

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>

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

2015

THESE n°50

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 9 juin 2015

par

Mme CADE Sara

Née le 6 mars 1992

A Lyon 8^{ème}

**INFLUENCE DES CELLULES SOUCHES DU TISSU ADIPEUX SUR LE
VIEILLISSEMENT CUTANE : UTILISATION D'UN MODELE
TRIDIMENSIONNEL**

JURY

M. LAWTON Philippe, Professeur

Mme DAMOUR Odile, Docteur en Pharmacie

M. NATAF Serge, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

M. PAYS Laurent, Maître de Conférences

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 Directrice : 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 Directrice : Mme 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

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 Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU – PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU – HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Monsieur Damien SALMON (AHU)

- **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)
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

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

- **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-MONTEMBault (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU – PAST)
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU – PH)
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 Marie-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
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 Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU – PH)
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)
Madame Catherine RIOUFOL (MCU – PH – HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

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

- **PHYSIOLOGIE**

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

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Monsieur Olivier CATALA (Pr – PAST)
Madame Corinne FEUTRIER (MCU – PAST)
Madame Mélanie THUDEROZ (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 BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**

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

- **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 – HDR)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Hubert LINCET (MCU – HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)
- **BIOLOGIE CELLULAIRE**
Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU – HDR)
- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEMBault (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Valérie VOIRON (MCU – PAST)
- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**
Madame Emilie BLOND
Madame Florence RANCHON
- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**
Madame Sophie ASSANT 85^{ème} section
Monsieur Benoit BESTGEN 85^{ème} section
Madame Marine CROZE 86^{ème} section
Madame Mylène HONORAT MEYER 85^{ème} 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 **Philippe Lawton**

Merci d'avoir accepté sans hésiter d'assurer la présidence de ce jury.

A **Odile Damour**

Merci pour votre accueil au sein du Laboratoire des Substituts Cutanés, merci pour votre disponibilité, votre expertise et votre enthousiasme. J'ai appris beaucoup en travaillant au sein de vos équipes et je tiens vraiment à vous remercier de m'avoir offert la possibilité de participer à des projets si riches.

A **Serge Nataf**

Merci pour votre disponibilité, pour votre expertise, pour votre aide au cours de la rédaction de ce manuscrit, pour m'avoir fait découvrir la bio-informatique et pour m'avoir donné l'occasion de participer à un nouveau projet de recherche.

A **Laurent Pays**

Merci pour tout le temps que tu m'as accordé, pour ton expertise, pour m'avoir encadrée durant mon stage pour la partie bio-informatique et pour tous les conseils que tu m'as donnés.

A toute l'équipe de la Banque de Tissus et Cellules et de Lab Skin Creations

Merci à tous pour votre accueil, votre disponibilité, votre humilité, vos précieux conseils, votre aide tout au long de ces 9 mois.

En particulier,

A **Elodie**

Merci de m'avoir encadrée d'un point de vue technique, j'ai vraiment appris énormément grâce à toi.

Merci de m'avoir permis de participer à ton projet, bon courage pour la suite.

Merci pour ta disponibilité, ton calme, tes conseils, ta patience, ton expertise...

Je te souhaite le meilleur pour l'avenir.

A Virginie

Merci à ma co-externe pour ton soutien, nos longues discussions et notre travail en équipe. Bon courage pour la fin de ta thèse que j'ai hâte de lire. Je te souhaite aussi le meilleur pour l'avenir, ne t'inquiète pas KnacKi ça va bien se passer.

A mon entourage

A mes parents

Merci à tous les deux pour votre soutien tout au long de mes études mais aussi pour tout le reste. Merci d'être toujours présents, attentifs et disponibles. Merci pour votre amour, pour votre aide à tous les niveaux. Merci d'avoir tout fait pour que je réussisse, pour que je me sente bien. Bref, merci pour tout ce que vous avez fait et faites pour moi. Je tiens beaucoup à vous et je tiens aussi à être là pour vous.

A ma sœur

Merci pour ton soutien, ton aide, ton écoute... Notre complicité est très importante pour moi. Je tiens beaucoup à toi. Je te souhaite le meilleur pour ton avenir professionnel mais aussi personnel.

A tout le reste de ma famille

Merci de prendre ou de demander régulièrement de mes nouvelles et merci pour votre soutien.

A Ro'

Merci pour ton soutien, ton amour, ta patience, ton écoute, tes conseils... Tu fais énormément pour moi et je ne t'en remercierai jamais assez.

A Nathalie, Jean-Philippe et Valentin

Merci pour votre soutien, vos encouragements et l'intérêt que vous portez à ce que je fais.

A mes amis

Je ne vous cite pas tous mais vous vous reconnaitrez. Nous avons tous des parcours plus ou moins proches, nous nous voyons plus ou moins souvent (jamais assez) mais votre soutien et tous les moments que nous partageons m'apportent beaucoup et je vous en remercie.

Table des matières

Remerciements	9
Aux membres du jury	9
A toute l'équipe de la Banque de Tissus et Cellules et de Lab Skin Creations	9
A mon entourage	10
Liste des tableaux	13
Liste des figures	14
Liste des abréviations	15
1) Introduction générale.....	17
2) Partie bibliographique	19
2.1) La peau	19
2.1.1) Epiderme	19
2.1.2) Jonction Dermo-Epidermique (JDE).....	20
2.1.3) Derme	21
2.1.4) Hypoderme.....	22
2.1.5) Modèle des peaux reconstruites	22
2.2) Le vieillissement cutané	24
2.2.1) Facteurs du vieillissement.....	24
2.2.2) Conséquences du vieillissement.....	26
2.3) Les « Adipose-derived Stem Cells » (ASCs) ou cellules souches issues du tissu adipeux	27
2.4) Les ASCs et le vieillissement cutané	28
2.4.1) Impact des ASCs au niveau cutané.....	28
2.4.2) Mécanismes d'action	30
2.4.3) Applications cliniques potentielles	32
2.4.4) Etude réalisée précédemment au laboratoire	32
3) Partie expérimentale.....	35
3.1) Introduction	35
3.2) Matériels et méthodes.....	36
3.2.1) Matériel	36
3.2.2) Culture cellulaire en monocouche.....	36
3.2.3) Préparation des peaux reconstruites	38
3.2.4) Analyse du sécrétome (étape 2 uniquement)	41
3.2.5) Analyses	42
3.2.6) Protocole	45

3.3) Résultats	62
3.3.1) Etape 1	62
3.3.2) Etape 2	64
3.4) Discussion	69
3.5) Conclusions	73
4) Bibliographie.....	75

Liste des tableaux

Tableau 1 : Milieu de prolifération des fibroblastes	36
Tableau 2 : Milieu de prolifération des ASCs (Milieu BFGF)	37
Tableau 3 : Milieu de culture pour kératinocytes (MCK).....	38
Tableau 4 : Milieu Derme Equivalent (DE)	39
Tableau 5 : Milieu Peaux Reconstituées (PR)	40
Tableau 6 : Milieu Air/Liquide (A/L)	41
Tableau 7 : Cellules utilisées pour l'étape 1	46
Tableau 8 : Milieux de culture utilisés au cours de l'étape 1	47
Tableau 9 : Plan des plaques pour la culture en immersion (étape 1).....	49
Tableau 10 : Cellules utilisées pour l'étape 2	52
Tableau 11 : Milieux de culture utilisés au cours de l'étape 2	53
Tableau 12 : Plan des plaques pour la culture en immersion (étape 2).....	56
Tableau 13 : Planning prévisionnel.....	60

Liste des figures

Figure 1 : Les 3 couches de la peau.....	19
Figure 2 : Temps de culture (étape 1).....	48
Figure 3 : Plan des analyses (étape 1)	50
Figure 4 : Temps de culture (étape 2).....	54
Figure 5 : Plan des analyses (étape 2)	58
Figure 6 : Résultats histologiques – J42 – Etape 1	63
Figure 7 : Résultats histologiques – Contrôles – J42 – Etape 2	65
Figure 8 : Marquage immunofluorescent des kératinocytes basaux à la kératine 14 – Contrôles – J42 – Etape 2 – Grossissement x10.....	66
Figure 9 : Résultats histologiques – J42 – Etape 2	68

Liste des abréviations

3D : 3 dimensions

A/L : Air/Liquide

ASCs : de l'anglais « Adipose-derived Stem Cells » soit cellules souches issues du tissu adipeux

BSA : de l'anglais « Bovine Serum Albumine » soit albumine de sérum bovin

BTC/HCL : Banque de Tissus et Cellules des Hospices Civils de Lyon

CTGF : de l'anglais « Connective Tissue Growth Factor » soit facteur de croissance du tissu conjonctif

DE : Derme Equivalent

EGF : de l'anglais « Epidermal Growth Factor » soit facteur de croissance de l'épiderme

FGF : de l'anglais « Fibroblast Growth Factor » soit facteur de croissance des fibroblastes

G-CSF : de l'anglais « Granulocyte Colony Stimulating Factor » soit facteur stimulant les colonies de granulocytes

GM-CSF : de l'anglais « Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor » soit facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages

HGF : de l'anglais « Hepatocyte Growth Factor » soit facteur de croissance des hépatocytes

HPS : Hématoxyline-Phloxine-Safran

IGF : de l'anglais « Insulin-like Growth Factor » soit facteur de croissance similaire à l'insuline

IL-6 : Interleukine 6

JDE : Jonction Dermo-Epidermique

KGF : de l'anglais « Keratinocyte Growth Factor » soit facteur de croissance des kératinocytes

LSC : Laboratoire des Substituts Cutanés

MDA : MalonDiAldéhyde

MEC : Matrice ExtraCellulaire

MMPS : Métalloprotéases matricielles

MSCs : de l'anglais « Mesenchymal Stem Cells » soit cellules souches mésenchymateuses

PDGF : de l'anglais « Platelet-Derived Growth Factor » soit facteur de croissance issu des plaquettes

PR : Peaux Reconstituées

ROS : de l'anglais « Reactive Oxygen Species » soit dérivés réactifs de l'oxygène

SOD : SuperOxide Dismutase

TGF- β : de l'anglais « Transforming Growth Factor-beta » soit facteur de croissance transformant beta

UV : UltraViolet

VEGF : de l'anglais « Vascular Endothelial Growth Factor » soit facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

XPF : de l'anglais « Xeroderma Pigmentosom Factor » soit facteur de xérodermie pigmentaire

1) Introduction générale

Le vieillissement est un phénomène physiologique, lent, inéluctable et irréversible. Il modifie les structures anatomiques et histologiques et altère le fonctionnement des différents organes et tissus dont la peau. Au niveau cutané, les premiers signes visibles sont des altérations de la texture, de la couleur, de la transparence du tissu, ainsi que la formation de rides. Selon les individus et les sites anatomiques considérés, l'intensité et la chronologie d'apparition de ces manifestations sont variables.

La lutte contre les effets du vieillissement représente un enjeu majeur de santé publique du fait de l'allongement de l'espérance de vie.

Le phénomène de vieillissement cutané est de plus en plus étudié notamment par les industries cosmétiques qui développent de nombreux produits « anti-âges » ou « anti-rides » et qui doivent démontrer l'efficacité qu'elles revendiquent.

Le *Laboratoire des Substituts Cutanés* (LSC) de la *Banque de Tissus et Cellules des Hospices Civils de Lyon* (BTC/HCL) situé au groupement hospitalier *Edouard Herriot*, où j'ai effectué mon stage de 5^{ème} année hospitalo-universitaire, a développé différents modèles de vieillissement cutané à partir d'un modèle *in vitro* de peau reconstruite (PR) en 3 dimensions (3D) :

- le **modèle de sénescence *in vitro*** : cinétique longue (culture de 42 à 120 jours) de peaux reconstruites réalisées à partir de fibroblastes et kératinocytes issus de patients jeunes ;
- le **modèle de peaux reconstruites « âgées »** réalisées à partir de kératinocytes et de fibroblastes issus de patients âgés, comparé avec des peaux reconstruites préparées avec des fibroblastes jeunes.

Ces modèles permettent d'étudier les mécanismes et les conséquences du vieillissement cutané et ainsi de tester des produits cosmétiques en vue de démontrer leur efficacité « anti-âge » sur les cibles d'intérêt.

Depuis la fin du 19^{ème} siècle, le tissu adipeux est utilisé comme produit de comblement en chirurgie plastique et reconstructrice au niveau des rides du visage ou du dos de la main par exemple. En plus de l'effet de comblement, le tissu adipeux apporte une amélioration de la qualité de la peau au niveau de la greffe : augmentation de son

épaisseur, meilleure élasticité ou encore disparition des taches brunes. Cet effet est variable selon les individus. Cette variabilité a été attribuée à celle de la proportion en cellules souches mésenchymateuses dans la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux.

L'objectif ici est de vérifier, dans le modèle de PR « âgée », l'impact de ces cellules souches sur la qualité de la peau et les mécanismes de vieillissement cutané.

Dans une étude préliminaire, l'effet des cellules souches issues du tissu adipeux (ASCs) sur le processus de vieillissement cutané a été démontré sur le modèle de sénescence *in vitro*. En effet, dans le modèle de peaux reconstruites développé au LSC, l'ajout d'ASCs a montré une amélioration de la qualité de l'épiderme et du derme, une augmentation de la capacité de prolifération des cellules cutanées et un retardement de la sénescence cellulaire. Ce résultat reste à confirmer avec des cellules d'autres donneurs et en utilisant, cette fois, le modèle de peaux reconstruites préparées avec des cellules âgées en comparaison avec des peaux reconstruites préparées avec des cellules jeunes.

Afin d'aider à la compréhension de notre démarche, nous présenterons brièvement, dans la partie bibliographique, la structure de la peau, les mécanismes du vieillissement cutané, les cellules souches issues du tissu adipeux et leur potentiel effet sur la qualité de la peau vieillissante.

2) Partie bibliographique

2.1) La peau (pour revue de [1-4])

La peau est un organe de revêtement qui recouvre la totalité de la surface du corps et qui est en continuité avec les muqueuses au niveau des orifices naturels. Elle constitue l'un des plus grands organes avec une surface de 1,5 à 2 m². Lui sont associées différentes structures regroupées sous le terme d'annexes cutanées et qui comprennent notamment les poils, les cheveux, les ongles et les glandes sudorales. De plus, la peau contient des vaisseaux, des nerfs et possède ses propres défenses immunitaires.

