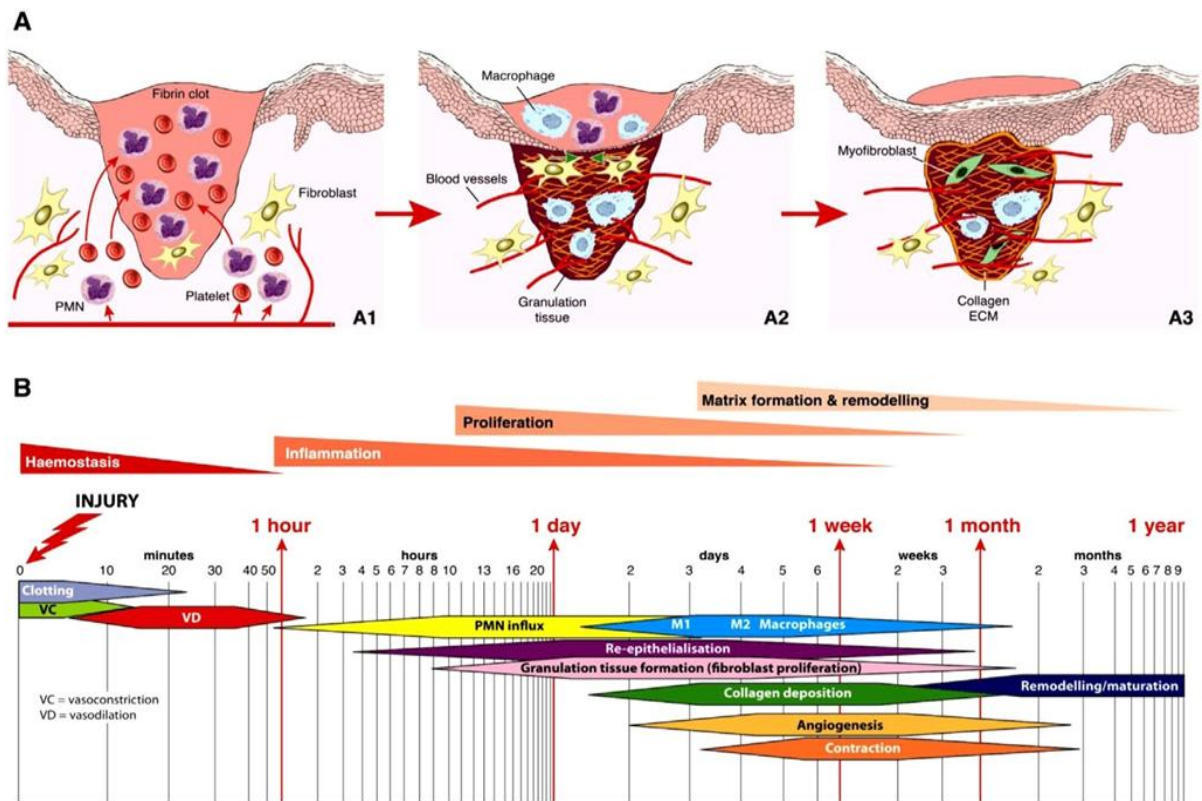


Figure 7 : A) Représentation schématique des phases vasculaires et inflammatoires (A1), proliférative (A2) et de remodelage (A3) B) Chronologie des différentes phases de la cicatrisation et différents évènements survenant [49]. PMN : *polymorphonucléaires neutrophiles* ; ECM : *matrice extracellulaire*.

Les neutrophiles et les monocytes sont attirés dans la plaie par des chimioattractants tels que les facteurs libérés par les plaquettes mais aussi par des peptides bactériens, des facteurs du complément et des produits de dégradation de la fibrine [52]. Ils migrent par diapédèse de la circulation sanguine vers la plaie, à travers le revêtement endothélial des capillaires adjacents au site de la plaie.

Une fois dans le tissu, les monocytes se différencient en macrophages et adhèrent aux protéines de la matrice extracellulaire [52]. Ils exercent une activité phagocytaire anti-infectieuse permettant l'élimination de cellules non fonctionnelles, de neutrophiles remplis de bactéries, de débris étrangers et de bactéries qui restent sur le site de la plaie. Ils sont également une source essentielle de cytokines (précédemment citées) qui amplifient la réponse inflammatoire et stimulent la prolifération des fibroblastes, la production de collagène et plus généralement la formation du tissu de granulation, dans la phase de prolifération [48]. Ainsi, les macrophages ont un rôle pivot dans la transition entre la phase inflammatoire et la phase de réparation tissulaire.

#### 4.1.3. Phase de prolifération

##### 4.1.3.1. Prolifération dermique

###### 4.1.3.1.1. Formation du tissu de granulation

Dès la fin de la première phase, la réparation tissulaire débute. Un nouveau tissu dermique appelé « **tissu de granulation** » se forme. Il est composé de vaisseaux sanguins nouvellement formés et d'une matrice riche en fibroblastes, myofibroblastes, cellules inflammatoires (macrophages) et cellules endothéliales [50].

En effet, les fibroblastes, dont la source dérive des fibrocytes du tissu conjonctif environnant et de l'adventice périvasculaire [50], migrent vers l'intérieur de la plaie et synthétisent une nouvelle matrice extracellulaire dermique composée de fibronectine, de collagène de type III et de polysaccharides (protéoglycanes, glycosaminoglycanes ou GAG) en réponse à la sécrétion du TGF- $\beta$  par les macrophages, les plaquettes et lymphocyte T [53]. Les GAG (acide hyaluronique, chondroïtine-4-sulfate, heparine sulfate) forment un gel appelé « substance fondamentale » qui joue un rôle important dans le dépôt et l'agrégation des fibres de collagène.

Dans le même temps, le TGF- $\beta$  diminue la sécrétion de protéases responsables de la détérioration de la matrice et stimule les inhibiteurs de protéases ou TIMP (*Tissue Inhibitor of Metallo-Protease*) [48]. Alors que la nouvelle matrice est synthétisée, la matrice existante dans et autour des bords de la plaie est dégradée par différentes enzymes comme les métalloprotéinases sécrétées par les fibroblastes (collagénase ou MMP-1, gelatinase ou MMP-2) favorisant ainsi la migration cellulaire [54,55].

Enfin, environ deux semaines après la blessure, les fibroblastes acquièrent un phénotype myofibroblastique (induit par le TGF- $\beta$ ), caractérisé par la présence de microfilaments d'actine leur conférant un pouvoir contractile, rapprochant les bords de la blessure de façon à faciliter le comblement de l'espace lésé [50, 52]. La libération de la tension mécanique après la fermeture de la plaie envoie des signaux d'arrêt de la contraction de la plaie, qui s'achève environ au 21<sup>ème</sup> jour [55].

#### 4.1.3.1.2. Angiogénèse

L'importante activité métabolique au site de la plaie induit un besoin croissant en oxygène et en nutriments. L'expansion microvasculaire est hautement régulée et influencée par des interactions locales entre les cellules matricielles et par des facteurs locaux, tels qu'un niveau bas du pH et de l'oxygène, qui initient la libération par les kératinocytes, les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales de médiateurs solubles (VEGF, FGF-2, TGF- $\beta$ , etc.) nécessaires à un nouvel approvisionnement sanguin.

Le processus d'angiogénèse se caractérise par une phase d'activation suivie d'une phase de maturation (figure 8).

Au cours de la première phase, sous l'effet de médiateurs inflammatoires et angiogéniques (NO (monoxyde d'azote), histamine, VEGF,...), la vasodilatation des capillaires résidant dans les marges de la plaie entraîne une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales. Les facteurs de croissance libérés par les macrophages attirés sur le site (FGF-2), stimulent les cellules endothéliales qui libèrent l'activateur du plasminogène et de la procollagénase. La plasmine et la collagénase ainsi générées digèrent les membranes basales, facilitant l'extravasation des cellules endothéliales et leur migration dans l'espace périvasculaire [52]. Les intégrines, induites par le FGF-2 et exprimées par les cellules endothéliales activées, facilitent leur adhésion à la MEC et leur migration [56].

La masse de cellules endothéliales ayant migré à la surface externe des capillaires et veinules, appelée bourgeons endothéliaux, forme une lumière. Leur allongement, s'effectuant par le biais de divisions mitotiques, va alors former une structure tubulaire.

Le VEGF, sécrété par une panoplie de médiateurs cellulaires (macrophages, cellules endothéliales, fibroblastes...), est le principal acteur de ce processus qui se produit environ 7 jours après la lésion [49]. La différenciation des cellules endothéliales, médiée notamment par le TGF- $\beta$ , permet aux capillaires néoformés de s'anastomoser les uns aux autres et d'acquérir leur architecture fonctionnelle.

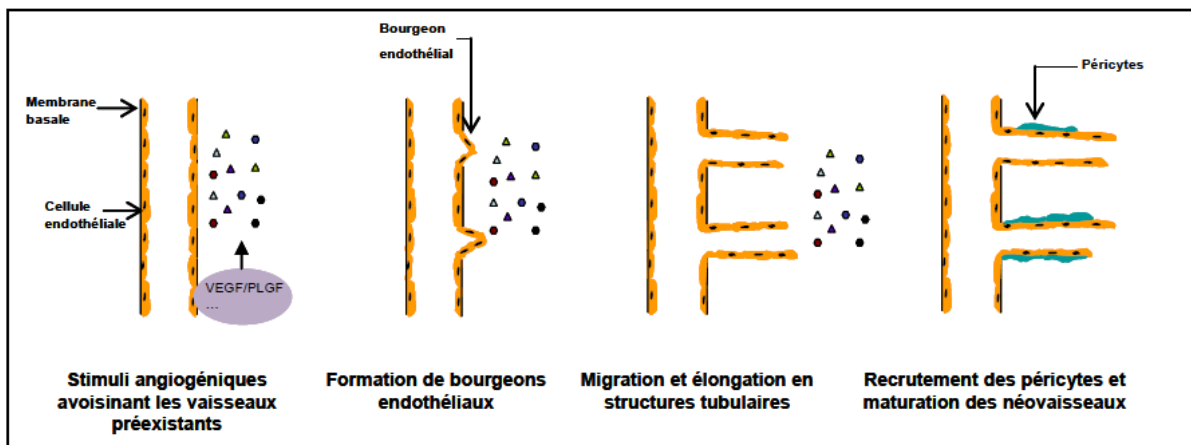


Figure 8 : Représentation schématique de l'angiogénèse [57]



La maturation et la stabilisation représentent les étapes finales de la formation de néovaisseaux. La maturation requiert le recrutement de cellules murales vasculaires ainsi que leur spécialisation. Ces cellules de soutien peuvent être des péricytes qui partagent la même membrane basale que les cellules endothéliales au niveau des capillaires, ou des cellules musculaires lisses périvasculaires qui possèdent leur propre membrane basale au niveau des artérioles et des veinules.

Une fois que la plaie est remplie d'un nouveau tissu de granulation, l'angiogénèse cesse et de nombreux vaisseaux sanguins se désintègrent par apoptose.

#### **4.1.3.2. Prolifération épidermique : réépithélialisation**

La réépithélialisation représente une séquence d'étapes impliquant mobilisation, migration, mitose et différenciation cellulaire des cellules épithéliales.

Elle requiert la participation des kératinocytes résidant dans les annexes épithéliales (glandes sudoripares) restant en place et ceux des berges de la lésion épidermique. Face à l'absence de cellules voisines aux bords de la plaie et au contact des cytokines et facteurs de croissances sécrétés en bord de plaie, ces cellules vont migrer, grâce à l'émission de pseudopodes, proliférer puis se différencier en reconstituant les strates épidermiques. Parmi les principaux facteurs induisant la ré-épithélialisation et la reconstitution de la jonction dermo-épidermique, on retrouve l'EGF, le KGF (*Keratinocyte Growth Factor*) et le TGF- $\alpha$  et  $\beta$ , qui sont produits par les macrophages activés, les plaquettes et les kératinocytes. [48].

Le caillot altère physiquement l'épithélialisation de la plaie et le dépôt de collagène. Les kératinocytes migrants stimulent alors l'activateur de la pro-urokinase (uPA) et l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) (qui convertit le plasminogène en plasmine), activant ainsi la fibrinolyse. Cette phase est une étape essentielle pour la migration des kératinocytes [58].

Lorsque la plaie est fermée par une monocouche de kératinocytes, ceux-ci arrêtent leur migration par inhibition de contact [50]. Ce n'est qu'ensuite que se produit la colonisation de l'épiderme par les cellules de Langerhans et les mélanocytes.

#### **4.1.4. Phase de remodelage**

Le remodelage matriciel peut durer entre 6 et 12 mois mais peut persister plusieurs années après la blessure initiale. Ceci dépend de plusieurs facteurs tels que le statut génétique du patient, l'âge, la localisation, le type de la blessure et la durée de la phase inflammatoire [50].

Le néoderme s'appauvrit en cellules inflammatoires, le réseau vasculaire se normalise, la trame collagénique se réorganise avec disparition d'une partie des fibres et réorientation des faisceaux selon les lignes de tension. En effet, le collagène de type III présent en début de cicatrisation laisse place à un réseau de fibres de type I et un réseau d'élastine conférant solidité et élasticité. Les interférons ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ) produits par les lymphocytes T, les leucocytes et les fibroblastes, exercent une action antifibrotique et inhibent la synthèse de collagène de type III et de fibronectine. Les fibroblastes, cellules endothéliales et macrophages libèrent certaines enzymes qui participent à la dégradation tissulaire telles que les métalloprotéases qui dégradent les fibres de collagènes accumulées et la hyaluronidase qui digère les glycosaminoglycannes. Ainsi, peu à peu, le tissu de granulation passe d'un tissu riche en cellules et hautement vascularisé en un tissu cicatriciel contenant peu de cellules et de vaisseaux [50]. Les cellules sont éliminées par un processus d'apoptose qui permet une mort cellulaire discrète avec formation de corps apoptotiques qui seront phagocytés. Si les cellules persistent, une cicatrice hypertrophique ou des chéloïdes apparaîtront. Quant aux vaisseaux sanguins, leur mort cellulaire est régulée par une variété de molécules matricielles, comme la thrombospondine 1 et 2, et des facteurs antiangiogéniques tels que l'angiopoiétine 2 [52].

Les follicules pileux, les glandes sébacées et sudoripares ainsi que la couche superficielle réticulaire dermique ne seront pas régénérés [59].

Toutefois, la restauration de l'intégrité anatomique et fonctionnelle de la barrière cutanée reste incomplète après plusieurs années. Le tissu cicatriciel demeurera plus vulnérable vis-à-vis d'une nouvelle blessure car moins résistant et moins élastique, en raison de la reconstitution d'une MEC relativement désorganisée [55].

## **4.2. Cicatrisation anormale : les plaies chroniques**

Quand la peau ne cicatrise pas, particulièrement chez les sujets âgés, des plaies chroniques peuvent apparaître. Une plaie est considérée comme chronique lorsqu'elle ne guérit pas de manière ordonnée et ne conduit pas à une intégrité structurale dans les 4 à 6 semaines [60].

### **4.2.1. Facteurs de risques**

Certains facteurs intrinsèques (relatifs à la plaie elle-même) peuvent entraver la guérison des plaies comme [61] :

- Le type du traumatisme (profondeur, surface), les plaies étendues et profondes sont naturellement plus longues à cicatriser.
- L'infection, une plaie et en particulier une plaie chronique a tendance à devenir fortement colonisée. Les bactéries ou les organismes fongiques en prolifération utilisent la même source de nutriments et de molécules d'oxygène que le tissu en réparation. Ainsi, à terme, cela peut entraîner une nécrose.
- L'ischémie, c'est-à-dire une diminution de l'apport sanguin. Un défaut d'apport sanguin peut entraîner l'arrêt de la migration des fibroblastes et par conséquent l'arrêt du processus de cicatrisation [50]. Dans les plaies chroniques telles que les ulcères d'origine veineuse, une période d'ischémie est suivie d'une période de reperfusion. Ces événements sont répétitifs, ce qui signifie que leurs effets délétères sont potentialisés et sont suffisants pour provoquer une ulcération. Dans l'ulcère veineux, lorsque les jambes sont en élévation, la circulation est restaurée et les changements inflammatoires qui surviennent avec la reperfusion aggravent la blessure [62].
- L'hypoxie, générée par l'ischémie, qui correspond à une diminution de l'oxygénation des tissus. Cependant, l'effet de l'hypoxie sur la cicatrisation des plaies a longtemps été discuté. En effet, de nombreuses données indiquent qu'un faible niveau d'oxygène est corrélé à l'incapacité à guérir les plaies [63,64]. D'ailleurs, l'exposition de la plaie à de l'oxygène hyperbare augmenterait la production de VEGF [65]. Or, il a été montré qu'un faible niveau d'oxygène peut stimuler la prolifération et la croissance de fibroblastes et de collagène et peut favoriser la synthèse de facteurs de croissance impliqués dans l'angiogénèse [66]. En effet, l'hypoxie stimulerait l'expression par les cellules endothéliales d'un facteur de transcription qui régule l'expression de VEGF appelé "*Hypoxia Inducible Factor 1*" (HIF-1), stimulant ainsi l'angiogénèse. Lorsque de nouveaux vaisseaux sont formés et que l'oxygène retourne à un niveau normal, celui-ci se lie à l'HIF1 et bloque son activité, ce qui mène à une diminution de la synthèse de VEGF. Il est supposé que la signalisation cellulaire de HIF-1 est réduite dans les plaies chroniques hypoxiques chez les personnes âgées [67].

Des facteurs extrinsèques (généraux) entrent également en jeu tels que l'âge (la peau âgée est plus lente à cicatriser), la malnutrition (une carence en nutriments et surtout en protéines est considérable dans le retard de cicatrisation), le tabac, certains médicaments (anti-inflammatoires) et la présence d'une pathologie chronique comme le diabète (rôles intriqués de la microangiopathie, macroangiopathie et des traumatismes locaux répétés), et l'insuffisance artérielle ou veineuse [61, 68].

Il faut noter que l'âge intervient de façon multiple : augmentation de la fréquence des comorbidités associées, notamment les maladies artérielles (arthériopathie) et cardiaques, dénutrition, réduction de la mobilité, sénescence des cellules impliquées dans la réparation cutanée [69].

#### 4.2.2. Exemples de plaies chroniques : les ulcères de jambes

##### 4.2.2.1. **Physiopathologie**

Les ulcères cutanés sont les types de plaies chroniques les plus communs [50]. L'ulcère de jambe est une perte de substance dermo-épidermique chronique sans tendance spontanée à la cicatrisation, induite par une détérioration de la circulation périphérique. Il s'agit de la complication d'une maladie vasculaire sous-jacente souvent ancienne et grave. On distingue les ulcères de pression (ou escarres), les ulcères de pieds diabétiques, ainsi que les ulcères d'origine vasculaire. Nous insisterons sur ces derniers, que l'on classe comme veineux, artériels ou mixtes.

##### - ***Ulcère de pression***

Une escarre est une lésion localisée qui se développe suite à la compression de tissus mous entre les proéminences osseuses et une surface dure durant une période suffisante pour induire une ischémie locale [70]. Le taux de mortalité est en augmentation et est lié aux comorbidités ou aux infections associées (pouvant entraîner une septicémie). Une pression, une friction, une humidité excessive (incontinence urinaire) ou le cisaillement sont autant de facteurs favorisant l'apparition d'une plaie de pression. Les patients alités et en chaise roulante sont les plus susceptibles de souffrir de ce type de plaie.

##### - ***Ulcère du pied diabétique***

Les personnes souffrant d'hyperglycémie sont les plus prédisposées à développer un ulcère au pied. Un taux de glucose sanguin élevé entraîne le dysfonctionnement des systèmes nerveux, vasculaire, immunitaire et musculo-squelettique. Une réduction de l'apport sanguin aux membres inférieurs ainsi qu'une diminution de la sensibilité profonde au toucher, à la température et à la douleur (neuropathie), sont les principales causes menant à l'apparition des ulcères.

Les ulcérations de la peau apparaissent plus fréquemment au niveau des points d'hyperpression de la plante des pieds, c'est-à-dire à la région métatarsienne ou au talon [70].

## - ***Ulcère vasculaire***

**Les ulcères veineux** sont plus communs chez les femmes. Leur incidence augmente avec l'âge. Ils apparaissent le plus souvent dans le cadre d'une insuffisance veineuse de longue date.

Dans le système veineux, lors de la marche ou d'une activité physique, la contraction des muscles du mollet comprime les veines profondes, ce qui active des valves permettant de drainer le sang vers le cœur et d'empêcher l'écoulement rétrograde du sang [71]. Dans les insuffisances veineuses, cet effet ne se produit plus. C'est la conséquence d'une combinaison de facteurs tels que l'immobilité, une déficience de la pompe musculaire du mollet, ou une dysfonction valvulaire du système veineux due à un problème thrombotique, un traumatisme ou une absence congénitale.

Par conséquent, la pression des veines profondes est moins importante qu'en condition normale, c'est l'hypertension veineuse, qui est à l'origine de l'apparition de l'ulcère [60,71,72]. Il a été supposé que cette dernière, causant une distension des capillaires et élargissant les pores des vaisseaux, entraînait la fuite de macromolécules dans le derme comme le fibrinogène. Celui-ci se polymérise et formerait ensuite des manchons de fibrine péricapillaires dans l'espace extravasculaire gênant la diffusion de l'oxygène et des nutriments des capillaires vers le derme. Il en résulte une ischémie, la mort cellulaire et l'ulcération tissulaire qui peut survenir après un simple traumatisme [22,66]. Cependant cette théorie est controversée puisqu'il a été démontré que la répartition irrégulière des manchons ne gênaient pas la diffusion des nutriments d'une part et que les ulcères ne guérissent pas après une réduction de la taille des manchons [23,71].