La peau est un organe vital qui assure de multiples fonctions : sensibles, protectrices vis-à-vis d'agressions externes multiples, immunitaires, métaboliques, thermorégulatrices, etc.

Elle est constituée d'un épithélium de revêtement, l'épiderme, et d'une couche de tissu conjonctif, le derme. Le derme et l'épiderme sont séparés par la jonction dermo-épidermique. Sous le derme se trouve l'hypoderme : tissu conjonctif contenant du tissu adipeux (cf. Figure 1).

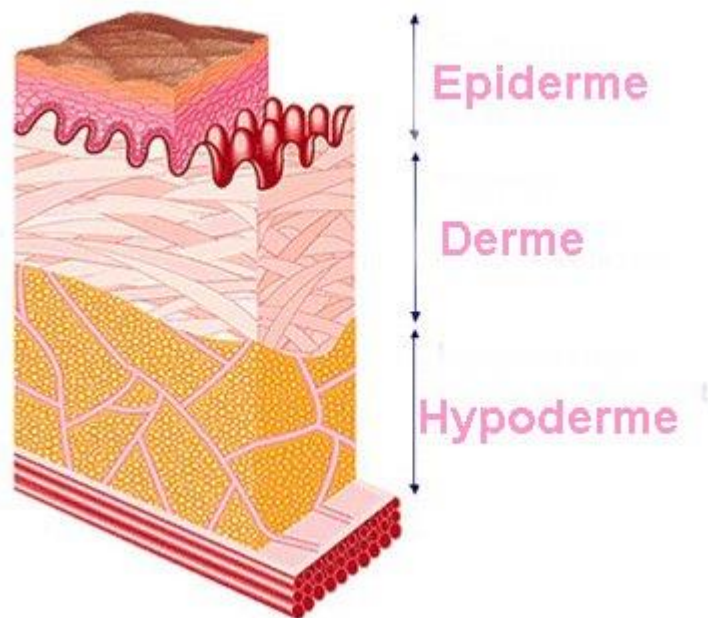


Figure 1 : Les 3 couches de la peau [5]

2.1.1) Epiderme (pour revue de [1-4])

L'épiderme est la structure la plus superficielle de la peau. C'est un épithélium très mince (épaisseur de 0,06 à 1 mm en moyenne), pavimenteux, stratifié (malpighien)

et kératinisé. Il est d'origine ectodermique et se renouvelle constamment. N'étant pas irrigué, ses éléments nutritifs lui proviennent par transsudation des capillaires du derme.

L'épiderme est composé de plusieurs types cellulaires. La majorité (90 %) est représentée par les kératinocytes qui sont agencés en plusieurs couches :

- la couche basale (*stratum germinativum*) : elle ancre l'épiderme au derme, constitue le seul compartiment prolifératif de l'épiderme et assure ainsi son homéostasie en permettant le renouvellement constant, la réparation et le maintien de l'épiderme ;
- la couche des cellules à épines (ou corps muqueux de Malpighi) (*stratum spinosum*) : elle représente le corps de l'épiderme et est appelée ainsi car les desmosomes entre les kératinocytes apparaissent comme des épines au microscope ;
- la couche granuleuse (*stratum granulosum*) : c'est une couche où le processus de kératinisation se termine, des granules de kératoyaline et des kératinosomes y sont présents ;
- la couche cornée (*stratum corneum*) : elle est constituée de cornéocytes (kératinocytes ayant expulsé leur noyau).

Trois autres types cellulaires sont observés dans l'épiderme :

- les mélanocytes : ils synthétisent la mélanine (principal facteur photoprotecteur) et la transfère aux kératinocytes ;
- les cellules de Langerhans : ce sont les cellules présentatrices d'antigènes de la peau et elles jouent donc un rôle déterminant dans l'immunité ;
- les cellules de Merkel : ce sont des cellules neuroendocrines qui fonctionnent comme des mécanorécepteurs en interagissant avec les nerfs cutanés au niveau des disques pilaires et des zones cutanées à épiderme épais.

Dans l'épiderme, plusieurs types de jonctions cellulaires assurent la cohésion tissulaire : les desmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées.

2.1.2) Jonction Dermo-Epidermique (JDE) (pour revue de [1-4,6])

La JDE est une structure complexe qui ancre l'épiderme au derme. Responsable de la cohésion épithélio-mésenchymateuse, elle intervient également dans de nombreux

processus biologiques cruciaux tels que le renouvellement et la différenciation épidermique. Ces fonctions sont possibles grâce à l'agencement de molécules qui lui sont exclusives et qui forment un réseau complexe stabilisé par des interactions spécifiques.

D'un point de vue ultra-structural, la JDE comprend de la superficie vers la profondeur :

- des hémidesmosomes : ils assurent le lien physique entre les cellules épithéliales basales et la matrice extracellulaire sous-jacente ;
- la lame basale épidermique : elle est constituée d'un fin feuillet de matrice extracellulaire, organisé en deux couches : la *lamina lucida* traversée par les filaments d'ancrage et la *lamina densa* ;
- une zone fibrillaire sous-basale : elle est constituée essentiellement de fibrilles d'ancrage et s'étend jusqu'aux couches superficielles du derme papillaire.

La JDE représente un support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme au derme, contrôle les échanges métaboliques entre ces deux compartiments, permet la migration des kératinocytes lors de la cicatrisation et est traversée par différents types cellulaires comme des cellules de Langerhans ou des lymphocytes lors de processus immunitaires.

2.1.3) Derme (pour revue de [1-4])

Le derme est le tissu conjonctif qui soutient l'épiderme et le rattache à l'hypoderme. Son épaisseur varie en fonction de sa localisation et atteint un maximum de 4 mm au niveau du dos. Il est d'origine mésenchymateuse, mésodermique. Dans le derme circulent des vaisseaux sanguins et lymphatiques. C'est un tissu de nutrition pour l'épiderme. Il est également traversé par de nombreux nerfs dont les terminaisons sont localisées dans le derme ou l'épiderme. Les principales cellules du derme sont les fibroblastes qui produisent une riche matrice extracellulaire (MEC) organisée en réseaux de macromolécules dont les fibres de collagènes mais aussi des fibres élastiques, des glycoprotéines de structures et des protéoglycanes.

Le derme peut être décomposé en 2 couches.

- La couche papillaire : elle est superficielle et fine ; il s'agit d'un tissu conjonctif lâche constitué essentiellement de fibroblastes mais aussi de mastocytes, de macrophages et de lymphocytes ; dans cette zone, les fibres de collagènes sont de

faible diamètre, lâches et orientées perpendiculairement à la jonction dermo-épidermique.

- La couche réticulaire : elle est plus épaisse ; il s'agit d'un tissu conjonctif dense, irrégulier, composé principalement de fibres de collagène I. Cette couche contient plus de fibres et moins de cellules que la couche papillaire. Les fibres de collagène, de grands diamètres, s'y organisent en faisceaux et forment un réseau qui se densifie en profondeur.

2.1.4) Hypoderme (pour revue de [1-4])

L'hypoderme est formé de tissu adipeux. Il est composé de lobes graisseux limités en lobules graisseux par des travées de fibres de collagènes issues du derme et qui vont se fixer aux aponévroses des muscles ou au périoste des os, limitant ainsi la mobilité de la peau. Ces cloisons servent de passage aux vaisseaux et nerfs destinés au derme. Les lobules graisseux sont remplis de cellules graisseuses : les adipocytes.

L'hypoderme a différents rôles :

- rôle métabolique : les adipocytes mettent en réserve les lipides sous forme de triglycérides et fournissent des acides gras en situation de demande énergétique ;
- fonction plastique : le tissu adipeux hypodermique modèle la silhouette en fonction de l'âge, du sexe et de l'état nutritionnel ;
- protection mécanique ;
- rôle dans la thermorégulation ;
- réservoir de cellules souches mésenchymateuses : les cellules souches issues du tissu adipeux (ASCs) qui nous intéressent dans notre travail.

2.1.5) Modèle des peaux reconstruites [6]

Pour étudier la peau humaine, différents modèles de peaux reconstruites (PR) *in vitro* ont été développés. Les PR sont des ensembles dermo-épidermiques en 3 dimensions (3D), obtenus par épidermisation en surface d'un équivalent dermique (DE pour « dermis equivalent »). Le DE est généré par culture *in vitro* de fibroblastes, avec ou sans support (biologique ou synthétique). L'épidermisation du DE se fait ensuite par ensemencement d'une suspension cellulaire (kératinocytes) ou par greffe d'un feuillet épidermique ou encore par culture d'explants cutanés (composés principalement de kératinocytes) déposés directement à la surface du DE.

Le premier modèle dermo-épidermique développé fut celui de Bell en 1981. Il est obtenu par incorporation de fibroblastes dans un gel de collagène. Ce DE est ensuite épidermisé par culture de kératinocytes en surface. Le confinement physique, dû au phénomène de rétraction, serait à l'origine de l'inhibition de la prolifération des fibroblastes et de la synthèse de la matrice extracellulaire associée (Berthod et al. 1990). Cependant, cette contraction entraîne également la libération de métalloprotéases qui dégradent la matrice extracellulaire du DE.

Le manque de résistance mécanique du modèle de Bell a conduit au développement d'une seconde approche, basée sur l'utilisation de matrices poreuses à base de collagènes bovins de type I et III et de chondroïtine-6-sulfate, issu du cartilage de requin. Le collagène de ces matrices est rendu insoluble soit par une réticulation au glutaraldéhyde (modèle de Boyce, 1988) soit par une stabilisation ionique par le chitosan (polyoside) développée par le LSC (modèle breveté en 1987, que nous allons utiliser). Dans ces substrats poreux, les fibroblastes migrent, prolifèrent et synthétisent de la matrice extracellulaire mature très proche de celle de la peau humaine normale. Ces modèles ont l'avantage de présenter un phénomène de rétraction limité. Les fibroblastes synthétisent également des cytokines et des facteurs de croissance permettant à l'épiderme de se développer et de se renouveler harmonieusement. Dans le modèle du LSC, le contact direct entre fibroblastes et kératinocytes permet la formation d'une jonction dermo-épidermique organisée et mature contrairement au modèle de Boyce où un film sépare le derme de l'épiderme empêchant ainsi ce type de contact direct entre cellules épithéliales et membrane basale.

Depuis, un modèle dépourvu de matériaux exogènes dans sa partie dermique a été développé (Pouliot et al. 2002). Ce modèle est basé sur la capacité des cellules à s'auto-assembler en un tissu cohérent, tout en s'enrobant de leur propre matrice extracellulaire. Il permet de s'affranchir des contraintes techniques liées à l'utilisation de supports matriciels biosynthétiques.

Pour étudier le vieillissement cutané, le LSC a développé deux variantes du modèle de peau reconstruite en éponge collagène-glycosaminoglycane-chitosan :

- le **modèle de sénescence *in vitro*** : la différence avec le modèle de référence est l'application de cinétiques longues (culture de 42 à 120 jours) ; dans ce modèle, les peaux reconstruites sont réalisées à partir de fibroblastes et kératinocytes issus de patients jeunes ;
- le **modèle de peaux reconstruites « âgées »** : la différence avec le modèle de référence est l'utilisation de kératinocytes et/ou de fibroblastes issus de patients âgés [7].

2.2) Le vieillissement cutané [6]

Le vieillissement est un phénomène physiologique qui a des conséquences, entre autres, au niveau cutané. Cliniquement, le vieillissement cutané est marqué par des altérations de la texture, de l'élasticité, de la couleur et de la transparence de la peau, ainsi que par la formation des rides.

2.2.1) Facteurs du vieillissement (pour revue de [6,8-11])

Deux types de vieillissement sont à distinguer :

- le vieillissement intrinsèque : phénomène naturel, génétiquement programmé, caractérisé par de nombreuses altérations cellulaires ;
- le vieillissement extrinsèque : dû à des facteurs environnementaux qui accélèrent le vieillissement naturel.

2.2.1.1) Facteurs intrinsèques (pour revue de [6,8-11])

Plusieurs éléments clés du vieillissement intrinsèque au niveau cellulaire ont été mis en évidence.

- Perte des télomères (séquences d'ADN répétées à la fin de l'ADN linéaire) : les cellules diploïdes ont un potentiel de prolifération limité. Après un certain nombre de divisions, elles entrent dans un processus de sénescence avec un arrêt de la prolifération cellulaire. Ce nombre limité de divisions résulte de la perte des télomères. En effet, à chaque division cellulaire, les télomères raccourcissent jusqu'à ce que la déplétion en télomère empêche la division cellulaire.
- Stress oxydatif : la formation de radicaux libres entraîne des dommages au niveau cellulaire (membranes, enzymes, ADN). La théorie du vieillissement, basée sur les radicaux libres, stipule que la base moléculaire du vieillissement s'explique

par l'accumulation, au cours de la vie, des dommages oxydatifs causés aux cellules par excès de production de ROS (« Reactive Oxygen Species » ou « dérivés réactifs de l'oxygène ») comme conséquence du métabolisme aérobie [9].

- Déficience des systèmes de réparation de l'ADN.
- Altération du système endocrinien : au cours du vieillissement, des modifications des facteurs de croissance et une diminution de l'activité hormonale ont un impact sur le vieillissement cutané.
- Apoptose : le vieillissement est lié à une « up-regulation » de l'apoptose.

2.2.1.2) *Facteurs extrinsèques* (pour revue de [6,8-11])

Différents facteurs environnementaux externes ont un impact sur le vieillissement cutané.

- L'exposition solaire/radiations ultraviolettes (UV) : elle représente 80% des facteurs extrinsèques du vieillissement cutané, et est à l'origine du vieillissement prématuré de la peau. A la fois les UVA (responsables des principaux dommages) et les UVB participent à ce « photo-vieillissement » (les UVA altèrent l'épiderme et le derme, les UVB touchent principalement l'épiderme). Les altérations causées par les radiations UV dépendent du phénotype de la peau photo-exposée : l'impact des radiations UV est différent selon les ethnies, selon la pigmentation de la peau. Les radiations UV augmentent la production de collagénases (aboutissant à la dégradation des collagènes de types IV et VII), de « métalloprotéases matricielles » (MMPs) (dégradant différentes protéines de la matrice) et de « xeroderma pigmentosom factor » (XPF) (provoquant le plissement du derme et de l'épiderme, expliquant le début de la formation des rides). Les conséquences sont une dégradation du collagène, de l'élastine et d'autres composants de la MEC dermique. De plus, les radiations UV agissent indirectement en interférant avec des enzymes fondamentales dans les processus de réparation de l'ADN et avec des composants du système immunitaire (cellules T et cellules de Langerhans).
- Le tabac : il entraîne l'activation des MMPs, un affinement de la couche cornée, une diminution du taux de vitamine A (qui réduit les dommages du collagène), une augmentation de la production de collagénases, une diminution du débit sanguin au niveau des capillaires cutanés ce qui entraîne une privation en oxygène et nutriment, une diminution de la quantité de collagène et d'élastine au niveau du derme et la déformation des kératinocytes.

- Alcool : il induit l'accumulation de radicaux libres qui provoquent un stress oxydatif.
- Alimentation : une sous- ou sur- alimentation accélère le vieillissement cutané.
- Pollution : l'ozone aurait une action au niveau des couches superficielles de l'épiderme en entraînant une diminution de la quantité d'antioxydants comme les vitamines C et E.
- Radiations ionisantes : elles entraînent des altérations au niveau des composants lipidiques cellulaires, en particulier les membranes cellulaires.
- Stress physique ou psychologique sévère.
- Médicaments : les hypocholestérolémiants induiraient une augmentation anormale de la desquamation.

2.2.2) Conséquences du vieillissement (pour revue de [6,8,9,11])

Le vieillissement cutané se manifeste au niveau clinique, histologique et biochimique.

2.2.2.1) *Manifestations cliniques*

Le vieillissement cutané se manifeste, cliniquement, par un dessèchement cutané et l'apparition d'une peau lâche et ridée souvent atrophique. Parfois, la réduction de l'épaisseur du tissu cutané (épiderme et derme) est telle que l'on peut apercevoir le réseau vasculaire cutané sous-jacent. Enfin, les glandes sudoripares et sébacées voient leur fonction excrétrice diminuer. Cela a pour conséquence la disparition du film protecteur hydrolipidique à la surface de la peau, qui devient alors rugueuse, terne, pâle et finement squameuse.

2.2.2.2) *Manifestations histologiques et biochimiques* (pour revue de [6,8, 9,11])

Chaque couche de la peau est impactée par le vieillissement cutané.

Pour commencer, au niveau de l'épiderme, le vieillissement se manifeste principalement par une diminution de son épaisseur. Cette atrophie s'explique par différents paramètres :

- accumulation de kératinocytes sénescents ;
- altérations morphologiques et diminution de la capacité de prolifération des kératinocytes basaux ;
- diminution de la capacité de régénération et de ré-épithélialisation de l'épiderme suite à un traumatisme ;

- diminution de la réponse des kératinocytes aux stimulations par les facteurs de croissance et autres cytokines ;
- réduction des propriétés d'adhérence de l'épiderme liée à une diminution de l'expression de l'intégrine $\beta 1$ impliquée dans l'adhérence des kératinocytes basaux à la lame basale sous-jacente ;
- diminution du nombre de mélanocytes et de cellules de Langerhans.

Le vieillissement se manifeste également par un aplatissement de la JDE avec diminution des projections microvillosités des kératinocytes basaux et duplication de la *lamina densa*. Cela conduit à une diminution des échanges de nutriments et de métabolites entre le derme et l'épiderme et une fragilisation de l'ancrage de l'épiderme au derme.

Au niveau du derme, le vieillissement se manifeste par une désorganisation avec une matrice extracellulaire dense et peu vascularisée. L'atrophie du derme est liée à une réduction du nombre et de la taille des fibroblastes mais surtout de leur capacité de synthèse. Ainsi, il a été mis en évidence une diminution des teneurs en collagène et en élastine avec une perte de leur organisation (tendance à s'orienter parallèlement à la surface du derme). Cette diminution est due, en premier lieu, à une baisse de la synthèse protéique affectant les collagènes de type I et III dans le derme mais aussi à une détérioration des protéines de la matrice extracellulaire.

Enfin, au niveau de l'hypoderme, il a été mis en évidence des variations de l'épaisseur du tissu conjonctif sous cutané qui conduisent à des modifications morphologiques (amincissement au niveau du visage et de la face dorsale de la main mais, chez la femme, épaissement au niveau de l'abdomen et des cuisses).

2.3) Les « Adipose-derived Stem Cells » (ASCs) ou cellules souches issues du tissu adipeux (pour revue de [12-15])

Les cellules souches du tissu adipeux (ASCs) appartiennent à la catégorie des cellules souches mésenchymateuses (MSCs pour « mesenchymal stem cells »).

Les MSCs sont des cellules souches adultes multipotentes présentes dans le tissu conjonctif associé à la plupart des organes. Elles possèdent des propriétés d'auto-renouvellement qui autorisent le maintien d'un pool de cellules souches tout au long de la vie. Multipotentes, elles ont la capacité de se différencier en différents types cellulaires

spécialisés permettant ainsi le renouvellement, la régénérescence et la réparation de nombreux tissus. Elles sont ainsi capables, sous l'influence de signaux spécifiques, de se différencier *in vitro* et *in vivo* dans les différents lignages mésodermiques à savoir : fibroblastique, musculaire, osseux, chondrocytaire et adipocytaire. *In vivo*, les MSCs sont à l'origine des fibroblastes, des adipocytes, des ostéocytes, des chondrocytes et des myocytes. *In vitro*, leur potentiel de différenciation est plus large : cellules neurales, cardiomyocytes, hépatocytes et cellules endothéliales peuvent être générés à partir de MSCs. Ainsi, les potentialités thérapeutiques des MSCs sont multiples : de la lipodystrophie aux maladies neurodégénératives en passant par des reconstructions musculaires ou osseuses, etc. Ces cellules sont présentes dans le tissu conjonctif associé notamment à la moelle osseuse, au tissu adipeux et à la pulpe dentaire. Des MSCs circulantes sont également présentes dans le sang de cordon ombilical.

Dans ce travail de thèse, nous nous intéressons plus spécifiquement aux MSCs du tissu adipeux, les ASCs. Le tissu adipeux constitue un réservoir de MSCs autologues facilement exploitables. En effet, il représente 10 à 50% du poids d'un individu et peut être prélevé en grand volume par une méthode simple et peu invasive : la lipoaspiration. De par leur origine autologue, ces cellules souches ne posent pas les problèmes éthiques soulevés par l'utilisation des cellules souches embryonnaires. De plus, les ASCs ont l'avantage de se cultiver plus facilement et de proliférer plus vite que les cellules souches issues de la moelle osseuse ou du cordon ombilical [12]. A l'extraction, il faut cependant noter que la quantité d'ASCs est variable selon les individus, leur âge, leur poids, la localisation du prélèvement ou encore la technique de prélèvement. A ce sujet, quel que soit le facteur étudié, les résultats de la littérature sont très controversés et il est difficile d'établir une règle générale.

Les ASCs ont un phénotype bien caractérisé : elles expriment notamment les marqueurs CD90, CD105 et CD73 mais n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques CD14, CD34 et CD45.

2.4) Les ASCs et le vieillissement cutané

2.4.1) Impact des ASCs au niveau cutané

L'effet « antiviellissement » des ASCs a été mis en évidence par l'observation clinique d'une amélioration de la qualité de la peau suite à l'injection de tissu adipeux

dans le comblement de perte de substance (lipoatrophie faciale, hypotrophies mammaires, amincissement de la peau du dos de la main avec l'âge, etc.) [12]. En effet, alors que le vieillissement conduit à l'apparition de rides et à la réduction de l'épaisseur de la peau, l'injection de tissu adipeux autologue, que ce soit au cours d'études *in vivo* chez le porc [16] ou la souris [18] ou dans les peaux « photo-âgées » de patients, améliore la structure générale de la peau et a une action « anti-ride » [16,17]. Suite à ces observations cliniques, variables selon les individus, l'explication apportée a été la présence en quantité variable d'ASCs dans le tissu adipeux injecté.

Aujourd'hui, l'effet des ASCs contre différentes conséquences du vieillissement a été démontré.

Les ASCs exercent notamment de puissants effets trophiques sur les kératinocytes et accélèrent la régénération, la ré-épithélialisation et la cicatrisation cutanée *in vitro* et *in vivo* [19,21]. En effet, *in vivo* (chez la souris et le porc), l'injection d'ASCs améliore le processus de cicatrisation cutanée avec une meilleure angiogenèse et un taux de cicatrisation plus important [21]. De plus, la greffe intradermique de feuillets d'ASCs permet d'augmenter l'épaisseur de l'épiderme dans un modèle de plaie cutanée, chez la souris [22].

Au niveau du derme, l'injection d'ASCs prévient la diminution du nombre de fibroblastes et de leurs capacités de synthèse protéique. Ainsi, *in vivo* (chez la souris [16] et le porc [17]), l'injection intradermique ou sous-cutanée de tissu adipeux, augmente la sécrétion de collagène et diminue l'expression de marqueurs de sénescence cellulaire au niveau de l'épiderme (SOD : superoxide dismutase ; MDA : malondialdéhyde).

Par ailleurs, différentes études réalisées *in vitro* ont permis d'établir le rôle majeur des effets paracrines exercés par les ASCs. Ainsi, des kératinocytes cultivés en présence de milieu conditionné par des ASCs (c'est-à-dire un milieu récolté sur une culture d'ASCs et contenant donc les facteurs sécrétés par les ASCs) présentent une augmentation de leur taux de prolifération [19,20]. Plus spécifiquement, l'ajout de milieu conditionné par des ASCs accélère la fermeture de lésions infligées lors d'un « scratch test » (modèle de « blessure » *in vitro*) à un tapis cellulaire de kératinocytes humains en monocouche [19]. Cet effet passe entre autres par une augmentation des capacités de migration des kératinocytes [20,21]. Le milieu conditionné par des ASCs stimule également la

prolifération des fibroblastes et leur capacité à synthétiser les protéines de la matrice, en particulier les collagènes [18,19]. Cet effet s'exerce au niveau transcriptionnel en induisant une « up-regulation » des collagènes de types I et III et de la fibronectine avec, en parallèle, une « down-regulation » de la métalloprotéase MMP1. Par ailleurs, le milieu conditionné par des ASCs, stimule la migration des fibroblastes dermiques humains dans un modèle *in vitro* de cicatrisation cutanée [23].

Outre leurs effets sur les kératinocytes et les fibroblastes, les ASCs exercent une activité immunomodulatrice facilitant la cicatrisation cutanée [17]. Elles augmentent également l'angiogenèse dermique en activant l'expression de VEGF (« Vascular Endothelial Growth Factor ») ce qui accroît la densité en vaisseaux sanguins cutanés *in vivo*. Cette action pro-angiogénique est également démontrée, *in vitro*, par des expériences montrant que le milieu conditionné par des ASCs augmente la croissance des cellules endothéliales ainsi que leur survie en diminuant de manière significative leur susceptibilité à l'apoptose [24].

Si nous nous intéressons maintenant aux causes du vieillissement cutané (cf. « 2.2.1) Facteurs du vieillissement »), le rôle du stress oxydatif semble central. Or, les ASCs semblent avoir un effet antioxydant qui protégerait les fibroblastes de la peau humaine des lésions provoquées par les radicaux libres [17,25].

2.4.2) Mécanismes d'action

L'impact des ASCs, au niveau cutané et dans le processus de vieillissement de la peau, semble indéniable mais quel est leur mécanisme d'action ? A l'heure actuelle, deux hypothèses sont proposées [17,21] :

- l'effet paracrine des ASCs sur les cellules cutanées ;
- la différenciation des ASCs en fibroblastes ou leur transdifférenciation en cellules épidermiques.

Comme indiqué précédemment, l'effet paracrine est le mécanisme qui est le plus clairement démontré au plan expérimental.

In vitro, les ASCs augmentent la prolifération des fibroblastes dermiques humains non seulement par un contact direct entre les deux types de cellules, effet confirmé par des expériences de co-culture, mais aussi par une activation paracrine via des facteurs sécrétés, comme le montrent les effets induits par le milieu conditionné par les ASCs décrits précédemment.

Différents facteurs, sécrétés par les ASCs ou par les cellules cutanées en réponse à la stimulation paracrine exercée par les ASCs, ont été identifiés :

- l'activité anti-oxydante des ASCs serait liée à la production de différents éléments tels que des protéines (la superoxyde dismutase 3 notamment) et des facteurs de croissance (« Platelet-Derived Growth Factor » (PDGF), « Keratinocyte Growth Factor » (KGF), « Fibroblast Growth Factor » (FGF), « Hepatocyte Growth Factor » (HGF) et VEGF) [25] ;
- l'activation des fibroblastes dermiques humains, qui entraîne la production de collagène par ces cellules dermiques, est liée au fait que les ASCs produisent différents facteurs de croissance : VEGF, HGF, « Insulin-like Growth Factor » (IGF), PDGF et « Transforming Growth Factor-beta » (TGF- β)) [18] ;
- l'effet des ASCs sur les kératinocytes est lié à différents facteurs de croissance/cytokines identifiés dans du milieu conditionné : HGF, FGF-1, « Granulocyte Colony Stimulating Factor » (G-CSF), « Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor » (GM-CSF), Interleukine 6 (IL-6), VEGF et TGF- β 3 [20] ;
- l'effet cicatrisant a été expliqué, *in vitro* et *in vivo*, par un effet paracrine : cet effet se fait via la sécrétion de facteurs proangiogéniques (VEGF), de facteurs qui favorisent la migration et la différenciation des kératinocytes (« Epidermal Growth Factor » (EGF) et TGF- β), de facteurs qui permettent la prolifération des fibroblastes (PDGF, EGF, FGF2, « Connective Tissue Growth Factor » (CTGF)) et de facteurs qui entraînent la production de collagène par les fibroblastes (FGF2, PDGF, TGF- β et CTGF) [19,26].

Si l'effet paracrine des ASCs semble accepté par la communauté scientifique, il n'explique pas la persistance de l'impact positif des ASCs dans le temps. D'autres mécanismes d'action semblent donc intervenir.

Une explication potentielle est la capacité de différenciation des ASCs en cellules cutanées [17,21]. La capacité des ASCs à se transdifférencier en cellules épidermiques est encore controversée mais il est admis qu'elles se différencient en fibroblastes. Par ailleurs, les ASCs ont la capacité de se différencier en cellules des lignées épithéliale et endothéliale : les ASCs ne contribuent pas uniquement à la régénération cutanée mais aussi à la formation de vaisseaux sanguins [26].