L'hypertension serait également à l'origine d'une adhésion et d'une activation des leucocytes dans la microcirculation. La diminution du gradient de pression entre le système veineux et artériel entraîne une réduction de la pression de perfusion des capillaires et du flux capillaire (stase sanguine). Ceci mène à une agrégation d'érythrocytes et un colmatage de leucocytes sur les capillaires, menant à une ischémie locale. Ces leucocytes libèrent certaines cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$  qui diminue l'activité fibrinolytique menant à un dépôt de fibrine et à la libération de radicaux libres (espèces oxygénées réactives) qui détériorent l'environnement tissulaire et cellulaire.

Dans l'insuffisance veineuse, les événements mécaniques répétés d'ischémie-reperfusion potentialisent le cycle des cytokines inflammatoires, la migration des leucocytes, l'oxydation, accompagnés d'une perte de l'irrigation tissulaire et la nécrose qui en résulte [62]. Dans certains cas, une vasoconstriction se produit après l'ischémie (due à la régulation négative du protoxyde d'azote NO<sub>2</sub> provoquée par la libération de radicaux libres par les leucocytes), ce qui peut contribuer au phénomène de non-reperfusion.

D'un point de vue clinique, l'ulcère veineux se manifeste par une plaie aux bords irréguliers et mal définis et le lit de la plaie est superficiel. La malléole médiale est le site le plus commun. La peau environnante peut être exposée à des œdèmes, des indurations, ou encore des varicosités [60].

**Les ulcères artériels** sont la conséquence d'une irrigation sanguine insuffisante de la peau. Les lésions observées sont directement en rapport avec l'ischémie par défaut de perfusion artérielle du membre [72]. Le risque d'ulcération artérielle des extrémités est augmenté chez les fumeurs, les personnes âgées et les personnes ayant une maladie artérielle dans d'autres sites. L'athérosclérose est la principale cause mais les maladies thromboemboliques peuvent aussi être responsables d'ulcères.

Ces ulcères sont ronds aux frontières bien délimitées et surviennent principalement sur les saillies osseuses. La peau environnante est glabre, brillante et atrophiée [60].

Dans un nombre important de cas, les deux causes sont mises en évidence simultanément, faisant parler d'un **ulcère mixte** artériel et veineux.

#### **4.2.2.2. Mécanismes de non cicatrisation**

Plusieurs mécanismes semblent jouer un rôle important dans la survenue de plaies chroniques : la réduction de facteurs de croissance au sein des tissus lésés, la présence d'enzymes protéolytiques, et la présence de cellules sénescentes [54].

##### **- Réduction de facteurs de croissance**

Certains facteurs de croissance sont présents en quantité réduite dans les plaies chroniques par rapport aux plaies aiguës, comme le PDGF, le FGF2, l'EGF et le TGF $\alpha$  [54]. Il a été suggéré que ces facteurs de croissance pouvaient être piégés par des macromolécules dans la matrice extracellulaire. En effet, des macromolécules telles que le fibrinogène, l'albumine et la  $\beta$ -2-macroglobuline, qui ont fui depuis les vaisseaux vers le derme, lient et piègent des facteurs de croissance et d'autres cytokines entraînant l'indisponibilité de ces médiateurs indispensables à la maintenance de l'intégrité et de la réparation tissulaire [63].

De plus, dans les ulcères d'origine veineuse, une large quantité de facteurs de croissance, en particulier le TGF- $\beta$ , sont piégés dans des manchons de fibrine péri-capillaires [73]. Cette rétention de facteurs de croissance nuit ainsi à leur activité.

### - **Présence d'enzymes protéolytiques**

Le contrôle de la dégradation de la MEC est important pour permettre la migration cellulaire et l'angiogénèse [74]. Une étape clé dans la dégradation de la MEC est la sécrétion de protéinases par les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les neutrophiles et les macrophages. Cependant, dans certaines conditions, une dérégulation de leur expression se produit. En effet, la sécrétion d'espèces oxygénées réactives (ROS), produits secondairement à la contamination microbienne, endommage les protéines de la MEC et peuvent sélectivement affecter les voies de transcription de certains facteurs contrôlant l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines, promoteurs de l'expression de MMP, diminuent l'expression de TIMP, créant un environnement avec une activité excessive de MMP [49].

L'activité protéolytique des plaies chroniques ainsi dérégulée, submerge les mécanismes de protection des tissus. En effet, l'exsudat retrouvé au sein des plaies chroniques contient des MMP capables de décomposer les protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, le collagène et l'élastine [74]. De plus, cet exsudat inhiberait la prolifération et la croissance des fibroblastes, des kératinocytes et des cellules endothéliales, résultant en un retard de ré-épithélialisation et de l'angiogénèse [75, 76].

Dans l'ulcère veineux, les leucocytes adhérant aux capillaires sécrètent aussi des enzymes protéolytiques telles que la collagénase (MMP-8) qui est responsable de la destruction de la matrice du tissu conjonctif, ou l'élastase qui est capable de détruire des facteurs de croissance jouant un rôle important dans la cicatrisation (VEGF, TGF- $\beta$ ) [22,48].

### - **Présence de cellules sénescents**

Les ulcères de jambe seraient associés à une sénescence prématurée des fibroblastes. En effet, les fibroblastes dermiques non sénescents cultivés en présence d'exsudats de plaies d'ulcères chroniques, deviennent sénescents. Leur morphologie apparait modifiée. De plus, ne répondant plus aux signaux envoyés par des facteurs de croissance, leur capacités de migration et de prolifération sont moindres [77,78].

Il existe une corrélation entre le nombre de cellules sénescents identifiées et le temps de cicatrisation. En effet, dès 15% de cellules sénescents dans la population de fibroblastes, les ulcères deviennent très difficiles à guérir [79].

La sénescence peut être induite par des agents de stress environnants tels que le stress oxydatif ou des cytokines proinflammatoires (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1), dont la présence est entretenue par l'inflammation continue. La sénescence des fibroblastes de la plaie contribue ainsi à une mauvaise cicatrisation de l'ulcère veineux.

#### 4.2.2.3. Traitements actuels

La prise en charge des plaies chroniques est une problématique multidisciplinaire. Certaines de ces plaies entraînent des souffrances physiques, psychiques, et une marginalisation dans la société (odeurs, douleur, problème esthétique). Des plaies comme celles rencontrées chez le diabétique, menacent les membres d'amputation et pèsent sur le pronostic vital.

Les soins standards des plaies chroniques reposent sur la diminution de la charge bactérienne, l'élimination des tissus nécrosés (débridement chirurgical ou non chirurgical), la réduction de l'œdème, et le maintien de l'équilibre hydrique.

Dans l'ulcère d'origine vasculaire, un traitement étiologique est associé à un traitement topique (pansements). Le traitement étiologique de l'ulcère d'origine veineuse repose sur la compression qui permet de soulager l'œdème et la stase en réduisant la distension des veines superficielles. Lorsque l'ulcère est d'origine artérielle, des techniques chirurgicales sont employées, telles que le pontage, qui permet de contourner les régions sténosées des artères, ou l'angioplastie, permettant de dilater les artères à l'endroit du rétrécissement. Dans le cas des ulcères mixtes, des bas de compression léger peuvent être utilisés.

Quant à l'ulcère diabétique, le traitement étiologique repose sur l'utilisation de semelles de confort qui répartissent les charges dans le but de soulager les points de pression à l'origine de la formation de callosités (point de départ de l'ulcère).

Une variété de pansements topiques ont été développés tels que des hydrocolloïdes, des films de polyuréthane, des hydrogels, des pansements imprégnés de gaze, et des alginates. Les thérapies plus innovantes comprennent des dispositifs mécaniques en pression négative (tube d'évacuation fenêtré incorporé dans un pansement de mousse et recouvert d'un pansement étanche à l'air). Ces derniers favorisent la réparation tissulaire en maintenant l'humidité, en éliminant les exsudats, en réduisant la charge bactérienne et en appliquant une pression mécanique pour promouvoir la fermeture [80].



Cependant ce type de pansement n'est pas approprié pour les plaies ischémiques car elles peuvent causer une nécrose sur les bords de la plaie [60].

Au cours des dernières années, des stratégies thérapeutiques relevant de la biotechnologie ont également été développées pour traiter les troubles de la cicatrisation :

- des facteurs de croissance : des preuves de leur efficacité ont été mis en évidence mais les résultats des essais cliniques n'ont pas été convainquant, contrairement à ce que prédisait les essais précliniques. Il a été suggéré que la posologie et le mode d'administration des facteurs de croissance étaient mal évalués ou qu'une combinaison de facteurs de croissance était nécessaire pour avoir une meilleure réponse [63].
- des cellules allogéniques ou autologues (kératinocytes, fibroblastes, macrophages) administrée sur la plaie dont le but est de relarguer différents facteurs de croissance, tels que des équivalents tissulaires ou substituts cutanés : épidermiques issus de culture de kératinocytes autologues ; dermiques constitués d'une matrice biodégradable associée ou non à des fibroblastes ; ou dermo-épidermiques allogéniques qui agissent comme des «pansements biologiques» produisant des facteurs de croissance.

Il faut noter que certains de ces produits allogéniques ne survivent pas plus de quelques semaines une fois placés sur une plaie chronique [81]. Jusqu'à maintenant, le coût de certains de ces produits limite leur diffusion. De plus, les substituts cutanés sont peu vascularisés, sont sensibles à la contamination, manquent de résistance mécanique, et forment des effets esthétiques peu satisfaisants [82].

Ainsi, la recherche d'un traitement efficace des plaies chroniques est au cœur des préoccupations des chercheurs à ce jour. Des progrès restent à accomplir dans le domaine des biotechnologies et de nouvelles stratégies innovantes sont encore sous investigation. L'émergence de la thérapie cellulaire à base de cellules souches a suscité un espoir nouveau et semblerait avoir une place considérable puisque leurs propriétés régénératrices permettraient de reconstituer les structures dermiques, épidermiques, vasculaires, et autres composants nécessaires à une réparation cutanée optimale.

## 5. INTERET DES CELLULES SOUCHES DANS LA CICATRISATION

Les propriétés régénératives des ASC ont été démontrées dans plusieurs modèles animaux expérimentaux : infarctus du myocarde, inflammation, insuffisance cardiaque, ischémie des membres et cicatrisation cutanée. Nous allons nous focaliser sur les modèles de cicatrisation.

### 5.1. Etudes précliniques sur l'utilisation des ASC dans la cicatrisation

Les études précliniques les plus récentes démontrant le potentiel régénératif des ASC dans la cicatrisation des plaies sont présentées sur le tableau II. Malgré une grande hétérogénéité concernant les méthodes d'administration (locale ou systémique, type de matrice, combinaison à des substituts cutanés) et le nombre d'ASC à injecter, leur utilisation dans la cicatrisation des plaies est prometteuse. Leur administration nécessite un véhicule afin d'éviter leur dissémination et d'augmenter la durée de vie des ASC *in vivo* [83]. Des biomatériaux biodégradables à base de polymères naturels comme le collagène (matrice d'atelocollagène) ou le chitosan (SFCS (*Silk Fibroin Chitosan Scaffold*)), permettent de favoriser le maintien et la différenciation des ASC *in vitro* et *in vivo* [84]. De plus, le plasma enrichi en plaquettes autologue ou PRP, contenant des cytokines et facteurs de croissance libérés par les plaquettes, outre sa fonction de véhicule, induit le recrutement, la prolifération et la différenciation des cellules impliquées dans la cicatrisation [85].

L'administration peut être topique ou systémique. Dans le tableau II sont présentés succinctement les résultats des essais précliniques des produits à base de cellules souches seules ou avec support.

Les résultats tendent tous à montrer que les ASC accélèrent la vitesse de cicatrisation des plaies et la qualité du tissu cicatriciel. En effet, elles augmentent l'épaisseur du tissu de granulation, le dépôt de collagène, la densité des vaisseaux, et améliorent également l'aspect esthétique des cicatrices qui en résultent.

Il est difficile de créer des plaies chroniques chez les animaux. Récemment, un tel modèle a été créé par irradiation, causant la survenue d'ulcère chez 16 d'entre eux environ 1 semaine après (apparition d'œdème, desquamation...) [86]. Grâce à ce modèle, dans le groupe traité par les ASC, une diminution significative de la taille des plaies est observée après 2 semaines ( $p < 0.05$ ) et 3 semaines ( $p < 0.01$ ) de traitement comparativement au groupe contrôle ; les ASC retrouvées co-localisées aux cellules endothéliales de l'hôte ont participé à une meilleure angiogénèse et permis d'obtenir un derme plus épais.

**Tableau II : Etudes précliniques de la bibliographie des 5 dernières années sur le rôle des ASC dans la cicatrisation cutanée : modèles expérimentaux, type de plaie, produit administré, résultats et indication potentielle**

| Modèle animal   | Type de plaie  | Produit administré   | Résultats  | Indication potentielle   | Référence                   |
|---|--|--|--|--|-----------------------------|
| 24 lapins adultes   | Plaie excisionnelle de 7 mm de diamètre  | 0.26.10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup> ASC BM- MSC ou fibroblastes (DF) allogéniques  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation de l'épaisseur du tissu de granulation avec les ASC</li> <li>-Prolifération des ASC dans la plaie (expression Ki67 7 jours après administration)</li> <li>- Phénotype fibroblastique activé des ASC (expression <math>\alpha</math>-SMA)</li> <li>-Augmentation du nombre de cellules endothéliales (augmentation du CD31 mais pas de colocalisation à J7)</li> <li>- Augmentation du nombre de macrophages</li> </ul>                     | Cicatrisation normale  | Hong et al., 2013 [87]      |
| 9 mini-porcs mâles et femelles Göttingen                          | Plaie partielle de 4 cm <sup>2</sup>   | 0.25.10 <sup>6</sup> ASC ou BM- MSC/cm <sup>2</sup> allogéniques intradermique + pansement imprégné de colle de fibrine ou de vaseline   | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Toutes les plaies sont cicatrisées à J14. Pas de différence entre BM- MSC et ASC</li> <li>-Meilleur aspect macroscopique à J21 (avec pansement imprégné de colle de fibrine (critères : vascularisation, pigmentation, souplesse)</li> <li>- Maturation de l'épiderme plus rapide (restauration des crêtes épidermiques) et épiderme plus épais à J21 (avec pansement imprégné de colle de fibrine)</li> <li>-Présence des MSC jusqu'à J10</li> </ul>    | Cicatrisation normale  | Hanson et al., 2013 [88]    |
| 16 rats Sprague-Dawley préalablement irradiés à 50Gy              | Plaie secondaire à l'irradiation 1 semaine après, d'environ 3.5 cm <sup>2</sup>              | 0.29.10 <sup>6</sup> ASC allogéniques/cm <sup>2</sup>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitesse de cicatrisation augmentée : Taille de la plaie significativement plus petite après 3 semaines de traitement</li> <li>- Derme plus épais</li> <li>- Développement de nouveaux vaisseaux sanguins</li> <li>- Expression plus importante du marqueur des cellules endothéliales (CD31)</li> </ul>   | Cicatrisation de plaies irradiées ou autres plaies chroniques    | Huang et al., 2013 [86]     |
| 18 souris nude  | Plaie excisionnelle de 12 mm de diamètre   | Feuillet constitué d'ASC (1.10 <sup>6</sup> ) et d'une ou plusieurs membranes de fibrine, en monocouche ou triple couche   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitesse de cicatrisation accélérée des plaies traitées vs non traitées (à J7, J10, J14, J18 sauf J21)</li> <li>- Différence significative de la vitesse de cicatrisation entre la triple couche de feuillet d'ASC vs monocouche (à J7, J10 et J14)</li> <li>- Augmentation du collagène dans le groupe traité vs non traité</li> <li>- Migration et prolifération des kératinocytes</li> </ul>  | Cicatrisation normale  | Lin et al., 2013 [89]       |
| 72 souris C57B1/6 (4x18)  | Plaie excisionnelle de 6 mm de diamètre  | 0.35x10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup> intradermique et 0.35x10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup> avec support ppAAc (silicone recouvert de plasma polymérisé avec une fine couche d'acide acrylique) | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitesse de cicatrisation accélérée avec les ASC avec support ppAAc, similaire aux ASC injectées en ID</li> <li>- Diminution du TNF-<math>\alpha</math> (J3, 5 et 7), augmentation du nombre de macrophage anti-inflammatoire</li> <li>- Augmentation du facteur TGF-<math>\beta</math>1 (J5)</li> <li>- Augmentation de la formation de nouveaux vaisseaux (J5)</li> <li>- Augmentation du VEGF, PECAM-1, <math>\alpha</math>-SMA (J5 et J7)</li> </ul> | Cicatrisation de plaies chroniques                               | Jiang et al., 2013 [1]      |
| 2 porcs Yorkshire   | Plaie excisionnelle profonde de 3 x 3 cm   | 1.10 <sup>6</sup> ASC humains/cm <sup>2</sup>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cicatrices plus petites et de meilleure qualité</li> <li>- Meilleure organisation des fibres de collagène</li> <li>- Diminution du nombre de mastocytes pendant la phase de remodelage</li> <li>- Augmentation des facteurs TGF (stimulant la synthèse de MEC) et MMP-1 en phase précoce de remodelage</li> <li>- Diminution plus rapide des myofibroblastes</li> </ul>   | Amélioration de la qualité du tissu cicatriciel                  | Yun et al., 2012 [90]       |
| 13 mini-porcs localement irradiés par des rayons $\gamma$ (50 Gy) | Brûlures sévères d'apparition spontanée et retardée secondaires à l'irradiation à forte dose | 50.10 <sup>6</sup> ASC (4 fois) autologues   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitesse de cicatrisation augmentée : J130<math>\pm</math>28 avec les ASC vs nécrose chez non traités à J91</li> <li>- localisation ASC dans derme et hypoderme</li> <li>- Infiltration lymphocytaire plus précoce</li> <li>- Augmentation de la vascularisation pour 1 porc sur les 5 traités</li> </ul>  | Prévention et traitement du syndrome cutanée d'irradiation aigüe | Forcheron et al., 2012 [91] |

| Modèle animal  | Type de plaie   | Produit administré   | Résultats   | Indication potentielle   | Référence                     |
|--|---|--|---|--|-------------------------------|
| 6 souris nues  | Modèle de Galiano : plaie excisionnelle profonde de 15mm de diamètre avec attelle | 0,5.10 <sup>6</sup> ASC humains/cm <sup>2</sup> dans gel de collagène                                    | - <b>Vitesse de cicatrisation accélérée</b> : surface non réépithélialisée = 28,6mm <sup>2</sup> vs 54,6mm <sup>2</sup> pour les témoins à J10<br>- Derme plus épais à J28 (84,5µm vs 51,6µm)   | Cicatrisation de plaies sur terrain immunodéprimé  | Ho Lee et al., 2011 [92]      |
| 72 rats diabétiques et sains (2x36)  | Modèle de Galiano : plaie excisionnelle profonde de 8 mm de diamètre              | 2.10 <sup>6</sup> ASC autologues/cm <sup>2</sup>   | - <b>Vitesse de cicatrisation accélérée</b> :<br>- en condition saine (11j vs 15j)<br>- diabétique (18j vs 28j)<br>- Accélération de la ré-épithélialisation et formation d'un tissu de granulation plus épais<br>- Différenciation épithéliale et endothéliale <i>in vivo</i><br>- Densité vasculaire plus importante  | Cicatrisation normale et plaies du diabétique  | Nie et al., 2011 [93]         |
| 12 souris diabétiques  | Plaie excisionnelle profonde de 1,5 cm de diamètre                                | 0,27.10 <sup>6</sup> ASC autologues/cm <sup>2</sup> + matrice d'atélocollagène avec membrane de silicone | - <b>Vitesse de cicatrisation accélérée</b> : 87% vs 52% à J15<br>- Localisation des ASC dans l'épiderme, le derme et les capillaires<br>- Formation du tissu de granulation et des capillaires favorisée   | Plaies du diabétique   | Nambu et al., 2011 [94]       |
| 26 rats diabétiques  | Plaie excisionnelle profonde de 1cm de diamètre                                   | 1,25.10 <sup>6</sup> ASC allogéniques/cm <sup>2</sup>  | - <b>Taux de cicatrisation significativement augmenté</b><br>- Présence d'ASC dans l'épiderme et le derme<br>- Densité de fibroblastes diminuée avec traitement   | Plaies du diabétique   | Maharlooei et al., 2011 [95]  |
| 6 souris nues  | Modèle de Galiano : plaie excisionnelle profonde de 6mm de diamètre               | 3.10 <sup>6</sup> ASC autologues/cm <sup>2</sup>   | - <b>Vitesse de cicatrisation accélérée</b> : 98 vs 89% à J14<br>- Meilleur score histologique (réépithélialisation, tissu de granulation et angiogénèse) : 8,0 vs 5,2 à J15  | Cicatrisation de plaies sur terrain immunodéprimé  | Soo Lim et al., 2010 [96]     |
| 24 Souris diabétiques  | Plaie excisionnelle profonde de 1cm de diamètre                                   | 0,45.10 <sup>6</sup> ASC humains/cm <sup>2</sup> Multiagrégat ou en suspension                           | - <b>Cicatrisation accélérée</b> avec les ASC sous forme de multiagrégats et similaire aux souris saines non traitées<br>- Pas de différence significative entre ASC en suspension et témoins PBS   | Plaies du diabétique   | Amos et al., 2010 [97]        |
| 4 Porcs préalablement irradiées localement à 20 Gy                         | Plaie excisionnelle profonde de 1,5 cm <sup>2</sup> et de 4mm de profondeur       | 1,8.10 <sup>6</sup> ASC/cm <sup>2</sup> autologues + PRP Gel   | - <b>Vitesse de cicatrisation accélérée</b> : 60% vs 43% des plaies ré-épithélialisées à J21<br>- Densité vasculaire augmentée à J21  | Cicatrisation retardée suite à une irradiation (radiothérapie)   | Hadad et al., 2010 [98]       |
| 30 rats Sprague-Dawley   | Plaie excisionnelle profonde  | 2.10 <sup>5</sup> ASC/cm <sup>2</sup> autologues + membrane amniotique acellulaire humaine (HAAM)        | - <b>Vitesse de cicatrisation accélérée</b> après traitement avec des ASC ensemencés sur HAAM vs HAAM ou gaze seule<br>- Nombre de cellules CK19+ plus élevé (marqueur kératine I)  | Cicatrisation normale  | Ju et al., 2010 [99]          |
| 3 porcs  | Plaie excisionnelle profonde de 1,5cm <sup>2</sup>                                | 1.10 <sup>5</sup> ASC autologues/cm <sup>2</sup> +PRP  | - <b>Cicatrisation non accélérée</b> mais amélioration de l'aspect de la cicatrice (couleur, régularité et souplesse)<br>- Augmentation de la densité vasculaire à J21<br>- Localisation des ASC <i>in vivo</i> en périvasculaire à J21   | Cicatrisation dans un terrain présentant une insuffisance vasculaire (irradiation, brûlures profondes) | Blanton et al., 2009 [100]    |
| 17 souris nude   | Plaie excisionnelle profonde de 6 mm de diamètre                                  | 0,1.10 <sup>6</sup> ASC humains/cm <sup>2</sup> + matrice SFCS   | - <b>Accélération de la vitesse de cicatrisation</b><br>- Densité vasculaire augmentée<br>- Semaines 2 et 4 : Des ASC expriment : HSP-47, SMA, facteur de von Willebrand<br>- Semaine 4 : Des ASC expriment CK19  | Cicatrisation de plaies sur terrain immunodéprimé  | Altman et al., 2009 [101]     |
| 8 souris C57B1/6 dont certaines préalablement irradiées localement à 20 Gy | Plaie excisionnelle profonde de 8 mm de diamètre                                  | 2.10 <sup>6</sup> ASC/cm <sup>2</sup>  | - <b>Vitesse de cicatrisation accélérée</b> en condition saine et irradiée<br>- Effet supérieur des ASC vs MSC<br>- Augmentation de la viscoélasticité chez la souris saine et irradiée. Résultats associés à une augmentation de collagène<br>- Localisation des ASC dans derme et épiderme<br>- Augmentation de la densité vasculaire et du flux en condition saine et irradiée | Cicatrisation retardée suite à une irradiation et cicatrisation normale                                | Ebrahimian et al., 2009 [102] |

## 5.2. Rôles des ASC dans la cicatrisation

### 5.2.1. Rôles sur la revascularisation cutanée

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la vascularisation est essentielle à la cicatrisation puisque les vaisseaux permettent d'alimenter le tissu de granulation en nutriments et en oxygène. La circulation sanguine véhicule aussi les cellules inflammatoires et les cellules souches nécessaires au site de la plaie. De plus, un défaut de vascularisation est un des événements observé dans la survenue d'ulcères de jambe d'origine vasculaire. L'induction et le maintien rapide du flux sanguin à travers un nouveau réseau vasculaire est donc essentiel pour traiter de manière efficace les tissus ischémiés.