2.4.3) Applications cliniques potentielles (pour revue de [18,20,21,23,25,26])

Sur la base du potentiel de différenciation des ASCs et du large éventail de facteurs trophiques et procicatrisants sécrétés par les ASCs, les applications cliniques en dermatologie sont nombreuses et certaines sont en phase d'essai clinique :

- promotion de la cicatrisation et de la régénération cutanée ;
- traitement de l'élastose solaire (encore appelé photo-vieillessement = altérations induites par l'exposition solaire) ;
- amélioration qualitative de l'apparence de la peau ;
- action anti-ride.

Les ASCs, qui ont les avantages de présenter une source autologue, d'être biocompatibles et d'avoir un effet sur le long terme, représentent donc une solution de choix en chirurgie régénérative et réparatrice et un espoir dans la lutte contre le vieillissement cutané. Dans ce contexte, des injections d'ASCs sont actuellement proposées pour diminuer les rides du visage ou du dos de la main par exemple [27].

2.4.4) Etude réalisée précédemment au laboratoire [27]

Une étude *in vitro* a été réalisée pour confirmer l'influence des ASCs sur la qualité de la peau dans différents modèles de PR. Les ASCs ont étéensemencées avec les fibroblastes dans le DE à différents ratios ASCs/fibroblastes (25 ou 50%). Ce protocole permet de mimer l'injection intra dermique d'ASCs telle qu'elle est réalisée en chirurgie esthétique.

Cette approche a permis de démontrer les effets trophiques et régénérateurs exercés par les ASCs sur les PR dans différentes conditions expérimentales :

- effets trophiques sur l'épiderme : l'analyse de marqueurs de prolifération (Ki67) et de différenciation kératinocytaire (filaggrine) ainsi que les mesures d'épaisseur

de l'épiderme ont démontré que les ASCs permettent l'obtention d'un épiderme reconstruit plus épais et mieux différencié ;

- effets trophiques sur le derme : la présence d'ASCs augmente la synthèse de protéines dermiques (la décorine ou la fibrilline 1 par exemple) et accélère la maturation du derme ;
- effets régénérateurs dans le **modèle de PR sénescence** : la présence d'ASCs retarde la sénescence (diminution de marqueurs de sénescence tels que p16) et augmente le nombre de cellules prolifératives (exprimant Ki67) dans les PR cultivées jusqu'à J100 (100^{ème} jour de culture).

Il est intéressant de noter que l'action des ASCs est plus marquée pour des ratios ASCs/fibroblastes de 25% comparés à 50%.

3) Partie expérimentale

3.1) Introduction

Pour étudier le vieillissement cutané, le LSC a développé deux modèles à partir du modèle de peau reconstruite en éponge collagène-glycosaminoglycane-chitosan :

- le **modèle de sénescence *in vitro*** : cinétique longue (culture de 42 à 120 jours) de peaux reconstruites réalisées à partir de fibroblastes et kératinocytes issus de patients jeunes ;
- le **modèle de peaux reconstruites « âgées »** réalisées à partir de kératinocytes et de fibroblastes issus de patients âgés, comparé avec des peaux reconstruites préparées avec des fibroblastes jeunes [7].

Dans une étude préliminaire réalisée au laboratoire [27], sur le **modèle de sénescence *in vitro***, l'incorporation d'ASCs aux fibroblastes dermiques, au moment de l'ensemencement des dermes équivalents, a montré leur effet régénérateur. En effet, les épidermes et les dermes papillaires des PR supplémentées en ASCs sont plus épais, la prolifération cellulaire des kératinocytes est augmentée et leur différenciation terminale améliorée. Ces effets sont optimaux pour une proportion de 25% d'ASCs pour 75% de fibroblastes. De plus, l'incorporation d'ASCs au DE diminue l'expression des marqueurs de sénescence p16 et β -galactosidase dans le modèle de PR cultivée sur 100 jours.

L'objectif de ce travail est de tester la reproductibilité des effets observés dans ce modèle de sénescence en utilisant des ASCs dérivant de 2 autres donneurs (1 pour l'étape 1 et 1 pour l'étape 2). Nous espérons également démontrer un effet bénéfique de l'ajout d'ASCs dans le **modèle de peaux reconstruites « âgées »**. Dans les 2 étapes du protocole, nous comparons donc des peaux reconstruites préparées avec différentes combinaisons de fibroblastes et de kératinocytes jeunes ou âgés, avec ou sans ASCs.

3.2) Matériels et méthodes

Cette partie décrit le matériel et les méthodes utilisées pour la réalisation des deux étapes du protocole (cf. 2.5) Protocole).

3.2.1) Matériel

Les cellules que nous utilisons sont issues de banques de fibroblastes, de kératinocytes et d'ASCs du LSC. Ces banques ont été constituées à partir de résidus opératoires en suivant les lois d'éthique en vigueur : consentement écrit des donneurs, anonymisation des prélèvements, conservation et protection des données de traçabilité. Les souches de fibroblastes et de kératinocytes utilisées dans ce travail ont été antérieurement validées pour la préparation de peaux reconstruites cultivées.

3.2.2) Culture cellulaire en monocouche

3.2.2.1) Culture des fibroblastes en monocouche

Les fibroblastes sont décongelés, comptés etensemencés à 8000 cellules/cm² dans des T175 (BD FALCON) contenant du milieu fibroblaste (cf. Tableau 1). La culture est poursuivie jusqu'à confluence en changeant le milieu 3 fois par semaine.

Tableau 1 : Milieu de prolifération des fibroblastes

Composants	Fournisseurs	Concentrations
DMEM	Gibco®	qsp
Sérum de veau	Hyclone	10 %
Pénicilline	PanPharma	100 UI/ml
Gentamycine	PanPharma	20 µg/ml
Amphotéricine B	Bristol Myers Squibb	1 µg/ml

3.2.2.2) Culture des ASCs en monocouche

Les ASCs sont décongelées, comptées, etensemencées à 8000 cellules/cm² dans des T175 contenant du milieu BFGF (cf. Tableau 2). La culture est poursuivie jusqu'à confluence en changeant le milieu 3 fois par semaine.

Tableau 2 : Milieu de prolifération des ASCs (Milieu BFGF)

Composants	Fournisseurs	Concentrations
DMEM / HAM F12 (1:1)	Gibco®	qsp
Sérum de veau fœtal	Hyclone	10 %
bFGF	Miltenyi	10 ng/mL
Pénicilline	PanPharma	100 UI/mL
Gentamycine	PanPharma	20 µg/ml

3.2.2.3) Culture des kératinocytes en monocouche

La culture des kératinocytes est réalisée selon la technique de Green modifiée par le LSC : en bref, les kératinocytes sontensemencés sur une couche nourricière et incubés dans un milieu de culture pour kératinocytes (cf. Tableau 3).

Préparation des couches nourricières

Les fibroblastes irradiés sont décongelés, comptés etensemencés à 4000 cellules/cm² dans des T175 contenant du MCK sans EGF (cf. Tableau 3). La culture est poursuivie jusqu'àensemencement des kératinocytes sans changer le milieu.

Culture des kératinocytes

Les kératinocytes sont décongelés, comptés etensemencés à 8000 cellules/cm² dans des T175 préalablement préparées de fibroblastes irradiés (cf. « Préparation des couches nourricières »). La culture des cellules est poursuivie jusqu'à confluence en changeant le milieu 3 fois par semaine (cf. Tableau 3).

Tableau 3 : Milieu de culture pour kératinocytes (MCK)

Composants	Fournisseurs	Concentrations
DMEM / HAM F12 (2 :1)	Gibco®	qsp
Sérum de veau fœtal	Hyclone	10 %
Hydrocortisone	Upjohn	0,4 µg/ml
Umuline	Lilly	0,12 UI/ml
Isuprel	Hospira	0,4 µg/ml
Adénine	Sigma	24,3 µg/ml
Tri Iodo Thyronine	Sigma	2 nM
EGF	Austral	10 ng/ml
	Biologicals	
Amphotéricine B	Bristol Myers Squibb	1 µg/ml
Pénicilline	PanPharma	100 UI/ml
Gentamycine	PanPharma	20 µg/ml

3.2.3) Préparation des peaux reconstruites

La peau reconstruite est générée en deux étapes successives :

- 1) La production d'un derme équivalent (DE), par ensemencement de fibroblastes avec ou sans ASCs, sur un substrat dermique ;
- 2) La culture de kératinocytes à la surface de ce DE.

3.2.3.1) Préparation du substrat dermique

Le substrat dermique, développé et breveté au LSC, est composé d'un mélange à base de collagène bovin de type I et III (72%), de glycosaminoglycanes (8%) réticulés par du chitosan (20%) et lyophilisé.

Ces matrices sont réhydratées sous hotte en les plongeant dans de l'alcool 70° stérile toute la nuit. Elles sont ensuite rincées 4 fois au PBS puis 3 fois au DMEM. Enfin, elles sont laissées à incuber dans du milieu DE (cf. Tableau 4) sans antibiotiques jusqu'à ensemencement, afin de les équilibrer et de vérifier leur stérilité.

3.2.3.2) Dermis équivalents (DE)

Une fois à confluence, les fibroblastes et les ASCs cultivés séparément sont décollés avec de la trypsine-EDTA (0,05%-2%, Fournisseur : Gibco®), comptés puis ensemencés sur les matrices selon le plan suivant :

- une suspension cellulaire pure de **fibroblastes jeunes** dans du milieu DE ;
- une suspension cellulaire pure de **fibroblastes âgés** dans du milieu DE ;

- une suspension cellulaire contenant **25% d'ASCs** et **75% de fibroblastes jeunes** dans du milieu DE ;
- une suspension cellulaire contenant **25% d'ASCs** et **75% de fibroblastes âgés** dans du milieu DE.

Les cellules sontensemencées à 250 000 cellules/cm² sur chaque matrice correspondante dans 3 ml de milieu DE. Le milieu de chaque DE est renouvelé tous les jours jusqu'à ensemencement des kératinocytes.

Tableau 4 : Milieu Derme Equivalent (DE)

Composants	Fournisseurs	Concentrations
DMEM	Gibco®	qsp
Sérum de veau fœtal	Hyclone	10 %
bFGF (extemporanément)	Miltenyi	10 ng/ml
Pénicilline	PanPharma	100 UI/ml
Gentamycine	PanPharma	20 µg/ml
Amphotéricine B	Bristol Myers Squibb	1 µg/ml
Vitamine C (extemporanément)	Bayer	50 µg/ml

3.2.3.3) Peaux reconstruites (PR)

La culture des PR comporte deux étapes :

1) Culture des PR en immersion

A confluence, les kératinocytes sont trypsinés (trypsine-EDTA 0,05%-2%, Fournisseur : Gibco®) et comptés, puis une suspension cellulaire pure de chaque souche est resuspendue dans du milieu PR (cf. Tableau 5).

Le milieu de culture DE est aspiré et les kératinocytes sontensemencés à 250 000 cellules/cm²/PR. A partir de cette étape, la culture se poursuit en boîtes de Pétri à raison de 6 PR par boîte. Pour chaque PR, 3 ml/jour de milieu PR (cf. Tableau 5) est nécessaire afin que les PR soient totalement immergées dans le milieu ; soit pour une boîte contenant 6 PR, 36 ml (6 peaux x 3ml x 2 jours) de milieu.

La culture est poursuivie ainsi pendant 1 semaine, en changeant le milieu tous les 2 jours.

Tableau 5 : Milieu Peaux Reconstituées (PR)

Composants	Fournisseurs	Concentrations
DMEM / HAM F12 (2 :1)	Gibco®	qsp
Sérum de veau fœtal	Hyclone	10 %
Hydrocortisone	Upjohn	0,4 µg/ml
Umuline	Lilly	0,12 UI/ml
Isuprel	Hospira	0,4 µg/ml
Adénine	Sigma	24,3 µg/ml
Tri Iodo Thyronine	Sigma	2 nM
EGF (extemporanément)	Austral	10 ng/ml
	Biologicals	
Amphotéricine B	Bristol Myers Squibb	1 µg/ml
Pénicilline	PanPharma	100 UI/ml
Gentamycine	PanPharma	20 µg/ml
Vitamine C (extemporanément)	Bayer	50 µg/ml

2) Culture des PR à l'interface air/liquide (A/L)

Après une semaine d'immersion, les PR sont mises en culture en interface air/liquide dans le milieu A/L (cf. Tableau 6) pour favoriser la différenciation terminale des kératinocytes. La culture est poursuivie ainsi pendant 2 semaines en changeant le milieu 3 fois par semaine.

Tableau 6 : Milieu Air/Liquide (A/L)

Composants	Fournisseurs	Concentrations
DMEM / HAM F12 (2 :1)	Gibco®	qsp
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma	8 mg/ml
Hydrocortisone	Upjohn	0,4 µg/ml
Umuline	Lilly	0,12 UI/ml
Amphotéricine B	Bristol Myers Squibb	1 µg/ml
Pénicilline	PanPharma	100 UI/ml
Gentamycine	PanPharma	20 µg/ml
Vitamine C (extemporanément)	Bayer	50 µg/ml

3.2.4) Analyse du sécrétome (étape 2 uniquement)

Afin d'analyser le sécrétome, le milieu de culture est récolté et congelé (à -80°C) aux étapes clés décrites ci-dessous :

- 1) A la fin de la culture en monocouches des fibroblastes et des ASCs ;
- 2) A l'étape de derme équivalent, avant l'ensemencement des kératinocytes ;
- 3) Durant la phase de culture à l'interface air/liquide.

24h avant de récolter le milieu, des milieux appauvris en sérum (0,1% de sérum au lieu de 10%) sont utilisés pour les cultures en monocouche et en 3D (sauf pour le milieu A/L qui ne contient pas de sérum (cf. Tableau 6)), afin que les protéines du sérum contenu dans les milieux de culture n'interfèrent pas avec les résultats d'analyse du sécrétome (risque de créer un bruit de fond trop important pour pouvoir observer un effet des ASCs).

Au stade monocouche, pour éviter que ce changement de milieu ait un impact sur la culture des DE puis des PR, les flasques (monocouches), qui ont servi à la récolte du milieu, ne servent pas à l'ensemencement des matrices.

En revanche, au stade DE, tous les DE sont cultivés pendant 24h en milieu appauvri en sérum puis, après prélèvement du surnageant, sont utilisés pour la suite de la culture. Pour vérifier l'absence d'impact de ce changement de milieu sur la survie des

cellules, nous procédons à un contrôle sur monocouches de fibroblastes ou d'ASCs et observons qu'il n'y a pas d'altération de la viabilité, de la morphologie et de la croissance des cellules.

3.2.5) Analyses

3.2.5.1) Analyses histologiques

A la fin de la culture des PR, 3 échantillons de chaque condition sont coupés en 2.

Une moitié est incluse en *Tissu Teck* puis congelée (elle ne servira qu'aux analyses immunohistologiques futures, non utilisées ici).

L'autre moitié est fixée dans du *paraformaldéhyde 4%* pendant 24h. Après déshydratation, ce prélèvement est transféré dans un bain de paraffine liquide à 60°C avant d'être inclus dans un bloc de paraffine à température ambiante. Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont effectuées à l'aide d'un microtome *LEITZ 1512* puis sont déposées sur des lames *Superfrost® Plus (Thermo Scientific)* et incubées pendant 24h dans une étuve sèche.

Afin d'observer les lames au microscope, nous effectuons une coloration Hématoxyline-Phloxine-Safran (HPS) : les coupes sont déparaffinées puis colorées au laboratoire d'Anatomo-Pathologie des HCL. Cette coloration permet de visualiser les cellules dans leur environnement tissulaire :

- l'hématoxyline est un composé basique qui colore les noyaux des cellules en bleu ;
- la phloxine est un colorant acide qui teinte le cytoplasme en rose ;
- le safran colore sélectivement les fibres conjonctives en orangé.

Ces différentes étapes sont automatisées (VARISTAN 24-4 de SHANDON). Les coupes sont à nouveau déshydratées puis montées entre lame et lamelle.

Après coloration, l'observation est réalisée au microscope sous lumière blanche et les coupes sont photographiées à l'aide d'un système microscope / caméra (ELIPSE 50i (Nikon, France) / DSU1 (Nikon, France)) et d'un logiciel de traitement d'images (NIS-Elements (France)).

3.2.5.2) Analyses immunohistologiques (étape 2 uniquement)

L'immunohistologie permet d'observer l'expression de différents marqueurs exprimés par les cellules grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre ces marqueurs. Ainsi, nous cherchons à mettre en évidence la kératine 14 (K14) qui est un marqueur des kératinocytes de la couche basale de l'épiderme.

Là encore, les peaux préalablement incluses dans la paraffine sont coupées à l'aide d'un microtome *LEITZ 1512* puis sont déposées sur des lames *Superfrost® Plus (Thermo Scientific)* et incubée pendant 24h dans une étuve sèche.

Ensuite, les coupes sont déparaffinées par une succession de bains de 5 minutes (methylcyclohexane (3 fois), éthanol 100°, éthanol 95° et éthanol 70°) puis les lames sont rincées à l'eau courante pendant au moins 30 minutes afin de réhydrater les coupes.

Le démasquage des sites antigéniques est réalisé par un traitement au citrate bouillant pendant 10 minutes.

Une étape de saturation est réalisée avec une solution de PBS/BSA4%/NGS5% pendant 1 heure.

Puis, l'anticorps primaire anti-K14 (Novocastra), dilué au 200^{ème} dans une solution de PBS/BSA4%/NGS5%, est déposé sur les lames et incubé pendant une nuit à + 4°C dans une chambre humide et obscure. L'anticorps primaire utilisé est un anticorps murin. Sur le témoin négatif est déposé un IgG (à la place de l'anticorps primaire) dilué dans une solution de PBS/BSA4%/NGS5%.

Suite à cela, l'excès d'anticorps est éliminé par 3 bains de 5 minutes dans du PBS. La solution de PBS/BSA4%/NGS5%, dans laquelle sont dilués l'anticorps secondaire et le réactif de Hoechst (marquant l'ADN des noyaux) au 1000^{ème}, est alors déposée sur les coupes et laissée incubé pendant 1 heure à température ambiante en chambre humide et obscure. L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps anti-souris produit chez la chèvre (Life Technologies).

L'excès d'anticorps secondaires est éliminé par un rinçage de 3 bains de 5 minutes dans du PBS. Enfin le montage des lames est réalisé à l'aide d'un milieu de montage (*Fluorescence Mounting Medium*, Dako). Les lames doivent impérativement être conservées à l'abri de la lumière afin de préserver la fluorescence émise par le fluorochrome couplé à l'anticorps secondaire.

Après séchage, les lames peuvent être observées au microscope et les coupes photographiées à l'aide d'un système microscope / caméra (ELIPSE 50i (Nikon, France) / DSU1 (Nikon, France)) et d'un logiciel de traitement d'images (NIS-Elements (France)).

Les sites marqués apparaissent de la couleur de la longueur d'onde dans laquelle émet le fluorochrome à savoir : les kératinocytes basaux marqués par la kératine 14 en vert, et les noyaux marqués par le réactif de Hoechst en bleu.

3.2.5.3) Analyses transcriptomiques (étape 2 uniquement)

A la fin de la culture des PR, les prélèvements nécessaires à l'analyse transcriptomique sont placés dans du *RNAlater*. Cette analyse transcriptomique (ARN) est prévue sur 3 morceaux de peau de chaque condition : analyse de l'ARN total (3 moitiés d'échantillon) et des ARN de l'épiderme et du derme (3 moitiés d'échantillon). Après analyse des résultats histologiques (cf. « 3.2) Résultats »), nous avons décidé de ne pas réaliser d'analyses transcriptomiques.

3.2.5.4) Analyses protéomiques (étape 2 uniquement)

Les milieux de culture récoltés et congelés à -80°C (Cf. « 3.1.4) Analyse du sécrétome (étape 2 uniquement) ») seront envoyés au CEA (Commissariat à l'Energie Atomique et aux énergies alternatives) de Grenoble pour analyse du sécrétome par spectrométrie de masse.

3.2.6) Protocole

LSC/BTC	PROTOCOLE Version 0
REDIGE PAR : E. Métral et S. Cade	APPROUVE PAR : O. Damour

ETUDE DE L'EFFET DE L'INCORPORATION INTRADERMIQUE D'ASCs DANS UN MODELE 3D DE VIEILLISSEMENT CUTANE

Données d'entrées

Dans cette étude, nous souhaitons tester la reproductibilité des effets des ASCs observés au niveau cutané sur le modèle de sénescence *in vitro* (expérience précédemment réalisée au laboratoire) en utilisant 2 autres souches d'ASCs (souche d'ASCs n°1 pour l'étape 1 et souche d'ASCs n°2 pour l'étape 2). De plus, nous voulons voir si l'impact de l'introduction des ASCs est retrouvé dans le modèle de peaux reconstruites « âgées ». Ainsi, des ASCs sont incorporées dans des dermes équivalents de PR obtenus avec des cellules âgées ou des cellules jeunes (fibroblastes et kératinocytes). Nous pouvons donc comparer différents modèles :

- fibroblastes jeunes et kératinocytes jeunes avec ou sans ASCs ;
- fibroblastes âgés et kératinocytes jeunes avec ou sans ASCs ;
- fibroblastes jeunes et kératinocytes âgés avec ou sans ASCs ;
- fibroblastes âgés et kératinocytes âgés avec ou sans ASCs.

Données de sortie

S'ils devaient confirmer les résultats préliminaires, les résultats « attendus » seraient que l'ajout d'ASCs au DE de nos PR, préparées avec des cellules jeunes, devrait contrecarrer les effets du vieillissement en augmentant l'épaisseur de l'épiderme et du derme, ainsi que la différenciation cellulaire. De plus, pour qu'un effet sur les peaux reconstruites « âgées » soit mis en évidence, l'introduction d'ASCs au niveau des DE de PR préparées avec des cellules âgées devrait permettre aux PR de retrouver un aspect se rapprochant de celui de PR préparées avec des cellules jeunes.

3.2.6.1) *ETAPE 1 : Confirmer l'effet des ASCs au niveau cutané avec la « souche d'ASCs n°1 » / Observer l'effet de ces ASCs sur nos modèles de peaux « âgées »*

CELLULES

Tableau 7 : Cellules utilisées pour l'étape 1

Cellules	Souche	Décongélation	Utilisation PR
Kératinocytes jeunes (donneur : 2 ans)	CW12023KP	P3	P5
Kératinocytes âgés (donneur : 53 ans)	PSK04063	P3	P5
Fibroblastes jeunes (donneur : 2 ans)	CW12023FP	P6	P8
Fibroblastes âgés (donneur : 53 ans)	PSF04008	P3	P5
ASCs n°1 (donneur : 34 ans, IMC : 24,7)	CY13025 GA	P3	P5
Fibroblastes irradiés	CW12023KPy	P8	

MILIEUX

Tableau 8 : Milieux de culture utilisés au cours de l'étape 1

Milieu	Période	Périodicité	Volume
Milieu de prolifération des fibroblastes	J-7 à J0	Changement 3 fois par semaine	Pour 9 T175 à raison de 20 ml par flasque : 540 ml
Milieu de prolifération des ASCs : milieu BFGF	J-7 à J0	Changement 3 fois par semaine	Pour 2 T175 à raison de 20 ml par flasque : 120 ml
Milieu derme équivalent	J0 à J21	Changement quotidien	Pour 3 plaques « 12 puits » à raison de 3 ml par puit : 2,268 l
Milieu de prolifération des kératinocytes	J7 à J21	Changement 3 fois par semaine	Pour 5 flasques à raison de 20 ml par flasque : 1,400 l
Milieu peau reconstruite Immersion	J21 à J28	Changement 1 fois tous les 2 jours	Pour 4 plaques « 6 puits » à raison de 7,5 ml par puit : 540 ml
Milieu Air/Liquide (A/L)	J28 à J42	Changement 3 fois par semaine	Pour 5 boîtes de Pétri avec 60 ml par boîte : 1,800 l

SUBSTRATS DERMQUES

Utilisation de matrice du lot 2BLD0012.

METHODOLOGIE DE CULTURE ET CONDITIONS OPERATOIRES

Temps de culture

Les peaux reconstruites sont cultivées pendant 42 jours. Les principales étapes sont récapitulées sur la figure 2 :

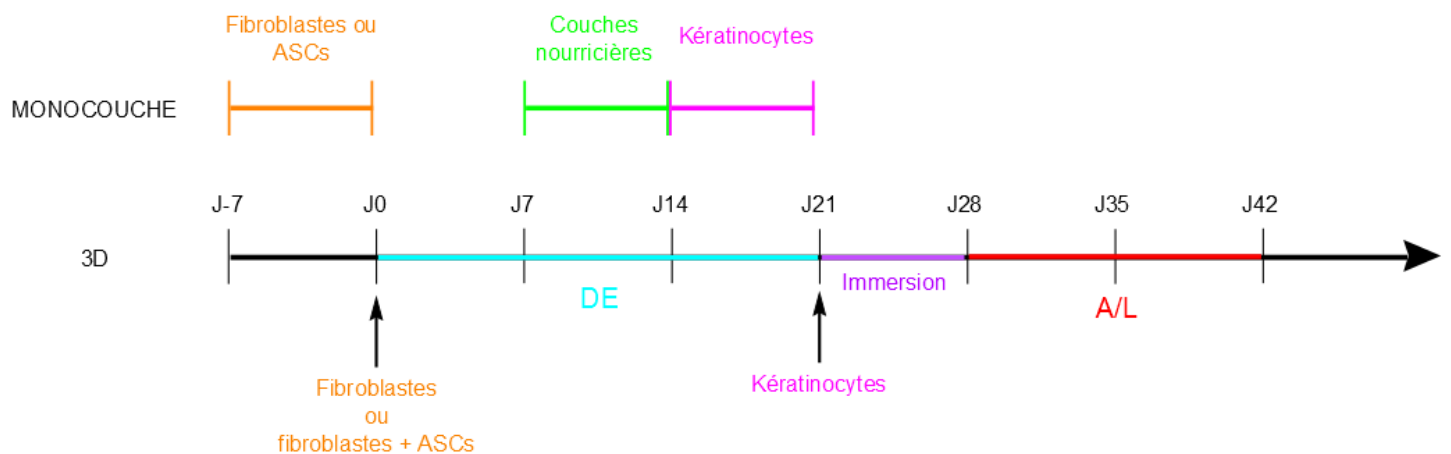


Figure 2 : Temps de culture (étape 1)

Méthodologie

Culture en monocouche













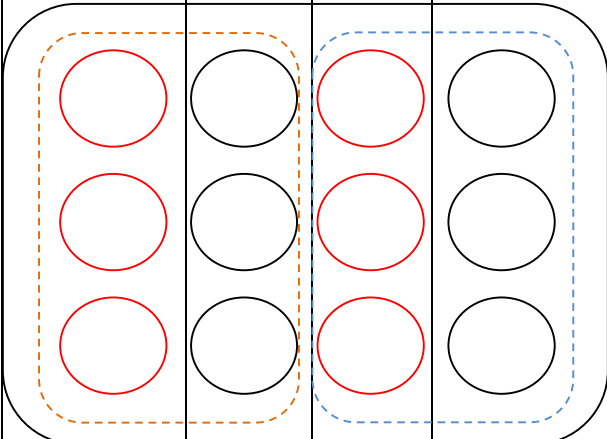
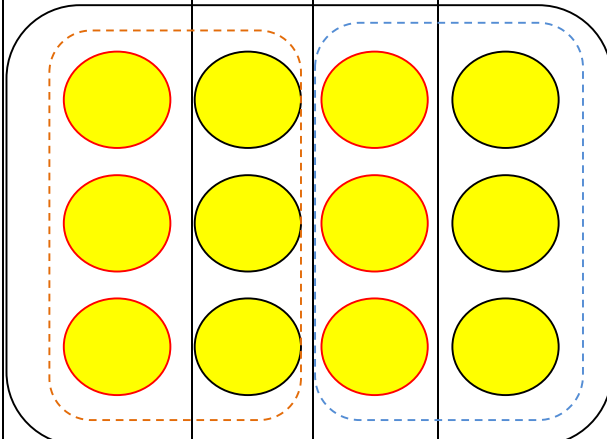
Lors de la culture en monocouche nous avons :

- 6 flasques de fibroblastes jeunes ;
- 3 flasques de fibroblastes âgés ;
- 2 flasques d'ASCs ;
- 3 flasques de kératinocytes jeunes sur couche nourricière ;
- 2 flasques de kératinocytes âgés sur couche nourricière.