Dans la plupart des résultats précliniques utilisant des ASC dans la cicatrisation cutanée, présentées dans le tableau II, une amélioration de la densité vasculaire est observée [86, 93, 94, 98, 100, 101, 102]. Ces résultats confirment des données préexistantes *in vitro* et *in vivo* sur la capacité angiogénique des ASC [103, 104, 105]. Plusieurs effets ont été systématiquement reportés dans des modèles d'ischémie des membres, notamment une amélioration du score angiographique résultant de la restauration d'un réseau vasculaire fonctionnel dans les aires ischémiées, une amélioration de la perfusion des tissus quantifiée par laser Doppler, et une augmentation de la densité capillaire [106, 107, 108, 109].

Deux principaux mécanismes non exclusifs seraient impliqués dans la néovascularisation : l'apport de facteurs angiogéniques lié à leur fonction sécrétoire, ainsi que la différenciation directe des ASC en cellules endothéliales et leur intégration dans le réseau vasculaire en tant que composant fonctionnel de néovaisseaux.

#### - **Hypothèse de la sécrétion de facteurs angiogéniques**

Les ASC sécrètent une quantité significative de médiateurs impliqués dans l'angiogénèse, tels que le VEGF, l'HGF, le PDGF, le PlGF (*placental growth factor*), le FGF-2, le TGF- $\beta$ , et l'angiopoïétine-1 [45]. Ces facteurs participent au recrutement, à la migration et la prolifération des cellules endothéliales et des progéniteurs endothéliaux endogènes (EPC pour *Endothelial progenitor cells*) [110]. De plus, co-cultivées *in vitro* avec les cellules endothéliales, les ASC augmentent significativement leur viabilité et leur migration ainsi que la formation de tubules, principalement à travers la sécrétion de VEGF et de HGF [106].

Ainsi, sécrété par les ASC, le VEGF est le principal facteur paracrine impliqué dans la vascularisation [38]. En effet, l'induction de sa surexpression dans les ASC augmente leur potentiel angiogénique *in vivo* et leur survie au sein de la plaie, avec pour résultat une prolongation de leur efficacité, une accélération de la cicatrisation associée à la formation de fibres de collagènes plus matures [111].

Le FGF-2 est également un acteur clé puisqu'il a des effets positifs sur la prolifération et la migration des cellules endothéliales, et augmente la multipotentialité des ASC [112]. Enfin, le HGF participe de manière importante à l'effet anti-ischémique : en son absence, les ASC n'ont plus d'effet sur la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales dans l'environnement ischémique [113].

#### - **Hypothèse d'une différenciation directe en cellules endothéliales**

Le potentiel des ASC à se différencier en cellules endothéliales a été démontré *in vitro*. En effet, sous l'influence du VEGF, les ASC fraîchement isolées du tissu adipeux expriment le CD34, le CD31, le CD144 et le NOS (*endothelial cell Nitric Oxide Synthase*), principaux marqueurs des cellules endothéliales [109].

*In vivo*, la différenciation des ASC en cellules endothéliales a été envisagée lors de plusieurs expérimentations :

- Tracées par un agent fluorescent tel que la GFP (*Green Fluorescent Protein*) dans le traitement des plaies chez le rat (plaies excisionnelles ou générées par irradiation), les ASC sont co-localisées avec les cellules exprimant le CD31, suggérant leur différenciation endothéliale [86,93]. Cependant, ce n'est pas suffisant pour conclure à une différenciation endothéliale car cette co-localisation des signaux peut être due à une fusion cellulaire entre les ASC transplantés et les cellules endothéliales de l'hôte.
- L'origine humaine des cellules endothéliales (détection par RT-PCR de marqueurs humains : hCD34+, hCD31+, hCD144+) a été mise en évidence dans un modèle d'ischémie chez la souris, où une augmentation du flux sanguin cutané, mesurée par laser Doppler imaging, a été observée [109]. Toutefois, le manque de moyen de purification clonale (passage précoce) peut être à l'origine d'une contamination par des cellules endothéliales, ce qui limite l'interprétation de certains de ces résultats.

Par ailleurs, au sein du tissu adipeux, il a été prouvé que les ASC étaient localisées dans les parois de la microvasculature du tissu adipeux et possédaient certaines caractéristiques des péricytes [114,115,116].

Ces derniers sont capable de stabiliser le réseau endothélial *in vitro* et de participer à la formation *in vivo* de nouveaux vaisseaux via une action synergique avec les cellules endothéliales résidentes, impliquant une interaction paracrine et un contact direct.

Les nouveaux vaisseaux formés peuvent alors se connecter avec le système vasculaire, conduire le flux sanguin et stabiliser la structure vasculaire. Il a été supposé que les ASC exogènes participaient à la vascularisation de la même manière à travers des fonctions de péricytes, c'est-à-dire en se localisant autour de ces capillaires pour recruter les cellules endothéliales endogènes ou pour stabiliser les vaisseaux [117]. Cependant, d'autres études sont requises pour déterminer si la transition des ASC en péricyte est nécessaire pour favoriser la guérison des plaies [118].

Ainsi, lors de la régénération des tissus, les ASC sont capables de fournir les signaux directs et indirects nécessaires pour rétablir la vascularisation.

### 5.2.2. Rôles dans la réparation cutanée

A l'instar de leurs effets proangiogéniques, l'efficacité des ASC sur la réparation cutanée fait également appel à leur fonction paracrine et à leur potentiel de différenciation en différents types cellulaires impliqués dans le tissu concerné. Ce dernier mécanisme contribuerait à régénérer les tissus endommagés en repeuplant le site lésé par des cellules saines (fonction *building-block*). En effet, par exemple, dans l'étude d'Altman et *al.* [101], les ASC, marqué par le GFP, sont co-localisées avec les cellules épidermiques, suggérant la différenciation des ASC en kératinocytes.

Cependant, si elles se différencient en cellules de tissus structuraux, la présence des ASC dans le tissu lésé devrait être de longue durée. Or, la survie des ASC à l'endroit de la blessure est dans la plupart des cas trop faible pour être thérapeutiquement pertinent. Concernant les autres sources de MSC, l'information actuelle sur leur longévité dans les plaies varie. Par exemple, Falanga *et al* ont montré que les BM-MSc avaient quitté la plaie en 25 jours après une application topique [119]. En revanche, après une injection dans la région péricardique, les MSC ont été présent jusqu'à 1 an [120]. Ces variations peuvent dépendre du type de tissu, du type de blessure, de la méthode de marquage des cellules, ou du degré d'hétérogénéité des MSC [121].

Par conséquent, il a été proposé que le mécanisme par lequel les MSC modulaient l'environnement de l'hôte et favorisait la régénération tissulaire était plus lié à un effet indirect (sécrétoire) plutôt qu'à une participation directe via leur incorporation dans les tissus [122].

D'ailleurs, une grande partie de l'amélioration fonctionnelle et de l'atténuation de la blessure assurée par les cellules souches peut être obtenue par traitement avec un milieu acellulaire conditionné à partir des MSC (MSC-CM pour *MSC-conditioned medium*), c'est-à-dire contenant les facteurs de sécrétion des MSC obtenu après leur culture dans un milieu approprié (DMEM/F12 et 10% sérum de veau).

La preuve d'une activité paracrine *in vitro* a été apportée par Lee et al. [123], qui ont utilisé des ASC-CM pour cultiver des kératinocytes et des fibroblastes. Ils ont montré une augmentation de leur prolifération et de l'expression du collagène de type 1. De plus, il a été récemment démontré *in vitro* que les ASC-CM stimulaient la migration des différentes cellules de manière séquentielle, les cellules endothéliales étant les premières à migrer, suivies des fibroblastes et des kératinocytes [124]. *In vivo*, sur un modèle de plaie excisionnelle réalisée chez la souris, l'injection de MSC-CM a donné les mêmes effets sur la cicatrisation que l'injection de MSC seules [125].

L'avantage de l'utilisation des ASC-CM par rapport aux ASC est que ce milieu peut être appliqué localement ou par voie intraveineuse, et le contenu des principales cytokines dans l'ASC-CM peut être précisément quantifié [124].

Ainsi, tel que le montre la figure 9, en plus de leur rôle sur la néovascularisation, l'importante activité sécrétoire des ASC apporte presque tous les facteurs de croissance, cytokines et chimiokines, qui participent au processus de cicatrisation en conférant les propriétés suivantes [100, 102] :

- **Immunomodulation :**

Grâce à leurs effets immunomodulateurs dynamiques, les ASC sont capables de réguler les processus inflammatoires. En effet, au cours de l'inflammation, les ASC régulent positivement les cytokines inflammatoires, ce qui permet un afflux de lymphocytes et de macrophages favorisant la détersion du site lésé. Lorsque le niveau de cytokines est trop élevé et délétère pour le tissu, les ASC régulent négativement leur expression [127].

Administrés à un passage tardif (1 à 4), les ASC suppriment la réaction immunitaire *in vitro*, ce qui signifie que ces cellules peuvent ne pas provoquer une réponse des cellules T cytotoxiques *in vivo* [41]. Ceci peut présenter un intérêt dans le cadre d'une utilisation allogénique de cellules souches.

Les MSC n'agiraient pas seulement sur les cellules T, elles peuvent aussi inhiber ou activer la prolifération des cellules B, supprimer l'activation des cellules NK et moduler le profil de sécrétion des cytokines des cellules dendritiques et des macrophages [126].



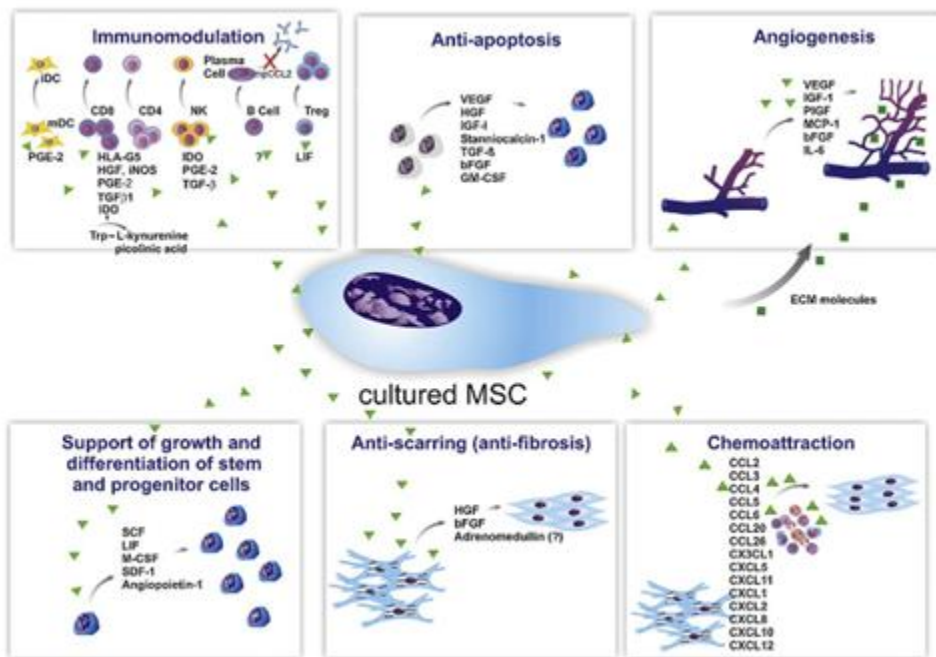


Figure 9 : Activité paracrine des cellules souches mésenchymateuses [126]

- **Support de la croissance et de la différenciation des progéniteurs cellulaires :**

Une fois sur le site de la plaie, l'activité sécrétoire des ASC leur permet d'interagir de manière active avec l'environnement de la plaie, puisqu'elles seraient capables de moduler la niche de cellules souches de l'hôte en stimulant la mobilisation de progéniteurs cellulaires endogènes vers le site de la plaie via des facteurs de recrutement, et en favorisant leur croissance et leur différenciation le long de la lignée requise [128].

Comme nous l'avons déjà évoqué, les ASC peuvent coopérer avec des progéniteurs endothéliaux. En effet, sur une plaie ischémisée chez la souris, les ASC apparaissent plus efficaces en combinaison avec des progéniteurs endothéliaux pour former un réseau vasculaire solide [115].

- **Chimioattraction :**

Les MSC cultivés sécrètent une variété de molécules chimioattractantes dont les cibles sont principalement les monocytes, les éosinophiles, les neutrophiles ou encore les basophiles. Réciproquement, la mobilisation et la migration des ASC administrées est renforcée par des chimioattracteurs endogènes générés sur le site de la plaie tels que le PDGF ou l'IL-6 [126].

- **Anti-fibrotique :**

Les propriétés anti-fibrotiques seraient principalement médiées par le bFGF et l'HGF, capables de prévenir la survenue de fibrose dans un modèle d'ischémie-reperfusion [129].

- **Antiapoptotique :**

La sécrétion de facteurs anti-apoptotiques par les ASC minimise l'ampleur de la mort cellulaire dans les tissus entourant les zones blessées [129]. L'hypoxie semble moduler le profil de sécrétion des ASC. En effet, dans les premières étapes de la lésion tissulaire, elle provoque une augmentation de la production de facteurs angiogéniques et anti-apoptotiques (VEGF, HGF, TGF  $\beta$ ) par les ASC, augmentant ainsi la croissance des cellules endothéliales et réduisant leur apoptose [8].

L'utilisation des ASC dans une plaie ischémisée semble alors particulièrement intéressante puisque celles-ci peuvent survivre et même proliférer dans des conditions hypoxiques, ce qui un facteur crucial pour leur effet thérapeutique et fonctionnel sur ce type d'environnement [130].

- **Antioxydant :**

Les ASC produiraient aussi des agents antioxydants, des piègeurs de radicaux libres ou des protéines de chocs thermiques, détruisant les substances toxiques rélarguées et apportant un environnement protégé aux cellules résidentes de la plaie.

Ainsi, les MSC ont un rôle dans chacune des phases de la cicatrisation (figure 10).

Durant la phase **inflammatoire**, de par leur effet immunomodulateur, les MSC limitent la réponse inflammatoire en inhibant les effets délétères des cytokines inflammatoires telles que le TNF.

Ce sont ces propriétés anti-inflammatoires des MSC qui les rendent particulièrement bénéfiques pour le traitement des plaies chroniques, car elles peuvent redonner l'impulsion à une plaie chronique pour réinduire le processus de cicatrisation.

Elles contribuent à la phase **proliférative** par leur activité sécrétoire. Les facteurs de croissance (VEGF, le FGF-2, KGF) qui favorisent le recrutement et la migration de kératinocytes, fibroblastes, cellules endothéliales et cellules souches endogènes du voisinage péri-lésionnel, favorisent la formation du tissu de granulation, l'angiogénèse et l'épithélialisation. Attirés par les tubules via le PDGF-BB [121], les MSC favoriseraient également la stabilisation des néovaisseaux. Enfin, au cours de cette phase, les ASC participeraient à la cicatrisation en se différenciant en tous types de cellules cutanées.

Enfin, elles régulent le **remodelage** de la blessure cicatrisée en stimulant la synthèse et le dépôt organisé de la MEC (régulation des MMP/TIMP).

En plus de ces effets paracrines, un autre type de communication intercellulaire existe, la **fusion cellulaire**, qui semble avoir son importance dans le phénomène de régénération. En effet, les cellules souches ont la capacité de fusionner avec plusieurs types cellulaires appartenant à différents organes [132, 133]. Le potentiel de régénération médié par la fusion vient du fait que ce processus peut modifier le programme génétique et donc le destin de la cellule.

La reprogrammation d'un noyau somatique, induite par l'influence de facteurs génétiques issus d'un autre noyau, n'est pas la seule possibilité, des facteurs cytoplasmiques pourraient aussi modifier le destin de la cellule au niveau épigénétique [134].

Ainsi, les ASC (issus de jeunes donneurs) sont capables de fusionner partiellement avec des noyaux de cardiomyocytes post-mitotiques impliquant des structures nanotubulaires permettant le transfert de mitochondries fonctionnelles de la cellule souches vers le cardiomyocyte [135].

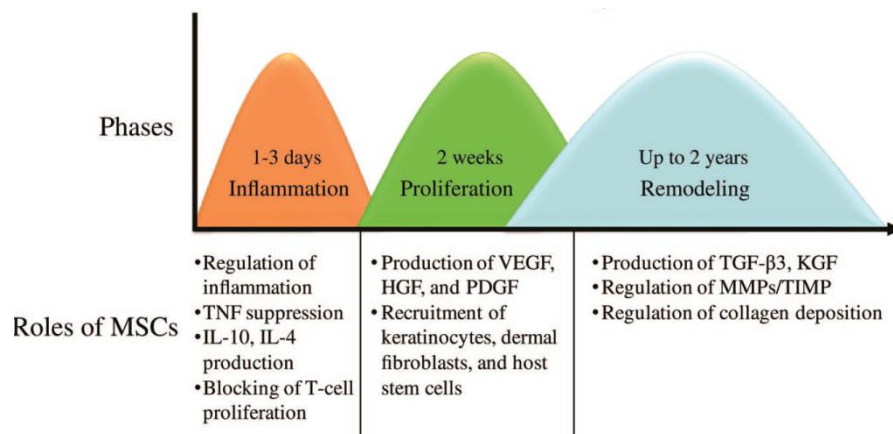


Figure 10 : Rôle des MSC dans les différentes phases de la cicatrisation [131]

Cette fusion a permis de reprogrammer le cardiomyocyte vers un stade de progéniteur. Les nanotubes, dont l'existence a été démontrée *in vitro* dans des lignées cellulaires ou dans des cellules fraîchement isolées [136], ont pris une nouvelle dimension après la découverte de leur présence *in vivo*, dans la cornée de souris [137]. Ce résultat est d'autant plus intéressant que le nombre et la longueur de ces nanotubes sont augmentés lors d'une inflammation de la cornée. Ces données sont à rapprocher du contexte inflammatoire que l'on retrouve dans le processus de cicatrisation et qui pourrait représenter le meilleur moment pour injecter des cellules souches.

Cependant, ce phénomène de fusion partielle n'a pas été démontré *in vivo*, il reste ainsi à déterminer sa fréquence et son réel impact en tant que mécanisme de régénération tissulaire.

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

---

La plupart des effets observés en clinique suite à l'administration des ASC, quel que soit le domaine d'application (infarctus du myocarde, maladies vasculaires périphériques, anomalies des tissus mous et osseux du crâne, fistules de la maladie de Crohn), est relié de manière importante à leur activité paracrine et leur participation à la croissance et au remodelage des vaisseaux sanguins [117].

Dans la plupart des modèles expérimentaux présentés sur la cicatrisation cutanée, la densité des vaisseaux est observée lors de l'administration d'ASC, mais la fonctionnalité de ces néovaisseaux est peu étudiée. Or, il semble important de connaître ce point puisque la récurrence des plaies chroniques dépend en partie de la capacité de perfusion cutanée du tissu cicatriciel.

Notre objectif est de démontrer l'effet bénéfique des cellules souches du tissu adipeux cultivées ou non sur la perfusion du tissu cicatriciel obtenu dans un modèle de cicatrisation *in vivo* et de mettre en évidence leur mécanisme d'action.

Ainsi, l'activité des ASC cultivées est comparée avec celle de la SVF, population cellulaire hétérogène dont la concentration en cellules souches mésenchymateuses d'intérêt est faible (entre 1 et 3%). L'avantage principal des ASC cultivées par rapport à celui de la SVF serait d'apporter un traitement maîtrisé par un nombre connu de cellules souches purifiées (>90%).

À terme, l'utilisation des ASC en clinique nécessitera une étape de congélation. Ainsi, toutes les cellules utilisées dans ce protocole sont fraîchement trypsinées et auront subi une étape de congélation préalable puisqu'une étude précédente réalisée au LSC a montré que cela ne modifiait pas leur capacité de prolifération.

Ce projet a été réalisé en partenariat entre le service de chirurgie plastique de la Croix-Rousse, le laboratoire des substituts cutanés de l'Hôpital Edouard Herriot pour l'extraction, la culture cellulaire et les analyses histologiques, le laboratoire de Physiologie de la faculté de pharmacie de Lyon pour l'hébergement, la réalisation des plaies et le suivi des animaux, et le Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique de Laennec pour les tests fonctionnels (Doppler, iontophorèse).

# 1. MATERIELS ET METHODES

Le schéma du déroulement expérimental est représenté sur la figure 11.

## 1.1. Obtention de la SVF et des ASC.

### 1.1.1. Recueil du tissu adipeux abdominal

En 2002, la Banque de Tissus et de Cellules des Hospices Civils de Lyon (BTC/HCL), située au sein de l'hôpital Edouard Herriot (HEH) a créé un Centre de Ressources Biologiques (CRB). Celui-ci recueille des résidus opératoires de chirurgie médicale ou plastique, en respectant les règles d'éthique et de sécurité sanitaire.

Les prélèvements de tissu adipeux proviennent du Service de Chirurgie Plastique Reconstructrice et Esthétique du pavillon R de l'hôpital de la Croix-Rousse.

Pour chaque prélèvement, un consentement éclairé est présenté au patient la veille de son intervention, autorisant le chirurgien à recueillir les tissus à des fins d'investigations scientifiques. De plus, une fiche de renseignements, indiquant les principales caractéristiques du donneur (âge, sexe) et du résidu opératoire (localisation du prélèvement, indication de l'intervention (abdominoplastie, lipoaspiration..)) est remplie et signée par le chirurgien.

Au bloc opératoire, le recueil du tissu adipeux peut se faire sous deux formes : une lipoaspiration liquide à l'aide d'une canule de 3 mm (technique de Coleman [138]) et un recueil de tissu solide (lobules de graisse). Pour ce protocole le lipoaspirat d'une patiente de 42 ans a été utilisé.

### 1.1.2. Extraction de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux et amplification des ASC

Les cellules (souche N° CH13008 GA) issues du lipoaspirat de la patiente ont été extraites selon le protocole mis au point au Laboratoire des Substituts Cutanés (figure 12).

Le tissu adipeux sous-cutané d'abord prélevé au bloc opératoire par lipoaspiration a ensuite été transporté au laboratoire dans des poches de lipoaspirat. Dès réception, il a été transféré dans des seringues de 20 ml, et centrifugé pendant 3 min à 1520g. L'huile résultant de l'éclatement des adipocytes (surnageant) et le culot sanguin ont été éliminés. La phase intermédiaire correspondant au tissu adipeux purifié a été conservée.

Le tissu adipeux a été digéré par l'ajout volume à volume d'une solution de collagénase IA (Roche), à 0.5mg/ml, au bain-marie à 37°C sous agitation constante pendant 30 minutes.



Recueil du lipoaspirat

**Extraction de la fraction stromale vasculaire (SVF) (J0)**

LSC

**Préparation du traitement et administration au groupe 1 (J0)**

- Caractérisation phénotypique
- Reprise de la **SVF** dans le vecteur (AH)
- Réalisation des plaies et administration

LSC / Laboratoire de physiologie de Rockefeller

Suivi du G1

**Mise en culture : isolation des ASC frais (J0)**

- J7 (fin de P0) : caractérisation phénotypique et réensemencement en P1
- J14 (fin de P1) : caractérisation phénotypique et congélation
- J21 : Décongélation, caractérisation phénotypique et ensemencement en P2

LSC

**Préparation du traitement et administration au groupe 2**

- J28 (fin de P2) : reprise dans vecteur (AH)
- Réalisation des plaies et administration (J0 du G2)

LSC / Laboratoire de physiologie de Rockefeller

Suivi du G2

**J28 : Réalisation de tests fonctionnels et biopsies**

- Test doppler/iontophorèse
- Test de compression
- Sacrifice des souris et réalisation des biopsies pour analyses immunohistologiques

**J56 (J28 du G2) : Réalisation de tests fonctionnels et biopsies**

- Test doppler/iontophorèse
- Test de compression
- Sacrifice des souris et réalisation des biopsies pour analyses immunohistologiques

Après centrifugation à 170g, pendant 5 min, le culot a été repris dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco) supplémenté de 10% en sérum de veau foetal (HyClone™ FetalClone II™ Serum ; Thermo Scientific) permettant de stopper l'action de la collagénase. Une autre centrifugation a été réalisée pendant 5 min à 170 g puis le culot a été repris dans 10 ml de PBS (solution tamponnée), et filtré sur un filtre de 70µm. Le filtrat a alors été centrifugé à 170 g pendant 5 minutes, le culot résultant a été repris par un tampon de lyse (NH<sub>4</sub>Cl ; Sigma), à 37°C pendant 20 min éliminant les hématies. Cette action lytique a été stoppée par l'ajout du milieu DMEM + 10% de SVII. Une nouvelle centrifugation à 243 g, pendant 5 min a été réalisée pour permettre la séparation des résidus d'hématies des cellules de la fraction stromale vasculaire (SVF). Le culot contenant les cellules de la SVF a ensuite été repris par le milieu DMEM + sérum de veau. La numération des cellules viables a été effectuée par la méthode d'exclusion au bleu de Trypan sur lame de Malassez puis les cellules ont été utilisées de la façon suivante :

- Une partie des cellules de la SVF (soit 10M), préalablement centrifugée, a été reprise dans un volume adéquat d'acide hyaluronique (AH) (Cytocare® 532, Revitacare) pour l'administration au premier groupe de souris *nude*.

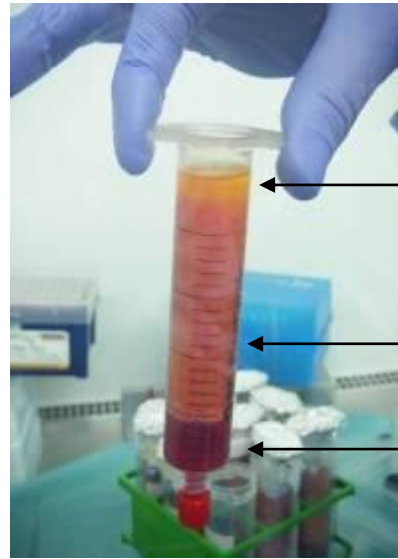
- Le reste des cellules a été mis en culture dans des flasques T175 à la densité de 10M de cellules par flasque au minimum, dans du milieu de prolifération contenant du DMEM (Gibco), du HAM-F12 L-Glutamine (Gibco) (50/50, v/v), du sérum de veau foetal à 10 % (Hyclone), 10 ng/ml de FGF-2 (Sigma) et des antibiotiques (20 µg/ml de gentamycine (Panpharma) et 100 UI/ml de pénicilline (Panpharma)). Après 1 heure d'adhésion cellulaire, le milieu a été éliminé et remplacé par du milieu frais. Le milieu de culture a ensuite été changé 3 fois par semaine. Les ASC ont été maintenues en culture dans du milieu de prolifération à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'au passage P1 (soit 1 semaine environ). Les cellules ont ensuite subi une étape de congélation : elles ont été décollées avec de la trypsine contenant 0.01% EDTA (Invitrogen) et congelées en fin de P1 avant d'être décongelées une semaine plus tard et mises en culture en P2. Les ASC décongelées ainsi obtenues en fin de P2 ont été trypsinées, comptées et reprises dans la matrice d'acide hyaluronique avant d'être injectées au deuxième groupe de souris *nude*.

## 1.2. Caractérisation phénotypique des cellules administrées

L'analyse immunophénotypique est réalisée par cytométrie en flux (BD FACSCanto™) II et les résultats générés sont acquis et analysés avec le logiciel Diva 6.1.3.



Centrifugation 3 min  
à 1520g



Surnageant  
huileux

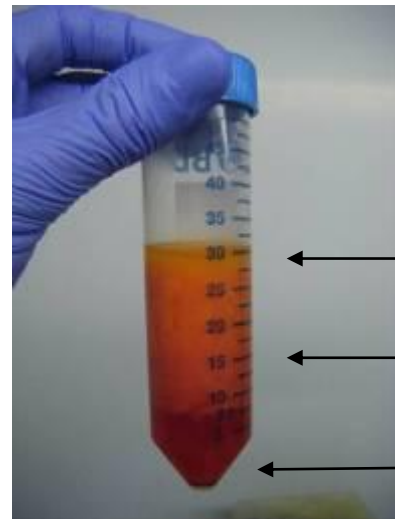
TA purifié

Culot sanguin

Digestion enzymatique à 37°  
30min



Centrifugation

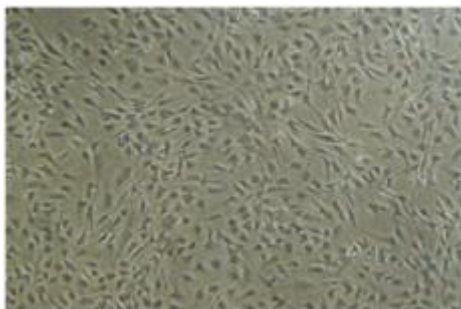


Surnageant  
huileux

TA

Culot cellulaire

Filtration, tampon de lyse,  
adhésion



ASC en culture

Figure 12 : Extraction des ASC du tissu adipeux

La détermination du phénotype des cellules dans cette étude est réalisée en accord avec les recommandations de l'ISCT. [39] Ce comité renseigne les critères minimums nécessaire pour définir des cellules mésenchymateuses, à savoir en ce qui concerne le phénotype : CD73+, CD90+, HLA-ABC+, CD14-, CD45-, HLA-DR- et CD34+/-.

Brièvement,  $2,5 \cdot 10^5$  cellules sont incubées, à l'obscurité pendant 20 min à température ambiante avec des concentrations adéquates d'anticorps monoclonaux de souris anti-humain conjugués à divers fluorochromes ou avec un isotype contrôle utilisé à la même concentration, à différents temps :

- Sur la SVF
- En fin de P0
- En fin de P1 (avant congélation)
- En fin de P2 (après décongélation)

Les cellules sont ensuite lavées deux fois par centrifugation à 700g (centrifugeuse CR3i rotor T40, Jouan) après ajout de PBS.

Les anticorps utilisés pour le phénotypage ont tous été obtenus chez BD Biosciences (Le Pont de Claix, France) et sont tous, sauf précision, couplé à la phycoérythrine (PE). Les cellules sont marquées avec les anticorps suivants : anti-CD14, anti-CD45 (couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine, FITC), anti-HLA-DR, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD34 et anti-HLA-ABC (couplé à l'Alexa488). Les données sont exprimées par le pourcentage de cellules qui expriment le marqueur étudié.

Le phénotypage des cellules au passage 1 avant congélation et au passage 2 après congélation permet de valider la stabilité phénotypique des cellules étudiées après une étape de congélation-décongélation.

### **1.3. Protocole expérimental *in vivo* chez la souris nude**

#### **1.3.1. Réalisation des plaies et administration des traitements**

42 souris nudes mâles âgées de 6 semaines sont anesthésiées par injection intrapéritonéale de buprénorphine (0,1 mg/kg), de xylazine (2mg/kg) et de kétamine (20mg/kg). Les opérations chirurgicales ont été réalisées en respectant des règles sanitaires (désinfection à la biseptine, port de gants et de masque, outils stériles).

Une plaie excisionnelle profonde (retrait de la totalité de l'épaisseur cutanée jusqu'au fascia) de 14 mm de diamètre a été réalisée selon le modèle de Galiano [139], constituant une référence dans les modèles expérimentaux de cicatrisation, sur le dos de chaque souris à l'aide d'une paire de ciseaux chirurgicaux stériles.

Puis, un anneau de silicone (Folioxane®, FU050M), préalablement désinfecté avec de la bétadine et rincé avec du PBS (Sigma), de 14 mm de diamètre intérieur a été suturé autour de chaque plaie par 8 points chirurgicaux (Figure 13).

Chacune des plaies a été traitée par 1 million de cellules (ASC ou SVF) dans un volume total de 500µL d'acide hyaluronique dont 200µL injectés en local et 300µL répartis en 4 à 8 injections périlésionnelles. Un pansement transparent a été collé pour permettre le suivi quotidien de la cicatrisation sans les débander et sans gêner la réépithélialisation.

Deux groupes de 21 souris ont été traités à 4 semaines d'écart et organisés de la façon suivante (tableau III) :

- Groupe 1 : Injection de la SVF dans l'acide hyaluronique à 10 souris, et d'acide hyaluronique seul à 6 souris. Les 5 dernières souris sans traitement ont servi de témoin de cicatrisation spontanée.
- Groupe 2 : Injection des ASC dans l'acide hyaluronique à 11 souris, et d'acide hyaluronique seul à 5 souris. De même, les 5 dernières souris sans traitement ont servi de témoin de cicatrisation spontanée.

|                          | Groupes        |           |                         |           |
|--------------------------|----------------|-----------|-------------------------|-----------|
|                          | ASC décongelés | SVF       | Cicatrisation spontanée | Témoin AH |
| <b>Nombres de plaies</b> | <b>11</b>      | <b>10</b> | <b>10</b>               | <b>11</b> |

Tableau III : Répartition des traitements administrés aux groupes de souris

### 1.3.2. Suivi des animaux et observations des plaies

#### 1.3.2.1. **Suivi des animaux**

Une injection quotidienne de buprénorphine (anti-douleur) a été administrée pendant les deux premières semaines (0,1 mg/kg la première semaine et 0,05 mg/kg la deuxième). Tous les jours et ce jusqu'à la fin de l'étude, les éventuels effets indésirables ont été relevés (rougeur, inflammation,...) et les souris ont été pesées pour une évaluation de l'état général.

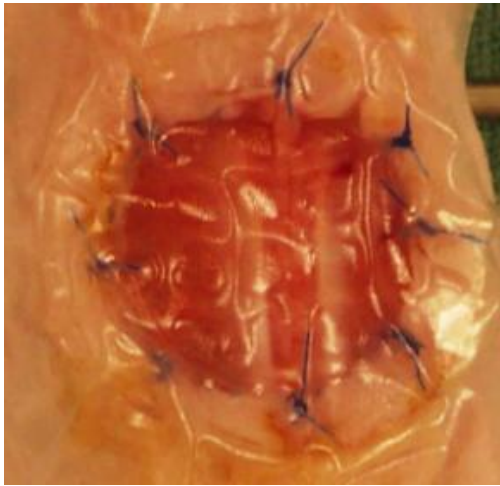


Figure 13 : Exemple type d'une plaie réalisée selon le modèle de Galiano utilisé dans notre étude

### 1.3.2.2. Observations macroscopiques et microscopiques de la cicatrisation

- Observations macroscopiques :

Tous les jours et ce jusqu'à cicatrisation complète, les contrôles de la qualité de la plaie ont été suivis : suivi de l'épithélialisation, exsudation, fixation de l'anneau, signes d'infection. Des photos ont été prises pour réaliser la mesure exacte de la plaie. Les surfaces des plaies ont été relevées en pixels en traçant les bords de la plaie grâce au logiciel d'analyse d'image Photoshop 7.0. Le taux de cicatrisation est calculé selon la formule :

$$\frac{\text{Surface à J0 (pixel)} - \text{Surface de zone non épithélialisée le jour de l'observation (pixel)}}{\text{Surface à J0 (pixel)}} \times 100$$

- Observations microscopiques :

A J28, des tests fonctionnels ont été réalisés. Puis, les souris ont été sacrifiées et les surfaces cicatricielles ont été prélevées pour histologie, immunohistologie, RT-PCR et Western Blot (WB) : une partie des biopsies a été coupée en deux, une moitié a été incluse en paraffine et l'autre moitié a été soit conservée pour le WB (analyses non réalisées) ou la RT-PCR dans l'azote liquide (résultats non disponibles), soit conservée pour OCT (*Optimum cutting temperature*, Tissu-Tek®). Les organes de certaines souris ont également été conservés dans du formol pour des analyses de biodisponibilités (résultats non disponibles).

## 1.4. Laser Doppler Flowmetry (LDF) couplé à la iontophorèse

Le principe du **laser doppler (LDF)** est utilisé pour étudier les variations de débit sanguin cutané. Un faisceau laser pénètre la peau et une fraction de la lumière est renvoyée par le mouvement des éléments sanguins, générant un signal proportionnel à la perfusion du tissu.

La **iontophorèse** est un procédé permettant l'augmentation de la pénétration d'actifs ioniques à travers un tissu via l'application d'un courant électrique direct, par répulsion de charges complémentaires et attraction des charges opposées. L'actif est appliqué sous une électrode de même charge et une électrode de charge opposée est placée sur un site neutre du corps de l'animal. La différence de potentiel appliquée active la solution ionique et les molécules migrent selon leur polarité dans la solution.

La technique **LDF couplée à la iontophorèse** permet de mesurer les variations de débit sanguin cutané après administration de vasodilatateurs via un faible courant électrique en utilisant le principe du laser Doppler. On mesure de cette manière, la réactivité vasculaire cutanée à l'administration d'une drogue vasoactive, l'acétylcholine (ACh) et le sodium nitroprusside (SNP), administrée par la technique de iontophorèse.

L'appareil qui a été utilisé pour la iontophorèse consiste en une chambre en forme d'anneau, dans laquelle se trouve une mousse imbibée de la drogue vasoactive, montée à l'intérieur d'une électrode connectée à un contrôleur de iontophorèse. Une électrode de référence raccordée au dispositif de iontophorèse a été collée sur le dos de la souris pour compléter le circuit, à une polarité adaptée en fonction de la charge électrique de la molécule vasoactive (chambre positive pour l'ACh et négative pour le SNP) (figure 14).

L'ACh, délivrée à l'aide d'un courant anodal, induit une vasodilatation via la production de NO (monoxyde d'azote, agent vasodilatateur) par l'endothélium. Il teste ainsi la vasodilatation endothélium-dépendante.

Le SNP, délivré à l'aide d'un courant cathodal, est un donneur exogène de NO. Il teste ainsi directement la fonction du muscle lisse pariétal et reflète ainsi la vasodilatation non endothélium-dépendante [140] (figure 15).

Ainsi, le test de stimulation par le SNP permet de savoir si les éventuelles différences de réponse vasodilatatrices entre les groupes (cicatrisation spontanée, acide hyaluronique, SVF et ASC) sont liées à la fonction de l'endothélium ou à celle des cellules musculaires lisses. En effet, à titre d'exemple, une réduction de la réponse vasodilatatrice suite à une stimulation par l'ACh sans réduction de la réponse suite à celle de SNP indique une dysfonction endothéliale.

Pour l'expérimentation, les souris ont été anesthésiées avec du Nesdonal® (Thiopental, Nesdonal, Merial, Lyon, France) dosé en fonction du poids de l'animal. Les souris étaient en position couchée, poitrine vers le bas.

Pour chaque plaie, le flux sanguin cutané a été mesuré sur une surface de 7 mm<sup>2</sup> par laser Doppler sur la cicatrice (PF415-214; Perimed, Järfälla, Suède). Le signal du flux sanguin obtenu a été enregistré avec une fréquence d'échantillonnage de 20 Hz grâce à un système d'acquisition (Biopac, Santa Barbara, CA, USA). Le signal a été moyenné toutes les 10 secondes afin de réduire les variations instantanées dues à la vasomotricité.