Culture en immersion

Lors de la phase d’immersion (de J21 à J28) les peaux reconstruites sont cultivées comme présenté sur le tableau 9 :

Tableau 9 : Plan des plaques pour la culture en immersion (étape 1)

Sans ASCs				Avec ASCs			
				(25% des cellules du DE)			
Fibroblastes jeunes 	Fibroblastes âgés 	Fibroblastes jeunes 	Fibroblastes âgés 	Fibroblastes jeunes 	Fibroblastes âgés 	Fibroblastes jeunes 	Fibroblastes âgés 
Kératinocytes jeunes 		Kératinocytes âgés 		Kératinocytes jeunes 		Kératinocytes âgés 	
							

Nous avons une plaque supplémentaire pour le contrôle DE avec deux puits par condition.

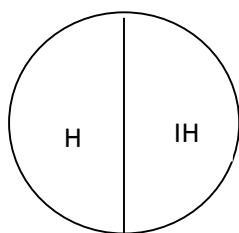
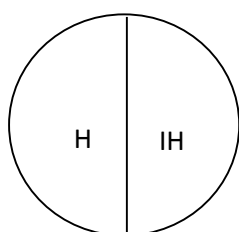
Au moment d'ensemencer les kératinocytes, nous passons en plaque « 6 puits ».

Culture à l'interface air/liquide

Pour le passage en phase d'émersion (de J28 à J42), les PR sont cultivées dans 5 boîtes de Pétri.

ANALYSES

Nous avons 3 échantillons par condition, ce qui nous permet de réaliser différentes analyses selon le schéma (figure 3) ci-dessous :



H : Analyses histologiques

IH : Analyses
immunohistologiques

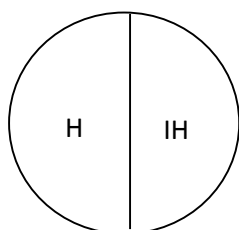


Figure 3 : Plan des analyses (étape 1)

Analyses histologiques

A J42, nous observons 3 échantillons au microscope après coloration HPS.

Analyses immunohistochimiques

Les analyses immunohistochimiques seront réalisées en fonction des résultats histologiques.

3.2.6.2) ETAPE 2 : Confirmer l'effet des ASCs au niveau cutané avec la « souche d'ASCs n°2 » / Observer l'effet de ces ASCs sur nos modèles de peaux « âgées »

Cette deuxième étape est la même que la première mais les ASCs utilisés sont issus d'un donneur différent.

Nous profitons de cette culture de PR « âgées » pour récolter le milieu de culture à différents stades. Cela nous permettra de faire une analyse comparative du sécrétome, entre les situations avec ou sans ASCs, par spectrométrie de masse. Ainsi, nous devrions mettre en évidence les facteurs impliqués dans les effets des ASCs sur le vieillissement cutané.

3.2.6.2.1) Interfaces techniques

CELLULES

Comme présenté dans le tableau 10, nous utilisons les mêmes souches que pour l'étape 1 à l'exception de :

- fibroblastes âgés : nous avons choisi des fibroblastes moins âgés que dans l'étape 1 ;
- ASCs : nous avons choisi une souche d'ASCs différente.

Tableau 10 : Cellules utilisées pour l'étape 2

Cellules	Souche	Décongélation	Utilisation PR	Besoins
Kératinocytes jeunes (donneur : 2 ans)	CW12023KP	P2	P4	30 M
Kératinocytes âgés (donneur : 53 ans)	PSK04063	P2	P4	30 M
Fibroblastes jeunes (donneur : 2 ans)	CW12023FP	P6	P8	24,5 M
Fibroblastes âgés (donneur : 44 ans)	PAF08052	P3	P5	24,5 M
ASCs n°2 (donneur : 30 ans, IMC : 27,1)	CAF0832GA	P0	P2	21 M
Fibroblastes irradiés	FP0123γ	P10		5,6 M

MILIEUX

Tableau 11 : Milieux de culture utilisés au cours de l'étape 2

Milieu	Période	Périodicité	Volume
Milieu de prolifération des fibroblastes	J-7 à J0	Changement 3 fois par semaine	Pour 10 T175 à raison de 20 ml par flasque : 600 ml
Milieu de prolifération des ASCs : milieu BFGF	J-7 à J0	Changement 3 fois par semaine	Pour 7 flasques à raison de 20 ml par flasque : 420 ml
Milieu de prolifération des ASCs appauvri en sérum	J-1 à J0	Une fois	Pour 5 flasque à raison de 20 ml par flasque : 100 ml
Milieu derme équivalent	J0 à J19 puis J20 à J21	Changement quotidien	Pour 6 plaques « 12 puits » à raison de 3 ml par puit : 4,320 l.
Milieu derme équivalent appauvri en sérum	J19 à J20	Changement quotidien	Pour 6 plaques « 12 puits » à raison de 3 ml par puit : 216 ml
Milieu de prolifération des kératinocytes	J7 à J21	Changement 3 fois par semaine	Pour 8 flasques à raison de 20 ml par flasque : 960 ml
Milieu peau reconstruite Immersion	J21 à J28	Changement tous les 2 jours	Pour 10 boîtes de Pétri à raison de 36 ml par boîte : 1440 ml
Milieu Air/Liquide (A/L)	J28 à J42	Changement 3 fois par semaine	Pour 10 boîtes de Pétri avec 60 ml par boîte : 3600 ml

SUBSTRATS DERMiques

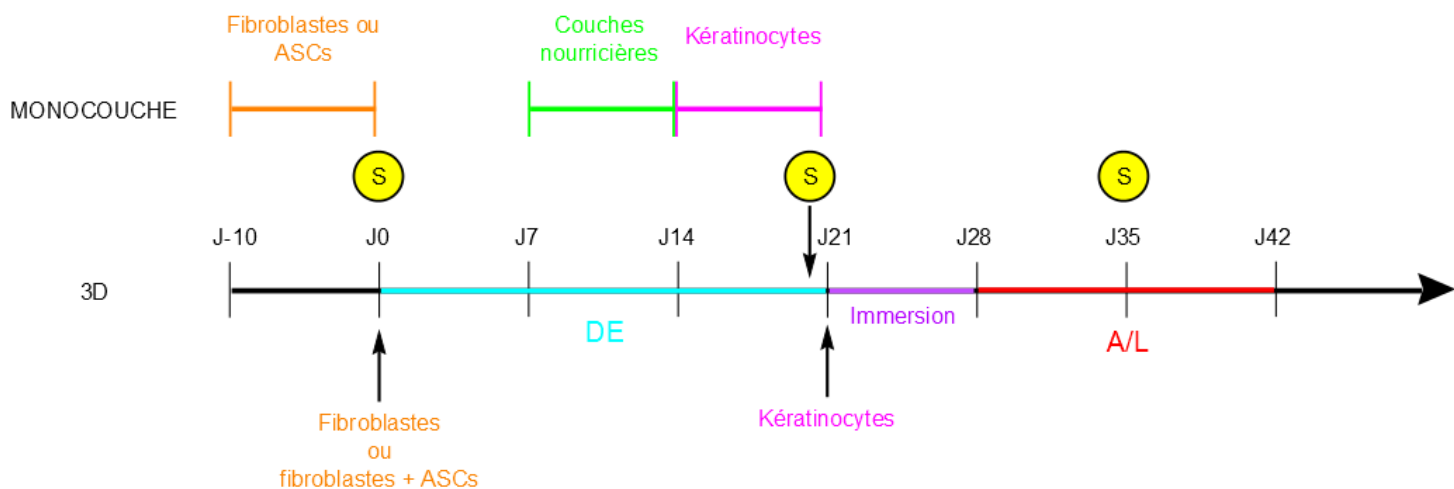
Utilisation de matrice du lot 2BLD0012.

METHODOLOGIE DE CULTURE ET CONDITIONS OPERATOIRES

Les peaux reconstruites (3D) sont réalisées dans 6 plaques « 12 puits » à partir de la matrice collagène-glycosaminoglycane-chitosane du laboratoire.

Temps de culture

Les principales étapes sont récapitulées sur la figure 4 :



S récolte et congélation du milieu de culture à -80°C pour doser le sécrétome

Figure 4 : Temps de culture (étape 2)

Méthodologie

Culture en monocouche pour analyse du sécrétome et amplification pour préparation des PR

Lors de la culture en monocouche nous avons :






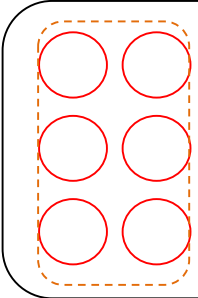
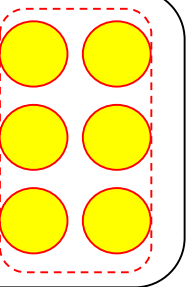
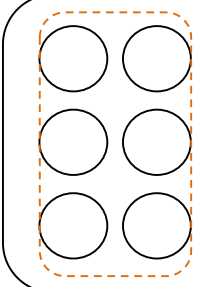
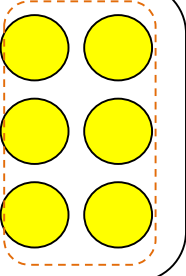

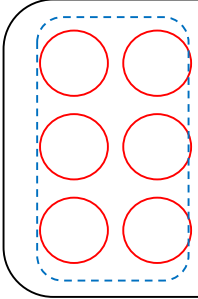
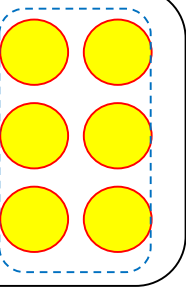
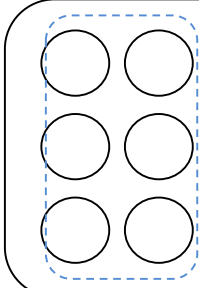
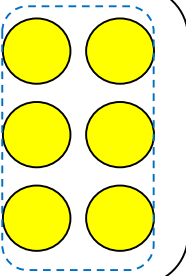
- 4 flasques de fibroblastes jeunes (qui serviront à l'ensemencement des matrices) + 1 flasque (pour doser le sécrétome) ;
- 1 flasque de fibroblastes jeunes + ASCs (pour doser le sécrétome) ;
- 4 flasques de fibroblastes âgés (qui serviront à l'ensemencement des matrices) + 1 flasque (pour doser le sécrétome) ;
- 1 flasque de fibroblastes âgés + ASCs (pour doser le sécrétome) ;

- 4 flasques d'ASCs seuls (qui serviront à l'ensemencement des matrices) + 1 flasque (pour doser le sécrétome) ;
- 4 flasques de kératinocytes jeunes sur couche nourricière (pour ensemer sur les DE) ;
- 4 flasques de kératinocytes âgés sur couche nourricière (pour ensemer sur les DE).

Culture en immersion

Lors de la phase d’immersion (de J21 à J28), les peaux reconstruites sont cultivées comme présenté sur le tableau 12 :

Tableau 12 : Plan des plaques pour la culture en immersion (étape 2)

	Fibroblastes jeunes 		Fibroblastes âgés 	
	Sans ASCs	Avec ASCs (25 %) 	Sans ASCs	Avec ASCs (25 %) 
Kératinocytes jeunes 				
Kératinocytes âgés 				

Nous avons 2 plaques supplémentaires pour les contrôles :

- 1 plaque pour le contrôle DE avec deux puits par condition ;
- 1 plaque où le DE n'est fait qu'avec des ASCs (100%) et où nous avons 6 puits avec des kératinocytes jeunes et 6 puits avec des kératinocytes âgés.

Au moment d'ensemencer les kératinocytes, nous passons en boîtes de Pétri.

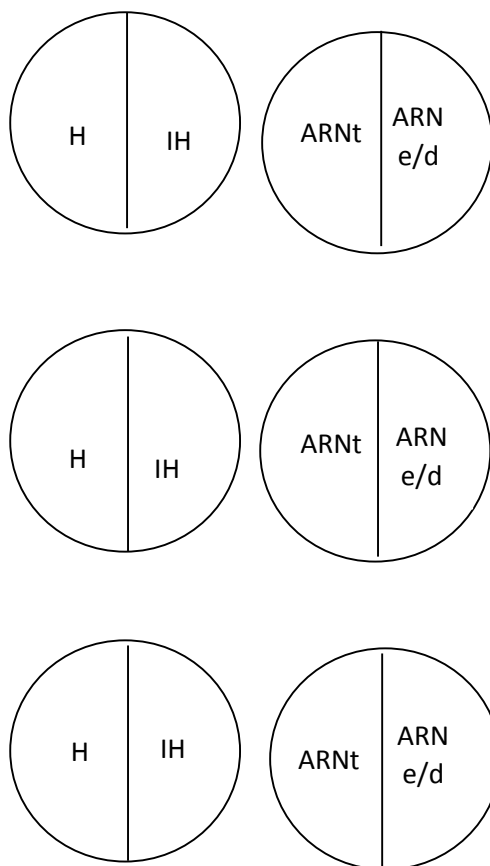
Culture à l'interface air/liquide

Pour le passage en phase d'émersion (de J28 à J42), les PR sont cultivées dans 10 boîtes de Pétri.

ANALYSES

Nous avons 6 échantillons par condition ce qui nous permet de réaliser différentes analyses (cf. figure 5) :

- 3 demi-échantillons pour les analyses histologiques ;
- 3 demi-échantillons pour les analyses immunohistologiques ;
- 3 demi-échantillons pour l'analyse transcriptomique de l'ARN total ;
- 3 demi-échantillons pour l'analyse transcriptomique de l'ARN épidermique d'une part et dermique d'autre part.



H : Analyses histologiques

IH : Analyses immunohistologiques

ARNt : Analyse transcriptomique de l'ARN total

ARNe/d : Analyse transcriptomique des ARN de l'épiderme et du derme

Figure 5 : Plan des analyses (étape 2)

Traitement des échantillons

A J42, selon les analyses, les échantillons de chaque condition sont traités comme suit :

- Analyses histologiques

Observation de 3 échantillons au microscope après coloration.

- Analyses immunohistochimiques

Les analyses immunohistochimiques seront réalisées en fonction des résultats histologiques.

- Analyses transcriptomiques

Les analyses transcriptomiques seront réalisées en fonction des résultats histologiques.

Analyses protéomiques :

Sur les 42 jours de culture, le milieu de culture (avec 0,1% de sérum) est récolté et congelé (à -80°C) aux étapes clés suivantes afin de doser le sécrétome :

- à J0 : à la fin de la culture des ASCs, des fibroblastes (jeunes et âgés) et du mélange ASCs/fibroblastes en monocouches ;
- à J20 : sur le derme équivalent, un jour avant l'ensemencement des kératinocytes ;
- à J35 : durant la culture à l'interface air/liquide.