Chambre contenant l'ACh, couplée à une électrode positive

Electrode de référence négative

Sonde de mesure de la température

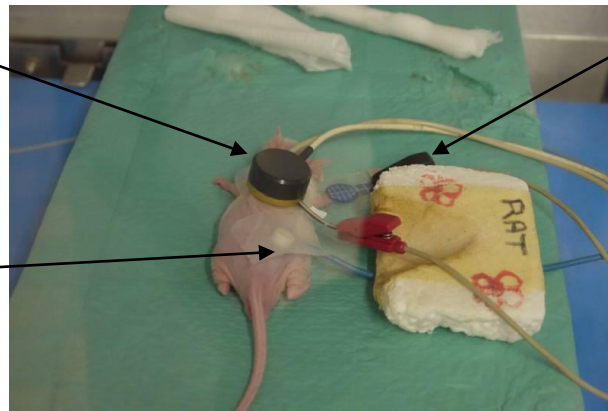


Figure 14 : Photographie du dispositif de mesure de la vasodilatation induite par l'Acétylcholine (ACh) par iontophorèse

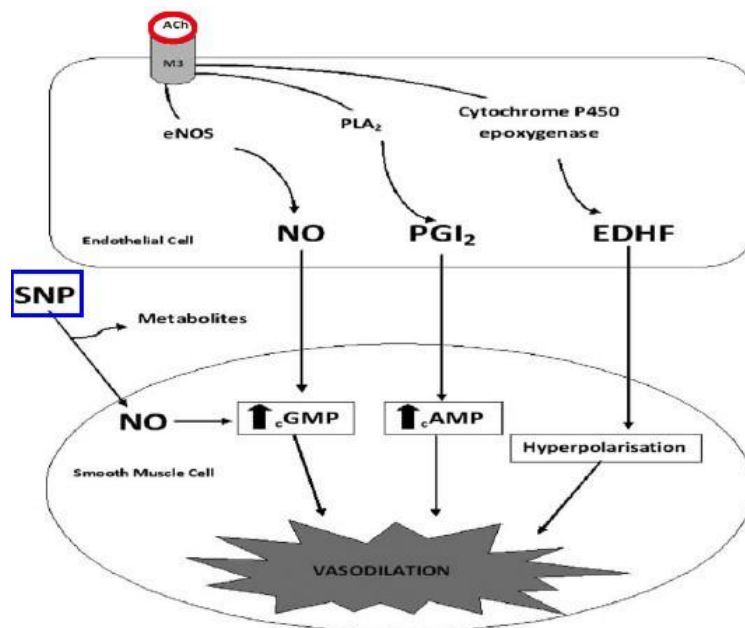


Figure 15 : Mécanisme de vasodilatation induite par l'Acétylcholine et le SNP [140]

La température cutanée (BAT-12, Physitemp instruments, Clifton, NJ) et la pression artérielle (XBP-1000, Kent scientific, Torrington, CT) sont mesurées grâce à des capteurs et doivent être constantes avant de débiter l'expérimentation. À chaque mesure, 0.1 mL de substances vasodilatatrices a été administré dans la chambre. Avant d'activer la stimulation électrique, une minute a été respectée afin d'obtenir un flux sanguin constant (niveau de base). La stimulation électrique dure 10 secondes pour l'ACh et 20 secondes pour le SNP et a été appliquée à une intensité de 0.1 mA. Le signal a été enregistré pendant 8 à 10 min.

Pour chaque condition, le débit sanguin cutané est exprimé en unité arbitraire (UA) et la réponse vasodilatatrice en pourcentage de réponse par rapport à l'état basal :

$$\text{Réponse vasodilatatrice (\%)} = (\text{Débit max-débit basal (UA)}) / \text{Débit basal (UA)} \times 100$$

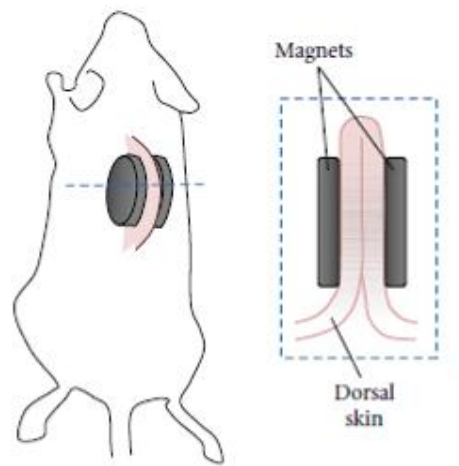
### 1.5. Test de compression

Le test de compression consiste à évaluer la réactivité des vaisseaux face à une contrainte mécanique. Une pression est appliquée sur la zone cicatricielle à l'aide d'un aimant et le flux sanguin est mesuré à l'aide d'un laser Doppler avant et après application de l'aimant. Cette compression entraîne une diminution de l'apport sanguin et de l'apport en oxygène. Dans des conditions physiologiques normales, une hyperémie réactionnelle compensatrice se manifeste à la levée de la compression, c'est-à-dire un afflux excessif de sang.

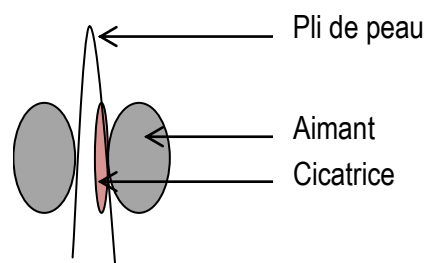
Les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane (Aerrane®, Baxter) pour permettre la bonne application de l'aimant. Les aimants ont été appliqués (pression de 100 mmHg) de part et d'autre de la cicatrice pendant 3h comme indiqué sur la figure 16 (suivi d'un modèle d'ulcère de pression utilisé par Wong et al [141]). Une photographie de la zone cicatricielle a été prise avant et après application de l'aimant.

Après 3h, les souris ont à nouveau été anesthésiées (Nesdonal®, Thiopental, Merial, Lyon, France) et les aimants ont été retirés. La perfusion sanguine a immédiatement été mesurée au niveau de la cicatrice pendant 5 minutes à l'aide d'une sonde laser Doppler (système de balancier à l'équilibre) (PF415-214; Perimed, Järfälla, Suède). De même, 24h après le retrait des aimants, les souris ont été ré-anesthésiées et une photographie a été prise avant de mesurer à nouveau le flux sanguin pendant 5 minutes.

Le flux sanguin obtenu après compression a été comparé avec celui avant compression. Les résultats expriment le ratio du pourcentage du flux sanguin obtenu avant compression sur celui obtenu immédiatement et 24h après le retrait de l'aimant.



(a)



(b)

Figure 16 : Disposition de l'aimant : (a) Modèle d'ulcère de pression d'après Wong et *al.* [141] (b)

Représentation schématique de la pose de l'aimant

## 1.6. Analyses statistiques

Pour les analyses statistiques, un test non paramétrique Mann et Whitney a été utilisé à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad, La Jolla, CA) pour réaliser une comparaison entre les groupes. Les résultats sont considérés significativement différents lorsque  $p < 0,05$ . Toutes les représentations graphiques indiquent la moyenne des valeurs obtenues accompagnée de l'erreur standard (*standard error*).

## 1.7. Analyses immunohistologiques des zones cicatricielles

### 1.7.1. Coloration à l'HPS

La coloration à l'Hématoxylin Phloxin Safran (HPS) permet de visualiser l'organisation structurale cutanée.

Les échantillons ont été placés dans des histocassettes et ont été fixés pendant 24 heures dans une solution de formol à 10% (Sigma) puis inclus en paraffine. Des coupes de 5 $\mu$ m d'épaisseur ont été colorées à l'HPS selon un procédé automatisé (Varistan 24-4 de Shandon) au laboratoire d'anatomopathologie. L'hématoxyline est un colorant basique qui colore le noyau des cellules en bleu. La phloxine est un colorant acide qui teinte le cytoplasme en rose et le safran colore les fibres conjonctives en orange. Pour chaque échantillon, **l'épaisseur du derme** est mesurée par analyse Photoshop 7.0 (deux zones par échantillon) et est comparée à celle de la peau saine environnante de l'échantillon. Les résultats expriment la moyenne du pourcentage de variation de l'épaisseur du derme de la cicatrice par rapport à la peau saine, accompagnée de l'écart-type.

### 1.7.2. Marquage alpha-SMA

Un marquage alpha SMA (*smooth muscle actin*), qui met en évidence les myofibroblastes, les cellules musculaires lisses et péricytes, a été réalisé pour aider à la détection des vaisseaux lors de la mesure de la densité vasculaire de la cicatrice.

Des coupes de 5  $\mu$ m d'épaisseur ont de nouveau été réalisées sur les tissus paraffinés. Elles ont été déparaffinées et hydratées par des bains successifs de 5 minutes de méthylcyclohexane, d'éthanol 100% puis 70% et d'eau distillée. Elles ont ensuite été démasquées à la fiscine (kit Zymed).

L'inhibition des peroxydases endogènes a été obtenue en rinçant les coupes successivement dans du Tween 20 (dilué à 0,2% dans du PBS) (Sigma-Aldrich) puis en les incubant pendant 20 minutes dans du NGS (sérum de chèvre) à 3% additionné de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 5% le tout dilué dans du PBS. Les coupes ont ensuite été une nouvelle fois rincées dans du PBS-Tween 20 (0,2%).

Le blocage des antigènes a ensuite été effectué dans du NGS à 5% pendant 1 heure afin d'éliminer la non-spécificité puis les coupes ont été marquées avec un anticorps murin anti-alpha SMA (1:200, Novocastra) dilué dans une solution de PBS-NGS 5%. La détection de l'anticorps primaire a été réalisée avec un anticorps secondaire anti-souris HRP (kit DAKO).

Le substrat chromogène, la DAB (3,3-diaminobenzidine, Dakocytomation, Glostrup, Danemark) a été rajouté environ 1 minute afin de révéler l'immunocomplexe anticorps secondaire-peroxydase, avant que les coupes n'aient été rincées à l'eau courante. Enfin, les coupes ont été contre-colorées environ 40 secondes à l'Hematoxyline (100%) de Harris (Sigma-Aldrich) diluée au ¼ avant de coller les lamelles.

Les vaisseaux du derme ont alors été comptés par deux opérateurs indépendants en aveugle. Deux champs de chaque échantillon (grossissement x200) ont été pris en compte. Les résultats expriment le nombre moyen de vaisseaux obtenus pour chaque groupe, accompagné de l'écart-type.

### 1.7.3. Coloration au rouge sirius

La coloration au rouge Sirius permet de mettre en évidence les fibres de collagène de la cicatrice. Les coupes (5 µm) préalablement mises sur des lames de verre silanées ont été déparaffinées et hydratées par des bains successifs de 5 minutes de méthylcyclohexane, d'éthanol 100% puis 70% et d'eau distillée.

Puis les coupes ont été mises en contact avec le rouge sirius (Bio-optica, Milan, Italie) pendant 1h à température ambiante, et ensuite rincées 2 fois 5 minutes dans de l'eau acétylée (eau à 0,5% d'acide acétique glacial). Une fois la coloration effectuée, les coupes ont été déshydratées par des bains successifs d'éthanol 70% puis 100% et de methylcylcohexane. Le montage se fait à l'aide du mountex (Histolab, Gothenburg, Suède). Les lames sont visualisées en microscopie optique avec lumière polarisée (microscope Leica).

Comme les molécules de rouge Sirius s'alignent le long des fibres de collagène et augmentent leur biréfringence, il est possible de visualiser spécifiquement le collagène fibrillaire avec un système de polariseurs croisés. Plus le rapport surface/volume de collagène est grand, plus la coloration au rouge Sirius est forte. Les fibres qui apparaissent de couleur rouge-orangé correspondent à des fibres de collagène matures. Celles apparaissant en vert-jaune sont microfibrillaires et immatures.

## 2. RESULTATS

### 2.1. Caractérisation phénotypique des cellules administrées

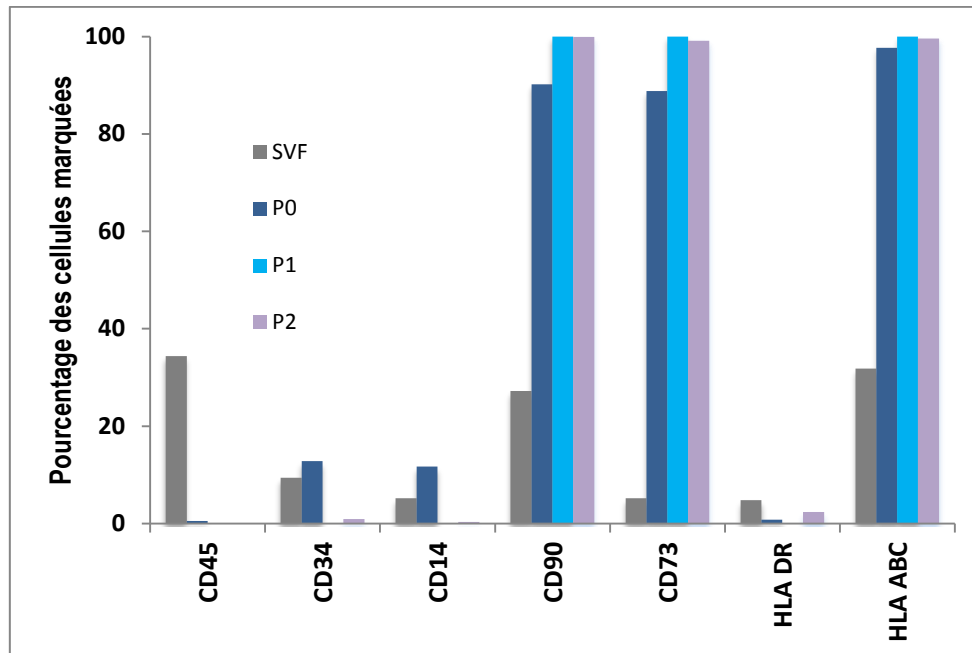


Figure 17 : Profil phénotypique de la SVF et des ASC en fin de P0, avant congélation (P1) et après congélation (P2)

Le profil phénotypique de la SVF (gris) et des ASC est représenté sur la figure 17. La fraction vasculaire stromale apparaît très hétérogène. Elle contient des cellules exprimant les marqueurs de cellules mésenchymateuses dont CD90 (27,2%), CD73 (5,2%), HLA-ABC (32%) mais également des cellules hématopoïétiques exprimant le CD14 (5,2%), HLA-DR (4,8%), CD45 (34,4%) mais aussi CD34 (9,4%). Au passage 0, on observe un enrichissement en cellules souches mésenchymateuses exprimant les marqueurs CD73 (88%), CD90 (90,2%) et HLA-ABC (97,7%) qui est d'autant plus prononcé pour les passages 1 et 2 puisque les pourcentages sont supérieurs à 99%. A l'inverse, les marqueurs hématopoïétiques ont une nette tendance à diminuer au cours des passages, excepté pour CD14 qui augmente entre la SVF et P0 (5,2% et 11,7%, respectivement) et pour CD34 (9,4% et 12,8%, respectivement), mais dont les expressions ont ensuite été perdues en P1 et P2. Le CD45 qui est exprimé par 34% des cellules de la SVF n'est exprimé que par moins de 2% des cellules dans les 3 passages suivants (P0, P1 et P2), tout comme le marqueur HLA-DR qui passe de 4,8% de cellules l'exprimant dans la SVF à moins de 2% pour les passages suivants.

## 2.2. Suivi de l'expérimentation animale

### 2.2.1. Analyse de la perfusion du tissu cicatriciel

#### 2.2.1.1. Laser Doppler Flowmetry (LDF) couplé à la iontophorèse

Les résultats des contrôles respectifs cicatrisation spontanée et acide hyaluronique ne sont pas différents d'un groupe à l'autre, c'est pourquoi nous les avons rassemblés en un groupe cicatrisation spontanée et acide hyaluronique. Les principaux critères pour évaluer la qualité des résultats obtenus étaient la température cutanée, la pression artérielle ainsi que l'aspect du tracé de la courbe du flux sanguin obtenu.

La température cutanée, mesurée systématiquement avant et pendant chaque mesure, était d'environ 35°C.

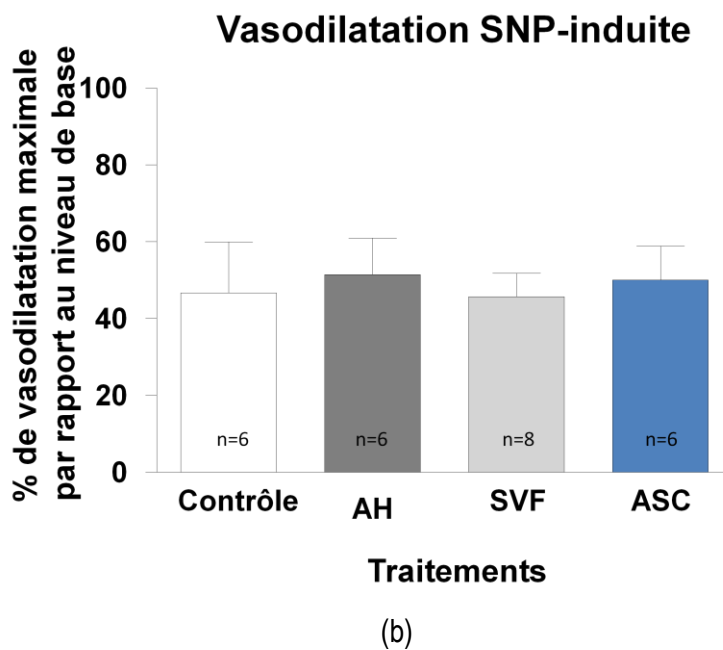
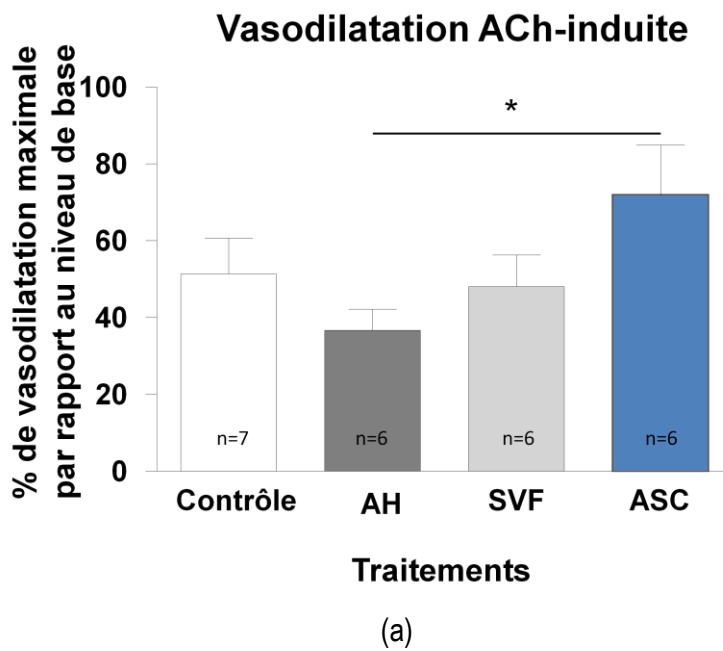
Ainsi, nous avons exclu certains résultats non interprétables, notamment lorsque les tracés étaient incohérents, dus aux mouvements respiratoires probablement liés à des problèmes d'anesthésie. Nous avons également écarté les valeurs dont le flux sanguin de base était d'une valeur supérieure à 50 UA. De plus, la mesure de la pression a été peu satisfaisante car les valeurs obtenues étaient peu cohérentes. Ainsi, sur 10 souris par condition, les résultats de 6 à 8 d'entre elles ont été conservés et sont présentés ici.

La figure 18 représente le pourcentage de vasodilatation maximal obtenu après stimulation par l'acétylcholine (ACh) et le sodium nitroprusside (SNP) par rapport au niveau de base mesuré avant stimulation, pour chaque condition (Cicatrisation spontanée ou contrôle, acide hyaluronique, SVF et ASC).

Pour la réponse ACh-induite, seul l'effet des ASC est significatif par rapport à l'acide hyaluronique représentant la condition témoin excipient ( $p < 0.05$ ), avec une vasodilatation de 72% contre 37%. La vasodilatation observée avec la SVF (48%) et la cicatrisation spontanée (51%) est moins importante qu'avec les ASC mais ces différences ne sont pas significatives.

Pour la réponse SNP-induite, on ne constate aucune différence de vasodilatation entre chacune des conditions. En effet, la vasodilatation est de 51% pour l'AH, 50% pour les ASC, 47% pour la cicatrisation spontanée et 46% pour la SVF. Contrairement à la réponse ACh-induite, les ASC donnent une réponse similaire à celle de l'AH.

Ces résultats indiquent que la fonction musculaire lisse est identique entre les groupes.



**Figure 18** : Réponse vasodilatatrice (%) dans les tissus cicatriciels après stimulation par l'ACh (a) et le SNP (b) comparés au niveau de base. (\*= $p < 0,05$  test de Mann-Whitney)



### 2.2.1.2. Test de compression

La figure 19 présente la réponse de reperfusion après une épreuve de compression, exprimée en pourcentage de variation du flux sanguin par rapport à l'état basal de repos, immédiatement après compression et 24 heures après.

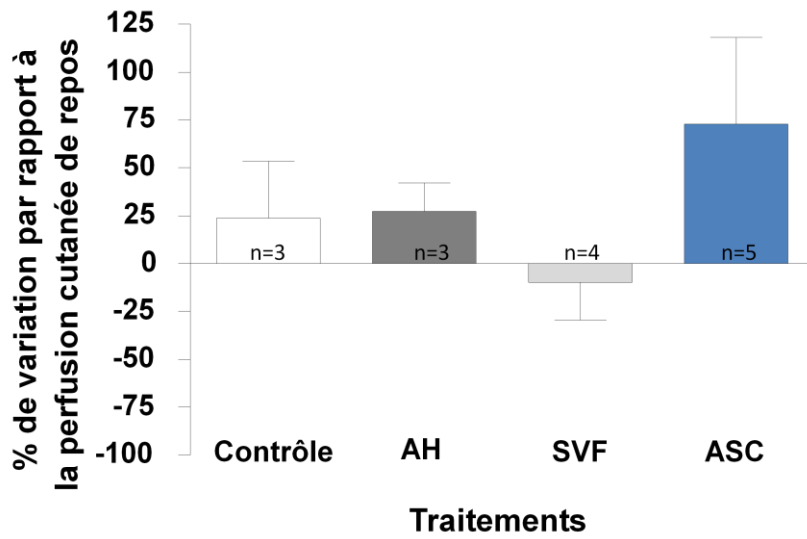
Ces tests n'ont pas pu être réalisés sur toutes les souris puisque des prélèvements de peau non fragilisées par cette épreuve de compression étaient nécessaires pour les analyses histologiques. Certaines souris sont mortes 24h après, réduisant le nombre de mesures 24h post-compression. Ainsi, le nombre de souris utilisé pour réaliser les expériences varie de 2 à 5 par condition. Celui-ci étant trop faible, nous n'avons pas réalisé de tests statistiques. Les photographies des tissus cicatriciels avant et après compression sont présentées en annexes.

Dans le groupe témoin de cicatrisation spontanée, la re-perfusion cutanée est de 24% à la levée de la compression. 24 heures après la compression, la perfusion revient au flux basal.

Dans les groupes traités avec l'acide hyaluronique et la SVF, la re-perfusion cutanée à la levée de la compression est de 27% et -9% respectivement. Elle devient inférieure à celle de l'état basal 24h après (-55% pour l'AH et -30% pour la SVF).

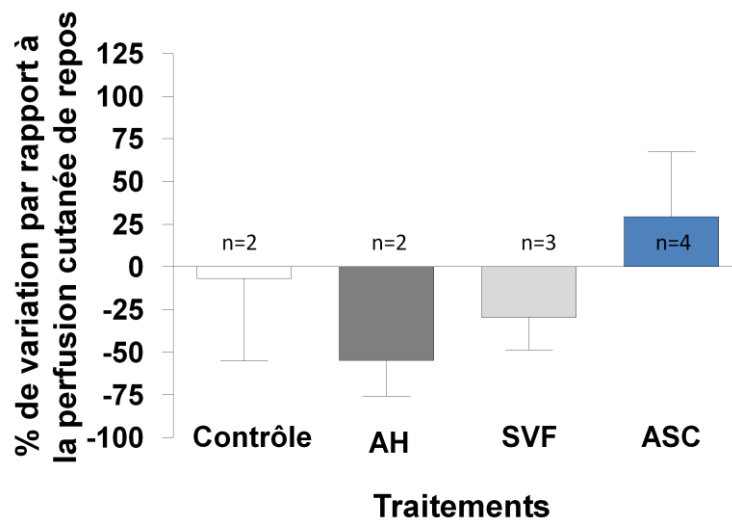
Enfin, avec les ASC, on constate une forte re-perfusion cutanée par rapport au flux de base avant compression (73%). 24 heures après, le pourcentage de perfusion est toujours supérieur à celui de l'état initial (30%).

### Immédiatement après le retrait des aimants



(a)

### 24H après le retrait des aimants



(b)

Figure 19 : Variation (%) du flux sanguin dans les tissus cicatriciels immédiatement après compression (a) et 24H après (b), comparés à la perfusion avant compression

## 2.2.2. Etude de la qualité du tissu cicatriciel obtenu : analyses immunohistologiques

### 2.2.2.1. Epaisseur du derme

La figure 20 représente le pourcentage de variation de l'épaisseur du derme des zones cicatricielles des souris non traitées (Contrôle), traitée avec l'AH, la SVF ou les ASC, par rapport à une zone saine sur une même coupe histologique d'un même échantillon, accompagné de l'écart-type. Des photographies représentatives sont présentées en annexes. Deux mesures par zone (pour la peau saine et pour la peau cicatricielle) ont été effectuées sur chaque coupe (grossissement x100). Certaines coupes présentaient des zones saines repliées sur elles-mêmes ou bien des déchirures, elles ont ainsi été écartées pour éviter tout biais dans l'analyse de la mesure. De même, les échantillons dont les coupes étaient mal orientées (follicules pileux en biais dans les zones saines) n'ont pas été conservés pour l'analyse puisque l'évaluation de l'épaisseur aurait été faussée. Ainsi, le nombre d'échantillon analysé est faible (n=2 à 6), des tests statistiques n'ont donc pas pu être réalisés.

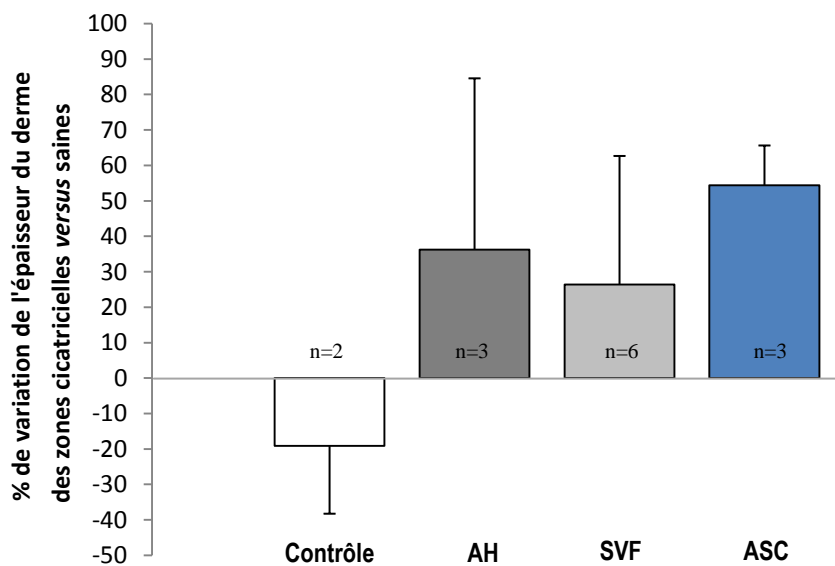


Figure 20 : Variation de l'épaisseur du derme (%) des zones cicatricielles des différentes conditions par rapport à une zone saine

Comparativement au contrôle cicatrisation spontanée, qui présente une diminution de l'épaisseur du derme (-19%), les différents traitements ont induit une augmentation importante de l'épaisseur du derme. Par contre, la variation d'épaisseur n'apparaît pas différente d'un traitement à l'autre (+36% pour l'acide hyaluronique et +26% pour la SVF) même si le meilleur résultat de la moyenne est obtenu avec les ASC cultivées (+54%). L'épaisseur moyen du derme des plaies traitées avec les ASC est de 580  $\mu\text{m}$  et celle du témoin non traité est de 350  $\mu\text{m}$ .

### 2.2.2.2. Densité vasculaire

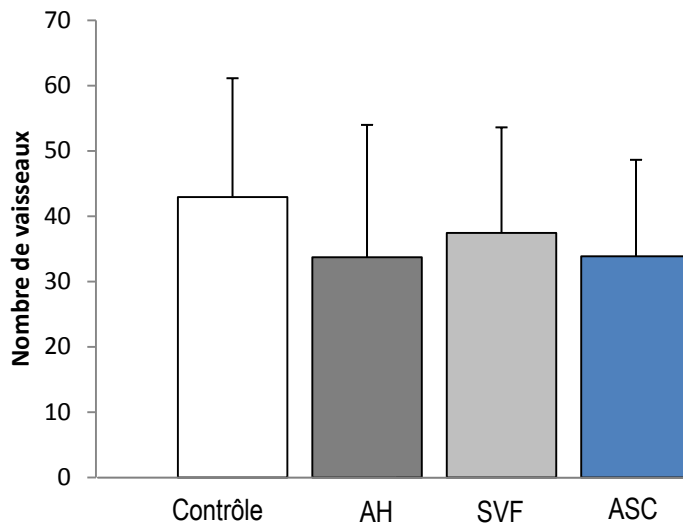


Figure 21 : Nombre moyen de vaisseaux dans le tissu cicatriciel après différents traitements

La figure 21 présente le nombre de capillaires moyen, accompagné de l'écart-type, obtenu après observation de 2 champs de 5 coupes au minimum par conditions (n=10). Les cicatrices résultant de la cicatrisation spontanée présentent le nombre moyen de capillaires le plus important ( $x=43\pm 18$ ).

Les zones traitées sont moins riches en capillaires ; les cicatrices traitées par les ASC ainsi que son témoin acide hyaluronique ont un nombre moyen de capillaires plus faible ( $34\pm 14$  et  $34\pm 20$  respectivement). Celui de la SVF est sensiblement supérieur ( $37\pm 16$ ). Il n'y a pas de différence significative entre les traitements (Test de Mann-Withney).

### 2.2.2.3. Etude qualitative des fibres de collagènes

La figure 22 donne un exemple représentatif des photographies en lumière polarisée d'une coupe de cicatrice d'une peau de souris normale (témoin positif), d'une peau témoin cicatrisation spontanée et d'une peau traitée par l'AH, la SVF et les ASC.

Les fibres de collagène matures visibles en rouge sont nombreuses dans le témoin peau normale (Fig 22A) alors qu'elles sont absentes dans la zone de cicatrisation spontanée (Fig 22B).

Le traitement par les ASC induit leur réapparition nette (Fig 22E). Elles sont plus rares avec le traitement par l'acide hyaluronique et la SVF.

Par contre, de nombreuses fibres immatures mises en évidence par les colorations verte ou jaune sont présentes dans toutes les conditions même dans la peau normale.

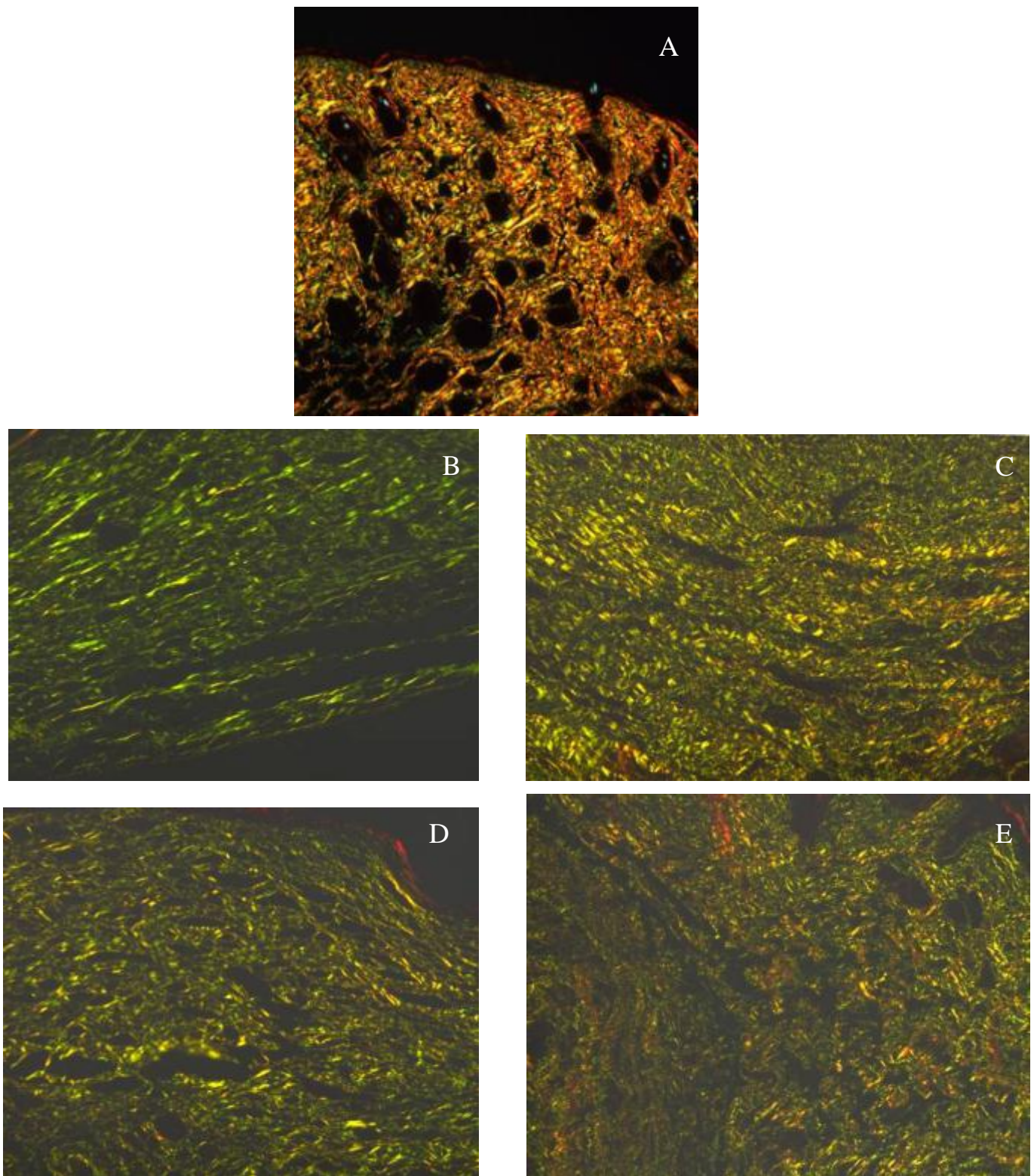


Figure 22 : Photographies de microscopie optique (x200) avec lumière polarisée après coloration au rouge Sirius des cicatrices d'un témoin positif (souris saine) (A), d'une plaie non traitée (B), d'une plaie traitée avec Cytocare (C), avec la SVF (D) et avec les ASC (E)

### 2.2.3. Tolérance

Aucun effet secondaire n'a été rapporté chez les souris nudes, quel que soit le traitement qui leur a été administré. Leur mode de vie n'a pas été modifié, elles ont continué à se nourrir normalement et aucune perte de poids n'a été observée.

Aucune infection secondaire à la réalisation de la plaie n'a été identifiée. Seule une phase d'exsudation normale a été observée pour chaque souris plus ou moins tardivement au cours de l'étude.

### 2.2.4. Efficacité des cellules souches sur la cicatrisation

De nombreuses contraintes ont été rencontrées lors de l'analyse des surfaces cicatricielles. En effet, l'anneau qui avait pour but d'éviter la rétraction de la plaie, très forte chez les animaux, a été perdu avant cicatrisation complète chez 31 animaux sur 42, partiellement ou totalement, entraînant une diminution de la taille de la plaie indépendante de la cicatrisation elle-même et biaisant le résultat. De plus, à partir du dixième jour, le pansement s'est opacifié avec les exsudats des plaies rendant difficile le relevé de la plaie résiduelle.

# DISCUSSION

---

La thérapie cellulaire représente une nouvelle approche du traitement des plaies chroniques, dans les situations relativement fréquentes d'impasse thérapeutique. Au cours des dix dernières années, le concept d'une « angiogénèse thérapeutique » pour résoudre les problèmes comme l'ischémie ou pour accélérer la cicatrisation a émergé et est considéré comme une thérapie prometteuse [142].

Les cellules souches du tissu adipeux (ASC pour "Adipose Stem Cells"), largement utilisées aujourd'hui dans le domaine de la recherche et de la médecine régénérative, sont reconnues capables d'influencer le processus de cicatrisation principalement par des mécanismes paracrines et également par une possible différenciation, par exemple, en cellules endothéliales, kératinocytes et fibroblastes [86, 101]. Elles favorisent ainsi la réépithélialisation et l'angiogénèse et accélèrent la cicatrisation. Dans ce contexte, les ASC auraient un intérêt tout particulier pour le traitement des plaies chroniques, qui sont le siège d'un déficit de la vascularisation faisant le lit d'un processus nécrotique chronique.

Le but de ce travail expérimental était, d'une part, de montrer la capacité d'amélioration de la perfusion sanguine du tissu cicatriciel des ASC et préciser leur mécanisme d'action, cet effet étant le critère d'évaluation principal choisi dans notre étude. D'autre part, notre travail nous a permis de valider et sélectionner les tests fonctionnels et contrôles immunohistologiques permettant d'évaluer l'efficacité thérapeutique des ASC en utilisant le modèle expérimental murin mis au point dans une précédente étude (C.Lequeux, 2013 article en préparation).

Dans ce modèle de cicatrisation chez la souris nude, nos résultats montrent que l'injection locale d'ASC humaines augmente significativement la perfusion par rapport à l'excipient seul (acide hyaluronique). Plus spécifiquement, nos tests fonctionnels montrent que les ASC augmentent significativement ( $p < 0.05$ ) la vasodilatation induite par l'acétylcholine par rapport à l'acide hyaluronique (72% *versus* 37% respectivement), ce qui indique une fonctionnalité vasculaire améliorée. La vasodilatation induite par stimulation au SNP, mesurant la fonction musculaire lisse, est identique dans ces deux conditions. On peut donc conclure que l'effet des ASC est lié à une amélioration des fonctions endothéliales et non musculaires. Par ailleurs, cet effet n'est retrouvé qu'avec les ASC cultivées et non avec la SVF, suggérant que les cellules souches mésenchymateuses sont spécifiquement impliquées dans ce mécanisme d'action. En effet, la proportion de cellules exprimant le marqueur de cellules souches CD90 est de 99% dans la suspension d'ASC contre 27% dans la SVF.

Le processus de culture permet bien l'enrichissement en ASC comme démontré dans les contrôles mis au point depuis, et constitue donc une étape indispensable à l'utilisation des ASC dans cette indication thérapeutique.



Le marquage alpha-SMA réalisé pour déterminer si l'amélioration de la perfusion cutanée était liée au nombre de vaisseaux nouvellement formés n'a pas permis pas de mettre en évidence de différences significatives du nombre de vaisseaux marqués entre les différents traitements à J28. Toutefois, ce test s'est avéré difficile à interpréter car ce marqueur, exprimé par les péricytes, ne met pas en évidence les néovaisseaux qui ne possèdent pas encore de péricytes. D'autre part, exprimé aussi par les myofibroblastes, ce test pourrait induire des résultats faussement élevés. Nous recommandons plutôt le CD31 comme marqueur spécifique des cellules endothéliales d'origine humaine pour contrôler la différenciation directe des ASC en cellules endothéliales. Toutefois, il faut noter que le marquage CD31 renseigne sur la densité des vaisseaux et non sur leur fonctionnalité.

Dans les plaies traitées par les ASC, l'augmentation de la réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine laisse supposer que les néovaisseaux ont un endothélium plus sensible, contenant un plus grand nombre de récepteurs muscariniques. Nous pouvons suggérer que les ASC se sont différenciées *in situ* en des cellules endothéliales plus fonctionnelles contenant plus de récepteurs muscariniques. La réponse vasodilatatrice suite à l'apport d'Ach par iontophorèse est alors d'autant plus importante si le nombre de récepteur est plus élevé. Dans un contexte lésionnel et inflammatoire, nous pouvons supposer que les récepteurs muscariniques endothéliaux sont stimulés par l'Ach non neuronale de la peau, qui est produite par les kératinocytes, les cellules inflammatoires et les cellules endothéliales elles-mêmes. Le système cholinergique non neuronal de la peau est impliqué dans d'importantes fonctions telles que l'angiogénèse [145] et il a été démontré que les récepteurs muscariniques (en particulier le sous-type M3) étaient particulièrement impliqués dans la néovascularisation via la production de VEGF [143, 144]. Ainsi, les récepteurs muscariniques, stimulés par l'Ach non neuronale de la peau, seraient plus abondamment exprimés par les cellules endothéliales des vaisseaux nouvellement formés et participeraient ainsi à l'angiogénèse. Cette hypothèse serait confirmée par une densité vasculaire plus forte lors de la formation du tissu de granulation (vérifiée par un marquage des cellules endothéliales par le CD31 comme précédemment évoqué), et par un marquage des récepteurs muscariniques de type M3 (Ac anti-M3).

Une autre hypothèse serait que les plaies traitées avec les ASC sont moins sujettes au stress oxydant du fait de l'effet anti-oxydant des ASC [146]. Rappelons que l'effet vasodilatateur de l'Ach est lié à la sécrétion de monoxyde d'azote (NO) par les cellules endothéliales suivi de sa fixation sur les cellules musculaires lisses. Le NO peut être dégradé par les espèces oxygénées réactives (ROS) en péroxynitrite avant d'atteindre la cellule musculaire lisse. L'effet anti-oxydant des ASC permettrait d'éviter la dégradation du NO, celui-ci pouvant ainsi diffuser librement dans les cellules musculaires lisses et exercer son effet vasodilatateur.

Il faut noter que le complexe sodium nitroprussiate (SNP) (donneur de NO) libère le NO seulement après qu'il se soit fixé sur la cellule musculaire lisse, le protégeant ainsi de l'oxydation et donc de sa dégradation, ce qui expliquerait pourquoi la réponse vasodilatatrice induite par le SNP est identique entre les différentes conditions.

Les résultats du test de compression/reperfusion (utilisé par l'équipe de Fromy et al [147]), confirment l'effet des ASC sur la perfusion. En effet, malgré le faible échantillonnage empêchant la réalisation de tests statistiques, nous avons démontré une tendance positive de l'effet des ASC sur la capacité de reperfusion des vaisseaux. En effet, le groupe traité avec les ASC est celui qui donne la meilleure réponse post-compression (73%) et dont l'effet est toujours présent après 24h (30%). Par contre, cet effet n'est pas retrouvé dans les groupes acide hyaluronique et SVF où la perfusion est même réduite par rapport au niveau de base (-55% et -30% respectivement 24h après). Dans l'étude réalisant ce test, il a été démontré que des lésions post-compression apparaissent sur la peau saine chez environ 60% des souris [147]. Notre échantillonnage était trop faible pour mettre en évidence des différences significatives sur le nombre de lésions post-compression observées, mais dans les études futures, ce critère peut être intéressant à affiner pour éventuellement démontrer une diminution de la récurrence de la plaie après administration d'ASC. Cependant, nous recommandons de prévoir des souris uniquement pour ce test, car la compression peut altérer l'épithélium encore fragile.

Ces résultats préliminaires sont donc encourageants et ce modèle de compression/reperfusion représente un critère d'évaluation pertinent puisqu'il mime les conditions pathologiques (cycle ischémie-reperfusion) des plaies chroniques.

Concernant la qualité du tissu cicatriciel, la coloration au rouge Sirius sur les coupes histologiques met en évidence la présence de fibres de collagène matures dans le groupe traité avec les ASC alors qu'elles sont absentes en cicatrisation spontanée ou après injection de la SVF, et rares avec celle de l'acide hyaluronique. Ces résultats reflètent une accélération du processus de cicatrisation des zones traitées avec les ASC.

La mesure de l'épaisseur du derme, effectuée sur les coupes histologiques après coloration HPS, montre que l'injection d'ASC tend à l'augmenter comparativement aux autres traitements et au témoin non traité. Cette observation est en accord avec les résultats d'une étude réalisée dans notre laboratoire en 2012 par Lequeux et al. [148], mettant en évidence une augmentation significative de l'épaisseur du derme chez le porc, après traitement d'une plaie traitée par des ASC implantées sur une matrice de collagène. Le faible échantillonnage empêche la réalisation de tests statistiques.