A J-1 et J19 (24h avant de récolter le milieu), il ne faut pas oublier de changer le milieu de culture et d'utiliser du milieu appauvri en sérum (avec seulement 0,1% de sérum).

Nous enverrons ces milieux récoltés au CEA de Grenoble pour analyse du sécrétome.

3.2.6.2.2) Interfaces organisationnelles

Tableau 13 : Planning prévisionnel

	Date	Etape	Acteurs
J-10	Lundi 12 janvier 2015	<p>Décongélation des fibroblastes (jeunes et âgés) et des ASCs.</p> <p>Ensemencement pour amplification dans les 5 conditions :</p> <ul style="list-style-type: none"> - fibroblastes jeunes seuls ; - fibroblastes jeunes avec ASCs ; - fibroblastes âgés seuls ; - fibroblastes âgés avec ASCs ; - ASCs seuls. 	EM + SRC
J-2	Mardi 20 janvier 2015	Préparation des matrices dans de l'alcool stérile : 6 plaques « 12 puits ».	EM + SRC
J-1	Mercredi 21 janvier 2015	<p>Rinçage des matrices au PBS.</p> <p>Rinçage des matrices au DMEM.</p> <p>Equilibrage des matrices avec DMEM/SV.</p> <p>Préparation du milieu DEA (sans ATB).</p> <p>Changement de milieu des fibroblastes, des ASCs et des mélanges ASCs/fibroblastes qui serviront au dosage du sécrétome avec milieu ASCs avec 0,1% de sérum.</p>	EM + SRC
J0	Jeudi 22 janvier 2015	<p>Récolte des milieux des fibroblastes, des ASCs et des mélanges ASCs/fibroblastes pour dosage du sécrétome, congélation des milieux à -80°C.</p> <p>Trypsination, comptage et ré-ensemencement des fibroblastes et des ASCs ayant servi à doser le sécrétome (1 jour avec 0,1% de sérum).</p> <p>Trypsination des fibroblastes et des ASCs et ensemencement sur matrice (DE) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - fibroblastes jeunes seuls ; - fibroblastes jeunes seuls (75%) + ASCs seuls (25%) ; - fibroblastes âgés seuls ; - fibroblastes âgés seuls (75%) + ASCs seuls (25%) ; - ASCs seuls. 	EM + SRC

J7	Jeudi 29 janvier 2015	Décongélation et ensemencement des couches nourricières.	SRC
J11	Lundi 2 février 2015	Trypsination et comptage des ASCs et des fibroblastes en monocouche qui avaient été ré-ensemencés à J0 après avoir servi à doser le sécrétome.	SRC
J14	Jeudi 5 février 2015	Décongélation et ensemencement des kératinocytes sur les couches nourricières.	SRC
J18	Lundi 9 février 2015	Contrôle du derme équivalent.	SRC
J19	Mardi 10 février 2015	Changement de milieu DE (avec 0,1% de sérum) + vitamine C + EGF.	SRC
J20	Mercredi 11 février 2015	Récolte des milieux des DE, centrifugation et congélation à -80°C.	SRC
J21	Jeudi 12 février 2015	Trypsination des kératinocytes et ensemencement sur la matrice (DE) avec milieu PR selon les résultats des contrôles DE.	EM + SRC
J28	Jeudi 19 février 2015	Elévation à l'interface air/liquide avec milieu A/L.	EM + SRC
J34	Mercredi 25 février 2015	Changement de milieu A/L (avec 0,1% de sérum) + vitamine C	SRC
J35	Jeudi 26 février 2015	Récolte des milieux des PR et congélation à -80°C. Changement de milieu A/L + vitamine C.	SRC
J42	Jeudi 5 mars 2015	Arrêt de la culture.	EM + SRC
J42 et +		Analyses histologiques, protéomiques et transcriptomiques.	EM + SRC

3.3) Résultats

3.3.1) Etape 1

La figure 6 montre les résultats histologiques des PR préparées avec des cellules cutanées de donneurs de différents âges avec ou sans ASCs (souche d'ASCs n°1) à 42 jours de culture.

Nous observons que l'ajout de 25% d'ASCs aux fibroblastes jeunes apporte un aspect morphologiquement amélioré par rapport aux conditions sans ASCs (pour une densité finale du DE identique) quel que soit l'âge des kératinocytes.

En effet, l'ajout d'ASCs a permis d'obtenir un épiderme plus épais et bien différencié avec une conservation de l'homéostasie. Les cellules de la couche basale apparaissent palissadiques. De plus, la différenciation terminale est obtenue : couche granuleuse et couche cornée développées. Si nous comparons ces conditions avec ASCs aux conditions sans ASCs, pour des kératinocytes du même âge, nous constatons qu'en absence d'ASCs les cellules basales sont plus grosses et la couche cornée absente.

Au niveau du derme, l'analyse histologique de l'ajout d'ASCs ne permet pas de mettre en évidence des différences en terme de quantité de matrice extracellulaire sécrétée.

Pour les PR préparées avec les fibroblastes âgés, la MEC néosynthétisée est moins dense que pour les PR préparées avec des fibroblastes jeunes. Par conséquent, les kératinocytes tombent dans les pores du substrat dermique insuffisamment comblés. Si l'ajout d'ASCs aux dermes des PR préparées avec les fibroblastes âgés semble limiter la chute des kératinocytes dans la partie dermique, il ne l'empêche pas totalement. Ce biais empêche de mesurer l'impact sur l'épaisseur de l'épiderme.

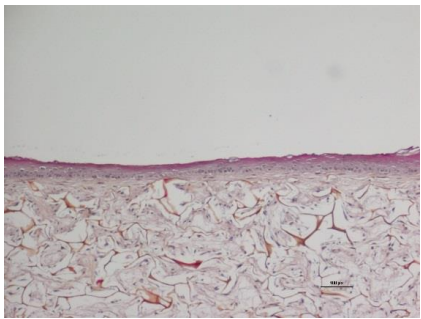
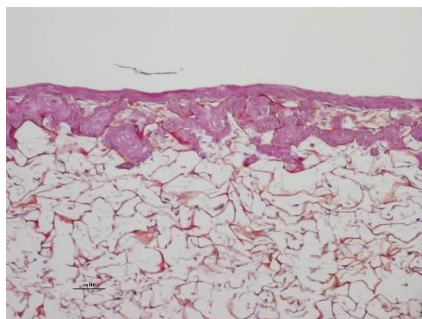
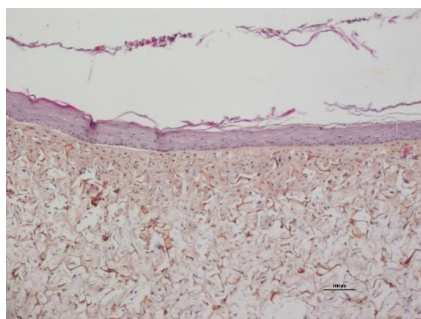
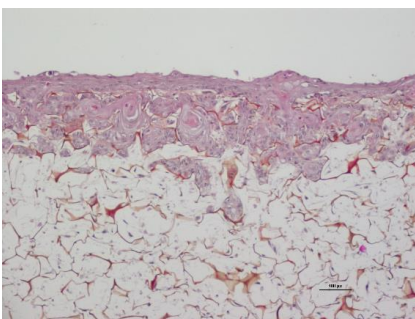
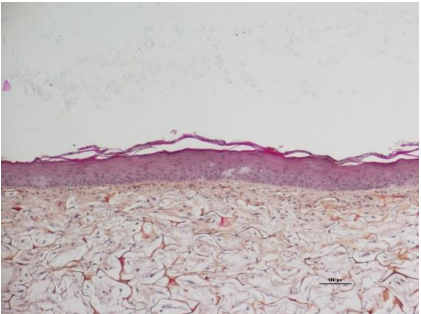
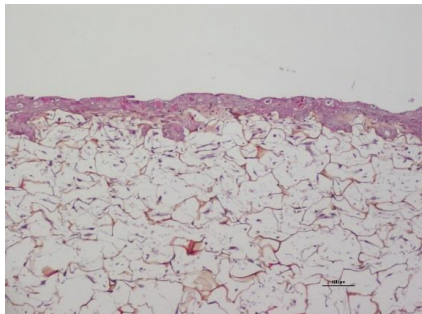
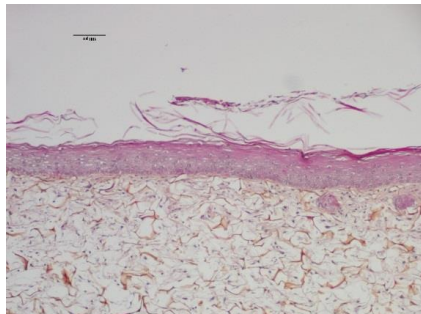
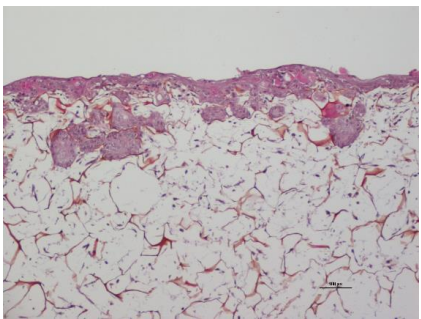
	Fibroblastes jeunes + kératinocytes jeunes	Fibroblastes âgés + kératinocytes jeunes	Fibroblastes jeunes + kératinocytes âgés	Fibroblastes âgés + kératinocytes âgés
Sans ASCs n°1 (grossi ssemen t x10)				
Avec ASCs n°1 (grossi ssemen t x10)				

Figure 6 : Résultats histologiques – J42 – Etape 1

3.3.2) Etape 2

La figure 7 montre les résultats histologiques des PR « contrôles », dont les dermes ont été préparés avec uniquement des ASCs (souche d'ASCs n°2) ou uniquement des fibroblastes jeunes et épidermisés avec des kératinocytes jeunes ou âgés, au bout de 42 jours de culture.

L'analyse des PR, dont le derme est constitué uniquement d'ASCs, montre que, même si les ASCs migrent, prolifèrent et sécrètent de la MEC, cette dernière est insuffisante pour obtenir un épiderme organisé, pluristratifié et différencié. De plus, grâce au marquage des kératinocytes basaux à la kératine 14 (cf. Figure 8), nous avons mis en évidence la chute des kératinocytes (jeunes ou âgés) dans le substrat dermique non suffisamment rempli.

Par ailleurs, si l'on s'intéresse aux PR dont le derme est composé de fibroblastes jeunes sans ASCs, nous observons une matrice extracellulaire dense qui évite cette chute et permet le développement d'un épiderme pluristratifié, différencié et bien ancré au DE. Cette analyse ne met pas en évidence de différence significative selon l'âge des kératinocytes.

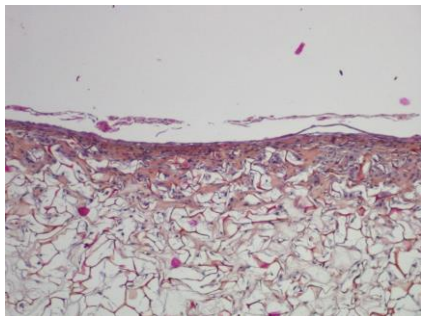
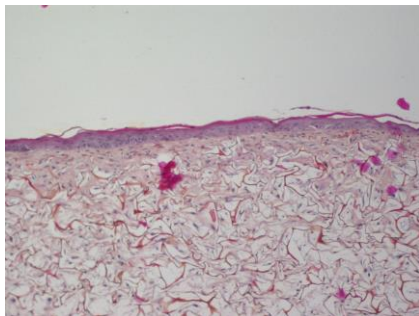
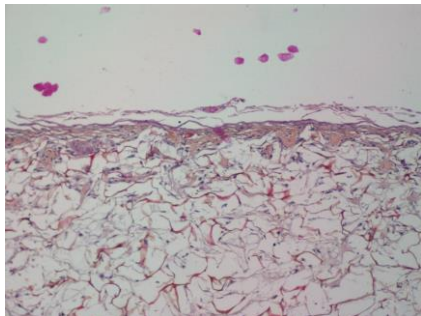
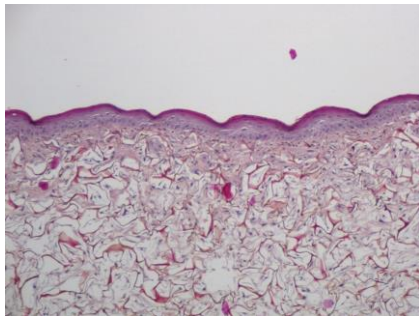
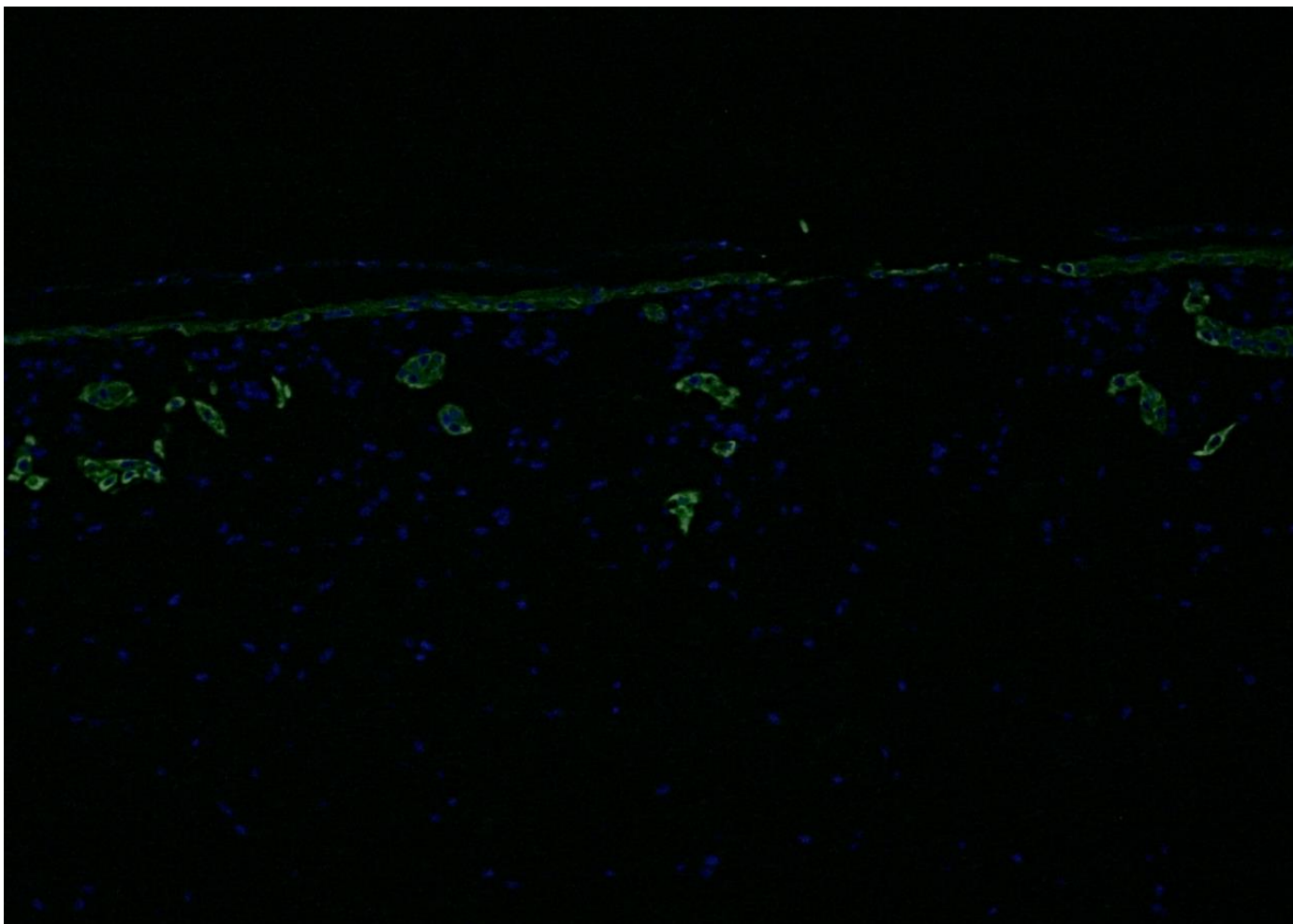
	Derme constitué uniquement d'ASCs n°2 (grossissement x10)	Derme constitué uniquement de fibroblastes jeunes (grossissement x10)
Kératinocytes jeunes		
Kératinocytes âgés		