Toutefois, ces résultats préliminaires suggèrent que les ASC sont capables de synthétiser directement de la matrice extracellulaire, ou bien après leur différenciation en fibroblastes, ou encore après le recrutement de ces derniers par stimulation paracrine [149].

Nous suggérons que l'absence d'effet de la fraction stromale vasculaire adipeux (SVF) sur la perfusion ou sur la qualité du tissu cicatriciel est due à la faible densité d'ASC qu'elle contient par rapport à la suspension d'ASC pure.

Le seul critère d'efficacité des traitements cicatrisant reconnu par la FDA est la cicatrisation complète de la plaie, que nous avons obtenue, mais que nous n'avons pu prendre en compte comme critère d'efficacité. En effet, lors du suivi de la cicatrisation, le détachement partiel ou total de l'anneau sur 31 animaux sur 42, donnant ainsi une rétraction variable, invalide les résultats du temps de cicatrisation et de la cinétique de fermeture des plaies. Dans l'étude précédente réalisée au LSC, celui-ci était resté attaché. La suture de l'anneau est donc cruciale et opérateur-dépendant et une attention particulière devra être portée dans la prochaine étude. Nous recommandons de réaliser la plaie plus haute (entre les omoplates de la souris), de fixer l'anneau par surget intradermique continu autour de la plaie au lieu de points séparés, et enfin de changer le pansement, ce qui permettra le nettoyage de la plaie de ses exsudats pour rendre la lecture quotidienne plus facile. Ainsi, le contrôle d'une cicatrice aux contours ronds sera la preuve que l'anneau ne s'est pas détaché.

Au final, nos résultats précliniques *in vivo* démontrent un effet de stimulation des fonctions endothéliales exercé par l'administration d'ASC dans un modèle de cicatrisation. Pour établir plus précisément le mécanisme d'action de cet effet, le LSC cherche maintenant à mettre en évidence une activité paracrine. Pour cela, nous avons commencé à rechercher des facteurs sécrétés par les ASC (VEGF humain, CD31 humain, facteur Willebrand) par RT-PCR. Des essais préliminaires nous amènent à faire des recommandations : par exemple, concernant la biopsie de peau après traitement. Il faut prévoir de séparer la partie cicatrisée de la peau saine, celle-ci devant être prélevée à distance de la cicatrice pour éviter le mélange des ARN et prévenir un biais à l'interprétation des résultats dû à la présence d'une réaction inflammatoire au pourtour de la plaie. De plus, l'ARNm étant sensible aux écarts de température, il est important d'établir un procédé de congélation strict des biopsies pour s'assurer de leur intégrité. Enfin, ces prélèvements ne doivent pas être prélevés sur les souris soumises au test de compression car la qualité de la cicatrice en est altérée et peut biaiser les résultats.

Dans cette étude, nous ne pouvons prouver que le mécanisme d'action des ASC passe par leur différenciation. Par la suite, nous proposons de marquer les ASC avec la GFP (*Green Fluorescent Protein*), avant leur administration à l'animal, cette protéine étant communément utilisée pour suivre la biodistribution des cellules [122]. Le suivi macroscopique de la fluorescence permettrait de localiser les cellules *in situ*.

Enfin, un autre mécanisme d'action des ASC a été suggéré : la capacité de fusion des ASC avec les cellules hôtes [135]. En effet, comme nous l'avons précédemment évoqué, les ASC sont capables d'évènements fusionnels partiels via des nanotubules établissant un contact avec les cellules et transférant des mitochondries, reprogrammant ainsi des cellules somatiques cardiaques vers un stade progéniteur. En pré-conditionnant les ASC avec les cellules d'intérêt, ici des cellules endothéliales ou des fibroblastes sénescents, nous pourrions déjà rechercher leurs interactions *in vitro* et observer les nanotubules par immunofluorescence (marquage avec de la F-actine accompagné ou non de tubuline, principaux composants des nanotubules) ou bien par microscopie électronique. De plus, nous pourrions envisager d'injecter cette coculture *in vivo*, ce qui permettrait d'améliorer le potentiel endothélial ou fibroblastique des ASC.

# CONCLUSION

---

THESE SOUTENUE PAR : Mlle ARDISSON Oriane

Les résultats de notre étude expérimentale, réalisée chez des souris *nude*, démontrent l'efficacité des cellules souches du tissu adipeux cultivées (ASC) dans la cicatrisation cutanée puisque, d'une part, par rapport à leur véhicule seul (Cytocare® : acide hyaluronique), leur injection locale au sein de leur véhicule améliore :

- La perfusion sanguine avec la meilleure réponse vasodilatatrice suite à l'administration d'un agent vasodilatateur (acétylcholine). Cet effet est directement lié à une meilleure fonctionnalité des cellules endothéliales des néovaisseaux. Ce premier résultat vient confirmer celui déjà obtenu suite à la réalisation d'un test Doppler effectué dans des conditions expérimentales similaires lors d'une précédente étude menée au Laboratoire des Substituts Cutanés.
- La capacité de reperfusion des néovaisseaux suite à une épreuve de compression, bien que ce dernier effet soit à confirmer sur un plus grand nombre d'animaux.

D'autre part, nous avons démontré que les ASC favorisaient l'augmentation de l'épaisseur du derme des tissus cicatriciels, dont les fibres de collagènes le constituant apparaissent plus matures, comparativement aux groupes non traités (contrôle de cicatrisation spontanée) ou traités avec l'acide hyaluronique seul ou la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux (SVF).

Ces résultats suggèrent l'intérêt particulier des ASC par rapport celui à la SVF puisqu'elles sont les seules à produire ces effets bénéfiques. Leur utilisation semble ainsi prometteuse dans le traitement des plaies et la prévention de leur récurrence, dont le taux de survenue est important dans les plaies chroniques.

Il faut noter que ce modèle expérimental est plus représentatif des plaies aiguës que chroniques. Dans une prochaine étude, il serait intéressant d'utiliser un modèle qui mime les conditions physiologiques de ces dernières, tel que les modèles de souris diabétiques ou drépanocytaires.

Ce travail nous a également permis de sélectionner les contrôles les plus pertinents à réaliser lors d'une prochaine étude préclinique randomisée :

- La comparaison du flux sanguin cutané des cicatrices par laser Doppler par rapport à une zone de peau saine.
- La mesure du flux sanguin par laser doppler, couplée au principe de la iontophorèse pour évaluer la réponse vasodilatatrice suite à l'administration d'agents vasodilatateurs.

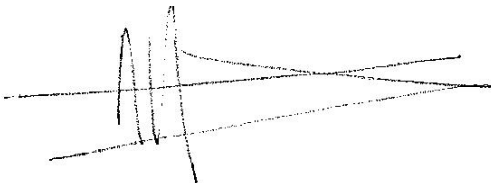
- La mesure de la capacité de reperfusion des vaisseaux suite à une épreuve d'ischémie provoquée par compression, avec un suivi post-compression pour relever d'éventuelles lésions à la levée de la compression et confirmer un effet des ASC sur la prévention d'une récurrence des plaies.
- L'analyse histologique avec coloration au rouge Sirius pour évaluer de manière qualitative l'état de maturation des fibres de collagène, qui prédit la cinétique de cicatrisation des plaies. L'analyse pourrait être complétée à l'aide d'un anticorps anti-collagène de type I et un autre de type III.
- L'évaluation de l'épaisseur du derme par coloration HPS, pour étudier la capacité des ASC à générer une nouvelle matrice extracellulaire.
- Le marquage spécifique des néovaisseaux sanguins grâce au marqueur CD31, pour étudier la capacité angiogénique des ASC. Le marquage des cellules endothéliales humaines (CD31 humain) permettrait de conclure à une éventuelle différenciation *in vivo* des ASC.

Enfin, nous pourrions envisager de réaliser ce type d'étude chez le plus gros animal tel que le porc, afin de se rapprocher au plus proche de la physiologie cutanée de l'Homme. Des données sur le mécanisme d'action des ASC sont encore à investiguer avant d'en envisager une possible application clinique dans le domaine de la cicatrisation.

**Le Président de la thèse,**

Nom : *Bolzinger*

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le **06 MAI 2014**

Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,



**Professeure C. VINCIGUERRA**

# BIBLIOGRAPHIE

---



- [1] Jiang D, Qi Y, Walker NG, Walker NG, Sindrilaru A, Hainzl A, Wlaschek M et al. The effect of Adipose tissue derived MSCs delivered by a chemically defined carrier on full thickness cutaneous wound healing. *Biomaterials*. 2013;2501-2515.
- [2] Koenen P, Spanholtz TA, Maegele M, Stürmer E, Brockam T, Neugebauer E et al. Acute and chronic wound fluids inversely influence adipose-derived stem cell function: molecular insights into impaired wound healing. *Int Wound J*. 2013;1742-4801.
- [3] Meaume S, Truchetet F, Cambazard F, Loka C, Debures C, Dala S et al. Pansement TLC-NOSF (Nano-OligoSaccharide Factor) dans la prise en charge locale des ulcères de jambe veineux : résultats d'un essai prospectif contrôlé, randomisé mené en double aveugle. *Wound Repair Reg*. 2012;20(4):500-51.
- [4] Eaglstein WH, Kirsner RS, Robson MC. Food and drug administration drug approval end points for chronic cutaneous ulcer studies. *Wound Rep Reg*. 2012;20:793-796.
- [5] Jurk S, Krieg T, Eming S. Mécanisme moléculaire de la cicatrisation. *Ann Dermatol Venereol*. 2003;130:574-80.
- [6] Busson E, Thepenier C, Bolotte F et al. Mesenchymal Stem Cells. In : *Regenerative medicine and cell therapy*. Nancy : J.-F. Stoltz. 2012. p36-50.
- [7] Sumi M, Sata M, Toya N, Yanaga K, Ohki T, Nagai R. Transplantation of adipose stromal cells, but not mature adipocytes, augments ischemia-induced angiogenesis. *Life Sciences*. 2007;80:559-565.
- [8] Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109:1292-1298.
- [9] Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109:656-663.
- [10] Structure de la peau. *Ann Dermatol Venereol*. 2005; 132:8S5-48.
- [11] Dubus P, Vergier B. Histologie cutanée. *Encycl Méd Chir. Cosmétologie et dermatologie esthétique*. 2000;50-010-A-10. 9p.
- [12] Gerbault O. Cicatrisation cutanée. *Encycl Méd Chir. Techniques chirurgicales – Chirurgie plastique reconstructrice et esthétique*. 1999;45-010. 19p.
- [13] CNRS. Les constituants de la peau : épiderme, derme et hypoderme.  
<http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/peau/> (consulté le 18 octobre 2013)
- [14] Dréno B. Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes. *Ann Dermatol*. 2009; 136(6):S247-S251.
- [15] Le Bitoux MA, Haftek M. Physiologie cutanée : kératinisation épidermique. *Encycl Med Chir*. 2008;27-070-A-20.

- [16] Prost-squaicioni C, Fraitag S, Heller M, Boehm N. Histologie fonctionnelle du derme. *Ann Dermatol Venerol*. 2008;135:1S5-1S20.
- [17] Jaegera C, Cherinb P. Matrice extracellulaire, physiologie et vieillissement vasculaire. *Méd Long*. 2012;4:41-53.
- [18] Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg*. 1998;176(2A):26S–38S.
- [19] Gall Y. Acide hyaluronique : structure, métabolisme et implication dans la cicatrisation. *Ann Dermatol*. 2010;138(1):S30-S39.
- [20] Cousin L, Planat-Benard V, Laharrague P, Casteilla B. Adipose-derived stromal cells : their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells*. 2011;3(4):25-33.
- [21] Casteilla L, Charrière G, Laharrague P, Cousin B, Planat-Benard V, Péricaud L, et al. Adipose tissue, plastic and reconstructive surgery : come back to sources. *Ann Chir Plast Esth*. 2004;409–418.
- [22] Pradere JP. Etude de la régulation et du rôle de l'autotaxine et de l'acide lysophosphatidique dans le tissu adipeux et le rein. Th Doctorat, Toulouse; 2007.
- [23] Volat F. Rôle des aldoses réductases dans la physiologie du tissu adipeux blanc : modèles génétiques murins perte et gain de fonction. Th doctorat, Clermond Ferrand; 2011.
- [24] Ellero S. Conséquences moléculaires de l'exposition du tissu adipeux humain à des xénobiotiques environnementaux. Th Doctorat, Paris; 2010.
- [25] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1995;374(6521):479.
- [26] Messinis, IE, Milingos, SD. Leptin in human reproduction. *Hum Reprod*. 1999;5:52–63.
- [27] Cao R, Brakenhielm E, Wahlestedt C, Thyberg J, Cao Y. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(11):6390–6395.
- [28] Chandran M, Phillips SA., Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes care*. 2003; 26(8):2442-2450.
- [29] Kershaw EE, Flier JS. The adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endoc Metabolism*. 2004; 89(6): 2548–2556.
- [30] Anna A, Smith AH, Blit PH, Shehab MAI, Gauglitz GG, Jeschke MG. Stem Cell Therapy : a new treatment for burns? *Pharm*. 2011;4(10):1355-1380.
- [31] Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6:230–247.
- [32] Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9:641–650.

- [33] Calloni R, Cordero EA, Henriques JA, Bonatto D. Reviewing and Updating the Major Molecular Markers for Stem Cells. *Stem cells and development*. 2013;22(9):1455-76.
- [34] Smadjaa D, Silvestre JS, Lévy BI. Genic and cellular therapy for peripheral arterial diseases. *Transfus Clin Biol*. 2013;20(2):211–220.
- [35] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001; 7(2): 211–228.
- [36] Locke M, Windsor J, Dunbar PR. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J Surg*. 2009; 79: 235–244.
- [37] Sengenès C, Maumus M, Jørgensen C et al. Adipose Stem Cells identification, properties and interest for clinical applications. In : *Regenerative medicine and cell therapy*. Nancy : J.-F. Stoltz. 2012. p36-50.
- [38] Zuk P. Adipose-derived Stem Cells in Tissue Regeneration : A Review. *Stem Cells*. 2013;35p.
- [39] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Int Soc Cell Therapy*. 2006;8:315-317.
- [40] Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hadas) cells. *Stem Cells*. 2005;23:412–423.
- [41] Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A et al. Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers. *Stem cells*. 2006;24:376–85.
- [42] Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* 2006;208:64–76.
- [43] Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise Review: Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine. *Stem cells*. 2012;30:804–810.
- [44] Zuk PA. The Adipose-derived Stem Cell : looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell*. 2010;21:1783–1787.
- [45] Schaffler A, Buchler C. Concise review : adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem cells*. 2007;25(4):818–827.
- [46] Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol*. 2007;212:702–709.
- [47] Kapur SK, Katz AJ. Review of the adipose derived stem cell secretome. *Bioch*. 2013. 7p.

- [48] Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing : an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*. 2004;9:283-289.
- [49] Greaves NS, Ashcroft KJ, Baguneid M, Bayat A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J Dermatol Sci*. 2013.
- [50] Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and Healing Dynamics of Chronic Cutaneous Wounds *Am J Surg*. 1998;176:26S–38S.
- [51] Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophages express TGF- $\alpha$  and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science*. 1988;241:708-12.
- [52] Singer AJ, Clark RF. Cutaneous wound healing. *New J Med*. 1999;341(10):738-746.
- [53] Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int*. 1992;557(41):557–559.
- [54] Harding KG, Morris HL, Patel GK. Healing chronic wounds. *British Med J*. 2002;324:160-3.
- [55] Senet P. Physiologie de la cicatrisation cutanée. *Encycl Med Chir. Dermatologie*. 2007;98-040-A-10, 9p.
- [56] Yoo SY, Kwon SM. angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediat Inflamm*. 2013;11p.
- [57] Labied T. Rôles des protéases et de leurs inhibiteurs dans la placentation et la vascularisation endométriale. Th Doctorat, Liège ; 2008.
- [58] Grondahl-Hansen J, Lund LR, Ralfkiaer F, Ottevanger V, Dano K. Urokinase and tissue-type plasminogen activator in keratinocytes during wound re-epithelialization in vivo. *Invest Dermatol*. 1988;90:790-795.
- [59] Rochet JM, Wassermann D, Carsin H, Desmoulière A, Aboiron H, Birraux D, et al. Rééducation et réadaptation de l'adulte brûlé. *Encycl Med Chir. Kinésithérapie, Medecine physique, réadaptation*. 1998;26-280C-10, 27p.
- [60] Fonder MA, Lazarus GS, Cowan DA, Aronson-Cook B, Kohli AR, Mamelak AJ. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of non healing wounds and wound care dressings. *J Amer Acad Dermatol*. 2008;58:185-206.
- [61] Chaput B, Courtade-Saïdi M, Bonnacaze G, Eburderly H, Crouzet C, Chavoïn JP et al. Anomalies de la cicatrisation. *Encycl Med Chir. Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique*. 2012;7(2):1-12.
- [62] Mustoe T. Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *Am J Surg*. 2004;187:65S–70S.
- [63] Falanga V. The chronic wound : impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation. *Blood Cell Mol Dis*. 2004;32:88-94.
- [64] M. Kalani, K. Brismar, B. Fagrell, Ostergren J, Jörneskog G. Transcutaneous oxygen tension and toe blood pressure as predictors for outcome of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*. 1999;22:147-151.

- [65] Sheikh AY, Gibson JJ, Rollins MD, Hopf HW, Hussain Z, Hunt TK. Effect of hyperoxia on vascular endothelial growth factor levels in a wound model. *Arch Surg*. 2000;135:1293-1297.
- [66] Falanga V, Zhou L, Yufit T. Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF-beta1. *J Cell Physiol*. 2002;191:42–50.
- [67] Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing, more than a nutrient. *World J Surg*. 2004;28:294-300.
- [68] Johnstone CC, Farley A, Hendry C. The physiological basics of wound healing. *Nurs Standard*. 2005;19(43):59-65.
- [69] Lazareth I. Ulcères de jambe : facteurs prédictifs de non-cicatrisation. *J Mal Vascul*. 2010;35(2):p96.
- [70] Hamel M, Dumont C, Rhainds M. Unité d'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé (UETMIS). L'utilisation de la thérapie par pression négative pour le traitement des plaies complexes - Rapport d'évaluation. FRCPC, Québec, 2010 XVI-133 p.
- [71] Etufugh CN, Phillips TJ. Venous ulcers. *Clin Dermatol*. 2007;25:121–130.
- [72] Bonnetblanc JM. Ulcère de jambe. *Ann dermatol vener*. 2012;139:127-134.
- [73] Higley HR, Ksander GA, Gerhardt CO, Falanga V. Extravasation of macromolecules and possible trapping of transforming growth factor- $\beta$  in venous ulceration. *Brit J Dermatol*. 1995;132(1):79-85.
- [74] Trengove NJ, Stacey MC, MacAuley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, et al. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Rep Reg*. 1999;7:442-452.
- [75] Drinkwater SL, Smith A, Sawyer BM, Burnand KG. Effect of venous ulcer exudates on angiogenesis in vitro. *Brit J Surg*. 2002;(89):709–713.
- [76] Bucalo B, Eaglstein W, Falanga V. Inhibition of cell proliferation by chronic wound fluid. *Wound Rep Reg* 1993;1:181-6.
- [77] Mendez MV, Raffetto JD, Phillips T, Menzoian JO, Park HY. The proliferative capacity of neonatal skin fibroblasts is reduced after exposure to venous ulcer wound fluid: A potential mechanism for senescence in venous ulcers. *J Vasc Surg*. 1999;30(4):734-43.
- [78] Hasan A, Murata H, Falabella A, Ochoa S, Zhou L, Badiavas E, et al. Dermal fibroblasts from venous ulcers are unresponsive to the action of transforming growth factor-beta 1. *J Dermatol Sci*. 1997;16(1):59-66.
- [79] Harding KG, Moore K, Phillips TJ. Wound chronicity and fibroblast senescence – implications for treatment. *Int wound J*. 2005;2(4):364-368.
- [80] Akita S, Yoshimoto H, Akino K. Early experiences with stem cells in treating chronic wounds. *Clin Plast Surg*. 2012;39(3):281-292.

- [81] Phillips TJ, Manzoor J, Rojas A, Isaacs C, Carson P, Sabolinski M, et al. The longevity of a bilayered skin substitute after application to venous ulcers. *Arch. Dermatol.* 2002;138:1079-1081.
- [82] Jones I, Currie L, Martin R. A guide to biological skin substitutes. *Br J Plast Surg.* 2002;55:185-93.
- [83] Mojallal A, Lequeux C, Shipkov C, Rifkin L, Rohrich R, Duclos A et al. Stem cells, mature adipocytes, and extracellular scaffold: what does each contribute to fat graft survival? *Aesthetic Plast Surg.* 2011;35(6):1061-72.
- [84] Judith R, Nithya M, Rose C, Mandal AB. Biopolymer gel matrix as acellular scaffold for enhanced dermal tissue regeneration. *Biologicals.* 2012;40(4):231-9.
- [85] Sanchez-Gonzalez DJ, Mendez-Bolaina E, Trejo-Bahena NI. Platelet-Rich Plasma peptides: key for regeneration. *Int J Peptides.* 2012;532519:10p.
- [86] Huang SP, Huang CH, Shyu JF, Lee HS, Chen SG, Chan YHJ et al. Promotion of wound healing using adipose-derived stem cells in radiation ulcer of a rat model. *J Biomed Sci.* 2013;20:51.
- [87] Hong SJ, Jia SX, Xie P, Xu W, Leung KP, Mustoe TA et al. Topically delivered adipose derived stem cells show an activated-fibroblast phenotype and enhance granulation tissue formation in skin wounds. *Plos One.* 2013;8(1):e55640.
- [88] Hanson SE, Kleinbeck KR, Cantu D, Kim J, Bentz ML, Faucher LD, et al. Local delivery of allogeneic bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for cutaneous wound healing in a porcine model. *J Tissue Eng Regen Med.* 2013. 11p.
- [89] Lin YC, Grahovac T, Oh SJ, Leracia M, Rubin JP, Marraa KG. Evaluation of a multi-layer adipose-derived stem cell sheet in a full-thickness wound healing model. *Acta Biomaterialia.* 2013; 9: 5243-5250.
- [90] Yun IS, Jeon YR, Lee WJ, Lee JW, Rah DK, Tark KC et al. Effect of human adipose derived stem cells on scar formation and remodeling in a pig model : a pilot study. *Dermatol Surg.* 2012;1-11.
- [91] Forcheron F, Agay D, Scherthan H, Riccobono D, Herodin F, Meineke V et al. Autologous adipocyte derived stem cells favour healing in a minipig model of cutaneous radiation syndrome. *Plos One.* 2012;7(2):e31694.
- [92] Ho Lee S, Ho Lee J, Hyun Cho K. Effects of human adipose derived stem cells on cutaneous wound healing in nude mice. *Ann Dermatol.* 2011;23(2):150-5.
- [93] Nie C, Yang D, Xu J, Si Z, Jin X, Zhang J. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. *Cell Transplant.* 2011;20:205-216.
- [94] Nambu M, Ishihara M, Kishimoto S, Yanagibayashi S, Yamamoto N, Azuma R et al. Stimulatory effect of autologous adipose tissue derived stromal cells in an atelocollagen matrix on wound healing in diabetic db/db mice. *Journ Tiss Eng.* 2011:158105.

- [95] Maharlooei MK, Bagheri M, Solhjoui Z, Jahromi BM, Akrami M, Rohani L, et al. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pr.* 2011;93(2):228–34.
- [96] Soo Lim J, Yoo G. Effects of adipose derived stromal cells and of their extract on wound healing in a mouse model. *J Korean Med Sci.* 2010. 25:746-51.
- [97] Amos PJ, Kapur SK, Stapor PC, Shang H, Bekiranov S, Khurgel M, et al. Human adipose derived stromal cells accelerate diabetic wound healing : impact of cell formulation and delivery. *Tiss Eng. Part A,* 2010. 16(5):1595-1606.
- [98] Hadad I, Johnstone BH, Brabham JG, Blanton MW, Rogers PI, Fellers C et al. Development of a porcine delayed wound-healing model and its use in testing a novel cell-based therapy. *Int J Radiation Oncology Biol Phys,* 2010. 78(3):888-896.
- [99] Ju X, Pan F, Bai S, Tian X, Tong H, Wang J et al. An experimental study on repairing full-thickness skin wound by human acellular amniotic membrane loaded with adipose-derived stem cells in rats. *Chinese J Reparative Reconstructive Surg.* 2010. 24(2):143-9.
- [100] Blanton MW, Hadad I, Johnstone BH, Johnstone BH, Mund JA, Rogers P et al. Adipose stromal cells and platelet-rich plasma therapies synergistically increase revascularization during wound healing. *Revasc and Wound Heal,* 2009.123(2S):56S-64S.
- [101] Altman AM, Yan Y, Matthias N, Bai X, Rios C, Mathur AB et al. IFATS collection: Human adipose-derived stem cells seeded on a silk fibroin-chitosan scaffold enhance wound repair in a murine soft tissue injury model. *Stem Cells.* 2009;27(1):250-258.
- [102] Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, Buard V, André M, Cousin B et al. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:503-10.
- [103] Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem* 2006;17:279–290.
- [104] Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation.* 2004;110:349-355.
- [105] Kim EK, Li G, Lee TJ, Hong JP. The effect of human adipose-derived stem cells on healing of ischemic wounds in a diabetic nude mouse model. *Plastic Reconstructive Surg.* 2011;128(2):387-394.
- [106] Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2542–2547.

- [107] Gao W, Qiao X, Ma S, Cui L. Adipose-derived stem cells accelerate neovascularization in ischaemic diabetic skin flap via expression of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Cell Mol. Med.* 2010; 15(12):2575-2585.
- [108] Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Hyakusoku H. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury : immunohistochemical and ultrastructural evaluation. *Plast Reconstr Surg.* 2009;124:804–15.
- [109] Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Corresponding author contact information et al. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;332:370–379.
- [110] Kondo K, Shintani S, Shibata R, Murakami H, Murakami R, Imaizumi M et al. Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:61–66.
- [111] Nauta A, Seidel C, Deveza L, Montoro D, Grova M, Ko SH, et al. Adipose-derived stromal cells overexpressing vascular endothelial growth factor accelerate mouse excisional wound healing. *Am Society Gene Cell Therapy.* 2012;21(2):445-55.
- [112] Rider DA, Dombrowski C, Sawyer AA. Autocrine Fibroblast Growth Factor 2 increases the multipotentiality of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells.* 2008;26:1598-1608.
- [113] Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Liang Z, Traktuev D, Cornetta K et al. Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. *Stem Cells.* 2007;25:3234-3243.
- [114] Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J. A population of multipotent cd34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res.* 2008;102:77-85.
- [115] Traktuev DO, Prater DN, Merfeld-Clauss S, Sanjeevaiah AR, Saadatzaheh MR, Murphy M et al. Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circ Res* 2009;104:1410-1420.
- [116] Natesan S, Zhang G, Baer DG, Walters TJ, Christy RJ, Suggs LJ. A bilayer construct controls adipose-derived stem cell differentiation into endothelial cells and pericytes without growth factor stimulation. *Tissue Engineering.* 2011;17(7–8):941–53.
- [117] Hong SJ, Traktuev DO, March KL. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(1):86-91.
- [118] Dulmovits BM, Herman IM. Microvascular remodeling and wound healing: A role for pericytes. *International J Biochemistry Cell Biology.* 2012;44:1800-1812.



- [119] Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Koultab N. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue eng.* 2007;13(6):1299-1312.
- [120] Wang J, Zhang S, Rabinovich B, Bidant L, Soghomonyan S, Alauddin MM et al. Human CD34+ cells in experimental myocardial infarction: long-term survival, sustained functional improvement, and mechanism of action. *Circ Res.* 2010;106:1904-1911.
- [121] Sorrell JM, Caplan AI. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. *Stem Cell Res Therapy.* 2010. 1(4):30.
- [122] Shin L, Peterson DA. Human mesenchymal stem cell grafts enhance normal and impaired wound healing by recruiting existing endogenous tissue stem/progenitor cells. *Stem Cells Trans Med.* 2013;2(1):33-42.
- [123] Lee SH, Jin SY, Song JS, KK Seo, Cho KH. Paracrine effects of adipose derived stem cells on keratinocytes and dermal fibroblasts. *Annals of Dermatology.* 2012;24(2):136–143.
- [124] Hu L, Zhao J, Liu J, Gong N, Chen L. Effects of adipose stem cell-conditioned medium on the migration of vascular endothelial cells, fibroblasts and keratinocytes. *Exp Ther Med.* 2013;5:701-706.
- [125] Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *Plos one.* 2008;3(4):e1886.
- [126] Meirelles LS, Fontes AM, Covas DT. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine et Growth Factor Reviews.* 2009;20:419–427.
- [127] Galindo LT, Filippo TR, Semedo P, Ariza CB, Moreira CM, Camara NOS et al. Mesenchymal stem cell therapy modulates the inflammatory response in experimental traumatic brain injury. *Neurol Res Int.* 2011;9p.
- [128] Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-Derived Stem Cells for regenerative medicine. *Circ res.* 2007;100:1249-1260.
- [129] Suga H, Eto H, Shigeura T, Inoue K, Aoi N, Kato H et al. IFATS series: FGF-2 induced HGF secretion by adipose-derived stromal cells inhibits post-injury fibrogenesis through a JNK-dependent mechanism. *Stem Cells.* 2008;7(1):238-49.
- [130] Thangarajah H, Vial IN, Chang E, El-Ftesi S, Januszyk M, Chang EI et al. IFATS collection: adipose stromal cells adopt a proangiogenic phenotype under the influence of hypoxia. *Stem Cells.* 2009;27:266–274.
- [131] Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, LeRoux MA. Concise Review : role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Trans Med.* 2012;1:142-149.







- [132] Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 2003;425:968-973.
- [133] Terada N, Hamazaki T, Oka M. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 2002;416:542-5.
- [134] Pomerantz J, Blau HM. Nuclear reprogramming: A key to stem cell function in regenerative medicine. *Nat Cell Biol*. 2004;6:810-816.
- [135] Acquistapace A, Bru T, Lesault PF, Figeac F, Coudert AE, Le Coz O, et al. Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer. *Stem cells*. 2011;29(5):812-824.
- [136] Gerdes HH, Bukoreshtliev NV, Barroso JFV. Tunneling nanotubes: A new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Letters* 2007;581:2194-2201.
- [137] Chinnery HR, Pearlman E, McMenemy PG. Cutting edge: Membrane nanotubes in vivo: a feature of MHC class II+ cells in the mouse cornea. *J Immunol*. 2008;180:5779-83.
- [138] Coleman WP, Hendry S L. Principles of Liposuction. 2006. *Semin Cutan Med Surg*;25:138-144.
- [139] Galiano RD, Michaels J, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Rep Reg*. 2004;12:485-92.
- [140] Turner J, Belch JJF, Khan F. Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser doppler imaging and iontophoresis. *Trends Cardiovasc Med*. 2008;18:109-116.
- [141] Wong VW, Sorkin M, Glotzbach J.P, Longaker MT, Gurtner GC. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotech*. 2011. 8p.
- [142] Salgado AJ, Reis RL, Sousa N, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res & Ther*. 2010;5(2),103-110.
- [143] De la Torre E, Davel L, Jasnis MA, Gotoh T, Sacerdote de Lustig E, Sales ME. Muscarinic receptors participation in angiogenic response induced by macrophages from mammary adenocarcinoma-bearing mice. *Breast Cancer Res*. 2005;7(3):345-352.
- [144] Rimmaudo LE, De la Torre E, de Lustig ES, Sales ME. Muscarinic receptors are involved in LMM3 tumor cells proliferation and angiogenesis. *Biochem Bioph Res Co*. 2005;334:1359–1364.
- [145] Kurzen H, Wessler I, Kirkpatrick CJ, Kawashima K, Grando SA. The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res*. 2007;39:125-135.
- [146] Kim WS, Park BS, Kim HK, Park JS, Kim KJ, Choi JS et al. Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: Protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress. *J Dermatol Sci*. 2008;49(2):133-42.







- [147] Fromy B, Lingueglia E, Sigaudou-Roussel D, Saumet JL, Lazdunski M. Asic3 is a neuronal mechanosensor for pressure-induced vasodilatation that protects against pressure ulcers. *Nature Med.* 2012;18(8):1205-1207.
- [148] Lequeux C, Oni G, Wong C, Damour O, Rohrich R, Mojallal A et al. Subcutaneous fat tissue engineering using autologous Adipose-Derived Stem Cells seeded onto a collagen scaffold. *Plast Reconstr Surg.* 2012;130(10):1208-1217.
- [149] Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, Kwak SJ et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2007;48:15–24.







# ANNEXES







---

# ANNEXE 1 : Photographies des lésions (test de compression)

|                                       |             | Avant compression   | T0 post-compression  | T24 post-compression   |
|---------------------------------------|-------------|---|--|--|
| Témoins<br>cicatrisation<br>spontanée | Souris<br>1 |   |   |   |
|                                       | Souris<br>2 |  |  |  |

|                       |             | Avant compression   | T0 post-compression  | T24 post-compression   |
|-----------------------|-------------|---|--|--|
| Acide<br>hyaluronique | Souris<br>3 |   |   |   |
|                       | Souris<br>4 |  |  |  |

|     |          | Avant compression  | T0 post-compression  | T24 post-compression   |
|-----|----------|--|--|--|
| SVF | Souris 5 |   |   |   |
|     | Souris 6 |  |  |  |

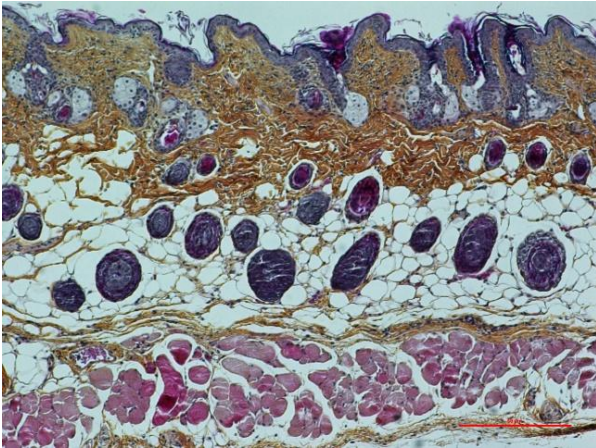
|     |             | Avant compression  | T0 post-compression  | T24 post-compression   |
|-----|-------------|--|--|--|
| ASC | Souris<br>7 |   |   |   |
|     | Souris<br>8 |  |  |  |



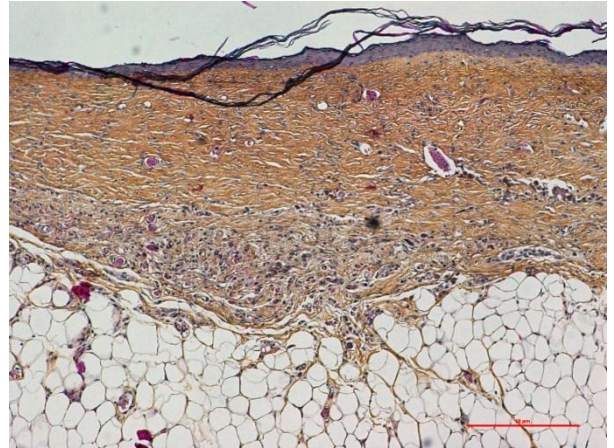
## **ANNEXE 2 :** **Coloration HPS pour mesure de l'épaisseur dermique**

### **Cytocare® (AH)**

---



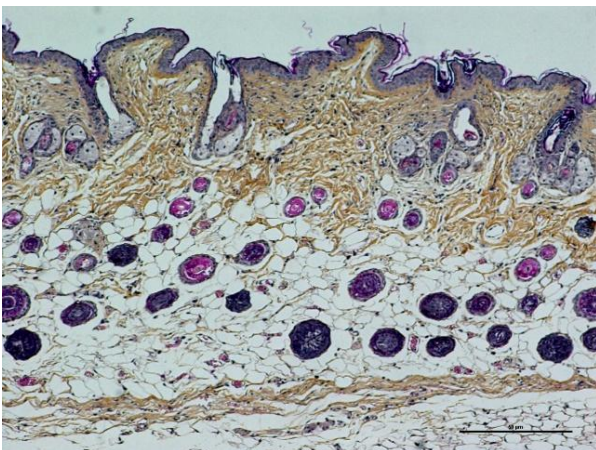
**Zone peau saine**



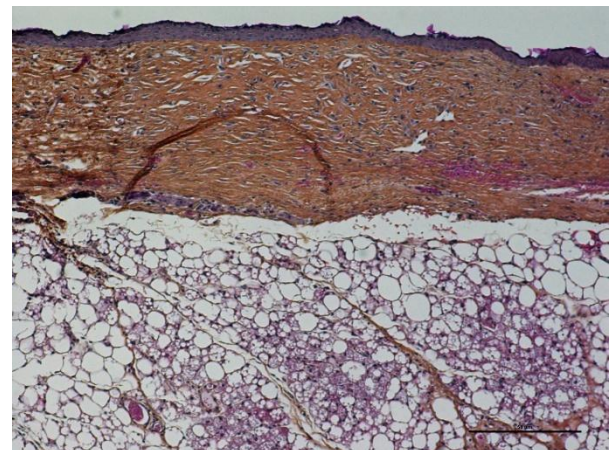
**Zone cicatrisée**

### **Cicatrisation spontanée**

---



**Zone peau saine**

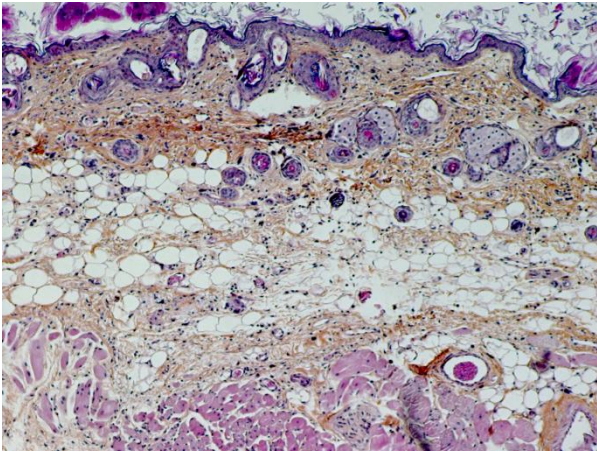


**Zone cicatrisée**

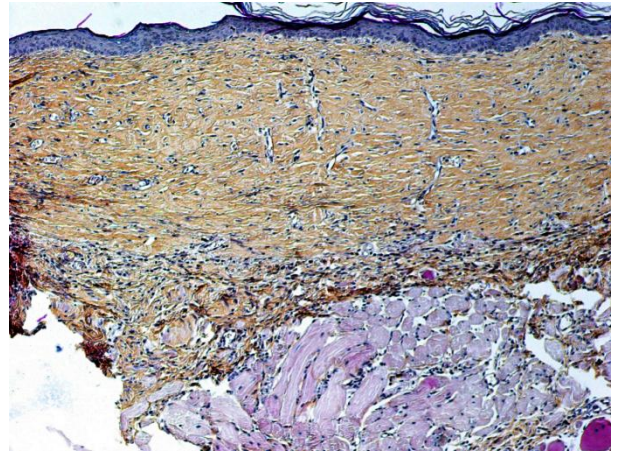


**ASC**

---



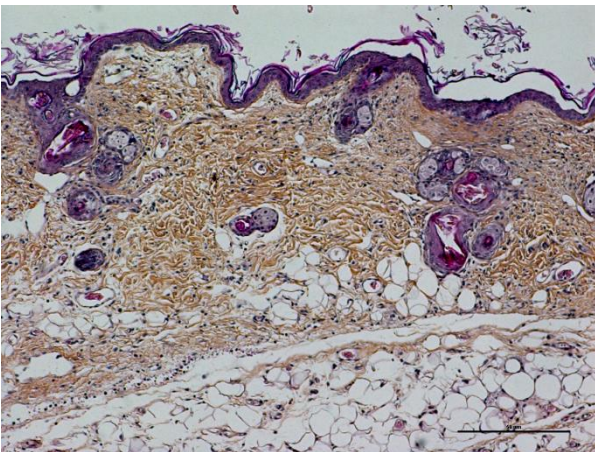
**Zone peau saine**



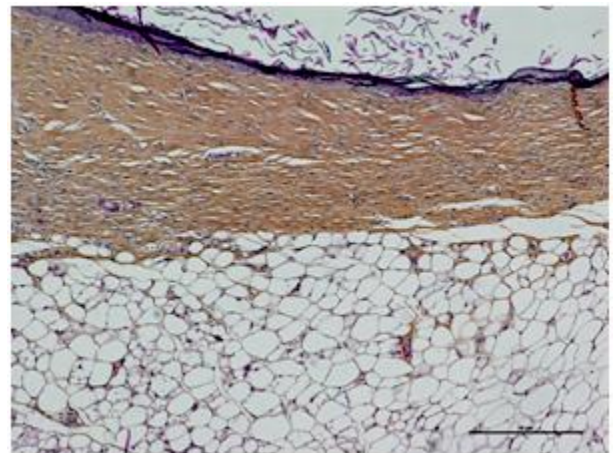
**Zone cicatrisée**

**SVF**

---



**Zone peau saine**



**Zone cicatrisée**

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

**ARDISSON Oriane**

**Intérêt des cellules souches du tissu adipeux sur la cicatrisation cutanée :**

**Étude expérimentale chez la souris *nude***

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2014, 101 p.

## RESUMÉ

Les cellules souches du tissu adipeux ou *Adipose Derived Stem Cells* (ASC), faciles d'accès et disponibles en grande quantité, sont une des plus populaires populations de cellules souches utilisées dans le domaine de la recherche et de la médecine régénérative.

L'objectif de ce travail expérimental est d'évaluer leur capacité à améliorer la perfusion du tissu cicatriciel dans un modèle de cicatrisation d'une plaie excisionnelle réalisée sur 42 souris *nude* réparties en plusieurs sous-groupes traités (ASC, SVF ou *Stromal Vascular Fraction*) et témoins (acide hyaluronique et sans traitement). La cicatrisation a été suivie jusqu'à fermeture complète de la plaie et des tests fonctionnels ainsi que des analyses immunohistologiques ont été réalisés.

Les résultats *in vivo* montrent l'efficacité des ASC sur la fonctionnalité vasculaire du tissu cicatriciel obtenu. En effet, la réponse vasodilatatrice du tissu cicatriciel est favorisée avec les ASC (72%) et la perfusion des vaisseaux est améliorée après une épreuve de compression (73%). Une amélioration de la qualité du derme est également observée avec les ASC puisque celui-ci apparaît plus épais et contient des fibres de collagènes matures, absentes dans le témoin de cicatrisation spontanée.

## MOTS CLES

Médecine régénérative  
Cellules souches  
Cicatrisation cutanée  
Tissu adipeux

## JURY

Mme BOLZINGER Marie-Alexandrine, Maître de Conférences

Mme DAMOUR Odile, Docteur en Pharmacie

Mme SIGAUO-ROUSSEL Dominique, Docteur en Sciences

Mme LEQUEUX Charlotte, Docteur en Pharmacie

M. MOJALLAL Ali, Docteur en Médecine

## DATE DE SOUTENANCE

2 juin 2014

## ADRESSE DE L'AUTEUR

49, Cours Vitton – 69006 Lyon