Figure 7 : Résultats histologiques – Contrôles – J42 – Etape 2



*Figure 8 : Marquage immunofluorescent des kératinocytes basaux à la kératine 14 – Contrôles – J42 –
Etape 2 – Grossissement x10*

La figure 9 montre les résultats histologiques des PR préparées avec des fibroblastes et des kératinocytes de donneurs de différents âges, avec ou sans ASCs (souche d'ASCs n°2), au bout de 42 jours de culture.

Avec cette souche d'ASCs, nous sommes surpris d'observer que, même avec les fibroblastes jeunes, l'apport d'ASCs n'a pas donné d'amélioration contrairement aux deux autres expérimentations. En effet, dans les conditions où nous avons ajouté des ASCs aux fibroblastes jeunes, l'épiderme apparaît plus fin et non-différencié (kératinocytes jeunes) ou moins différencié (kératinocytes âgés) que dans les conditions sans ASCs.

Leur ajout aux fibroblastes âgés conduit à une matrice extracellulaire si pauvre que de nombreux kératinocytes ont pénétré dans le derme alors que cette chute n'est pas présente sans ASCs. Cependant, malgré cette pénétration, un épiderme plus épais est obtenu en ajoutant des ASCs aux fibroblastes âgés des DE des PR.

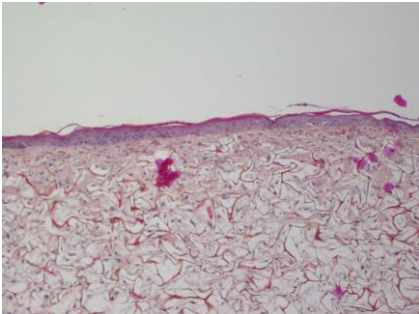
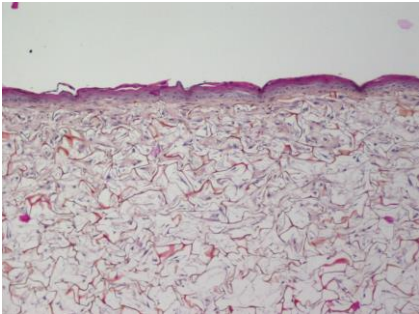
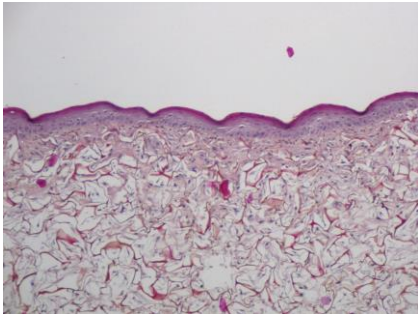
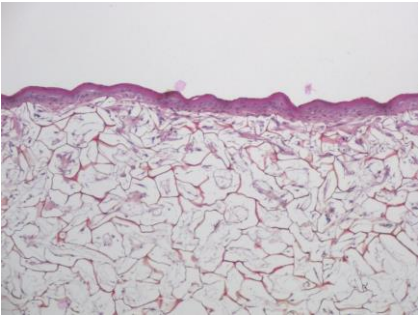
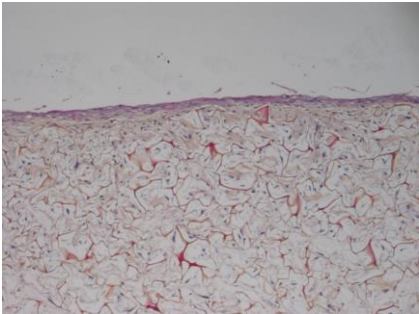
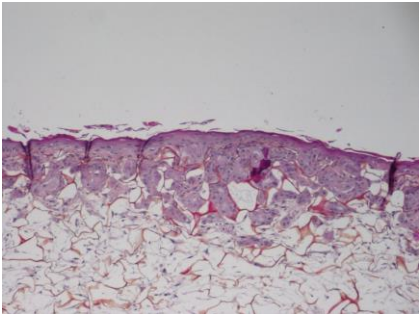
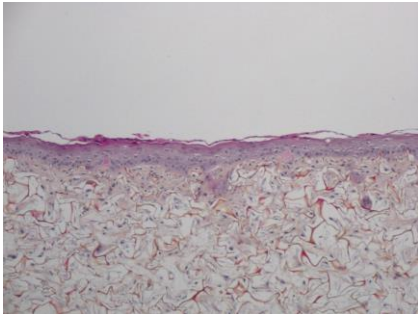
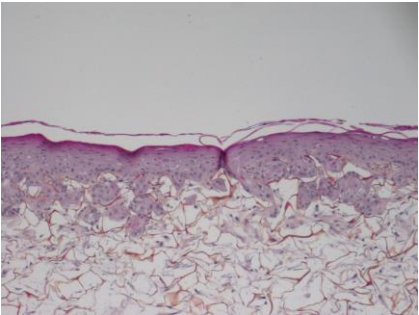
	Fibroblastes jeunes + kératinocytes jeunes	Fibroblastes âgés + kératinocytes jeunes	Fibroblastes jeunes + kératinocytes âgés	Fibroblastes âgés + kératinocytes âgés
Sans ASCs n°2 (grossissement *10)				
Avec ASCs n°2 (grossissement *10)				

Figure 9 : Résultats histologiques – J42 – Etape 2

3.4) Discussion

Pour étudier le vieillissement cutané, le LSC a développé deux modèles à partir du modèle de peau reconstruite en éponge collagène-glycosaminoglycane-chitosan :

- le **modèle de sénescence *in vitro*** : cinétique longue (culture de 42 à 120 jours) de peaux reconstruites réalisées à partir de fibroblastes et kératinocytes issus de patients jeunes ;
- le **modèle de peaux reconstruites « âgées »** réalisées à partir de kératinocytes et de fibroblastes issus de patients âgés, comparé avec des peaux reconstruites préparées avec des fibroblastes jeunes [7].

Le but de cette étude est de confirmer l'effet des ASCs observés sur le modèle de sénescence *in vitro* (expérience précédemment réalisée au laboratoire [27]) et de démontrer la reproductibilité des effets de différentes souches d'ASCs sur les cellules cutanées. Pour cela, nous avons utilisé le modèle de PR « âgées » en incorporant les ASCs dans des PR préparées avec différentes combinaisons de fibroblastes et de kératinocytes jeunes *versus* âgés. De plus, nous voulions voir si l'impact de l'introduction des ASCs était retrouvé dans ce modèle de PR « âgées ». Les deux souches d'ASCs choisies pour ce travail sont issues de donneurs d'âge et d'indice de masse corporelle proches de ceux des donneurs des ASCs utilisés pour l'étude sur le modèle de sénescence *in vitro* [27].

Les résultats attendus seraient que l'ajout d'ASCs aux fibroblastes jeunes devrait contrecarrer les effets du vieillissement. Ainsi, histologiquement, nous devrions voir une augmentation de l'épaisseur, de l'organisation et de la différenciation de l'épiderme ainsi que la stimulation de la synthèse de MEC du derme. Sur les peaux reconstruites préparées avec des fibroblastes âgés, l'effet positif des ASCs serait de retrouver un aspect se rapprochant de celui de PR préparées avec des cellules jeunes c'est-à-dire stimulant la synthèse de MEC des fibroblastes âgés connue pour être insuffisante [28]. La chute des kératinocytes dans les pores du substrat dermique (désormais bouchés) ne devrait ainsi plus avoir lieu.

Nos résultats montrent que :

- **Avec des fibroblastes jeunes** épidermisés avec des kératinocytes jeunes ou âgés, l'effet des ASCs sur les PR préparées varie selon l'origine des ASCs (variabilité interindividuelle des donneurs).

En effet, si l'on regroupe les résultats de l'étude préliminaire (modèle de sénescence *in vitro*) [27], de l'étape 1 et de l'étape 2, nous observons leur effet bénéfique sur l'épiderme pour deux souches d'ASCs sur trois.

Ainsi, pour deux souches d'ASCs, leur ajout aux fibroblastes jeunes donne un épiderme plus épais et plus différencié grâce à un derme rempli par une matrice extracellulaire plus dense.

Par contre, avec la troisième souche, l'épiderme apparaît plus fin et moins différencié et aucun effet sur le derme n'est visible en histologie. Quelles que soient les combinaisons, la MEC néosynthétisée est suffisante pour éviter la chute des kératinocytes dans le derme.

Pour vérifier l'hypothèse de la variabilité interindividuelle des ASCs il ne faudrait faire varier qu'un seul paramètre : l'identité des souches d'ASCs. L'idée serait de comparer des souches d'ASCs de différents donneurs (souches d'ASCs n'ayant pas donné les résultats attendus d'une part, et souches d'ASCs ayant donné les effets attendus d'autre part) tout en utilisant les mêmes souches de kératinocytes jeunes et de fibroblastes jeunes validés pour donner de belles PR.

En analysant les « contrôles » de l'étape 2, nous avons constaté que, dans les situations où le derme des PR était constitué uniquement d'ASCs, la matrice extracellulaire n'était pas assez dense pour boucher les pores du substrat dermique d'où une chute de l'épiderme dans la partie dermique. Ces ASCs n'ayant pas donné les résultats attendus avec les fibroblastes jeunes, il est possible que ce mauvais résultat soit inhérent à cette souche. Le problème est que, ce contrôle n'étant pas systématique, nous ne pouvons relier la morphologie de cette PR avec la souche. Nous proposons donc d'ensemencer des ASCs qui ont eu des effets bénéfiques lorsqu'ils étaient ajoutés aux DE de PR (ASCs utilisés lors de l'étape 1 par exemple) et de les cultiver seuls avec des kératinocytes validés pour la préparation de PR cultivées.

- **Avec des fibroblastes âgés**, sur les deux expérimentations effectuées dans ce travail, les résultats semblent âge-dépendants.

En effet, avec des fibroblastes du donneur le plus vieux (53 ans), la MEC insuffisante, en absence ou en présence d'ASCs, induit la chute des kératinocytes.

Avec des fibroblastes du donneur de 44 ans seuls, la MEC apparaît suffisante pour remplir les pores et permettre un développement harmonieux de l'épiderme. Par contre, nous avons été surpris d'observer que celle-ci est insuffisante quand on ajoute 25% d'ASCs. Si, au niveau du derme, l'effet n'est pas bénéfique, on remarque que l'épiderme préparé avec des kératinocytes âgés était plus épais avec ASCs que sans. Cela s'explique probablement par un effet paracrine des ASCs sur les kératinocytes.

Contrairement à notre hypothèse, les 2 souches d'ASCs n'ont pas stimulé les fibroblastes âgés quel que soit l'âge du donneur, puisque, dans toutes les situations où l'on a ajouté des ASCs aux fibroblastes âgés, l'épiderme a invaginé le derme. Nous suggérons donc que, quels que soient les ASCs et le sécrétome libérés, les fibroblastes âgés n'ont plus suffisamment de récepteurs aux facteurs paracrines libérés par les ASCs [29].

Pour résumer, l'ajout d'ASCs à des fibroblastes très jeunes et âgés a montré une influence de l'âge des fibroblastes et/ou de la variabilité interindividuelle des donneurs d'ASCs. Pour compléter nos données, nous envisageons d'évaluer le sécrétome (en monocouche et sur les PR) en épidermisant avec les mêmes kératinocytes jeunes des PR préparées avec et sans ASCs à partir de fibroblastes issus de donneurs d'âges différents :

- jeunes enfants (donneurs de moins de 5 ans) ;
- jeunes adultes (donneurs de 15 à 25 ans) ;
- adultes (donneurs de 25 ans à 40 ans) ;
- adultes plus âgés (donneurs de plus de 40 ans).

De plus, l'« effet-souche » des ASCs est à rapprocher de celui observé *in vivo* lors de l'injection de tissu adipeux [12]. Pour une application clinique des ASCs, il apparaît indispensable de valider les ASCs avant leur utilisation. Un contrôle d'efficacité pertinent doit être développé.

Pour cela nous avons prévu par la suite d'analyser le sécrétome des ASCs seules et en combinaison avec des fibroblastes en monocouche et dans les PR après épidermisation par des kératinocytes. L'objectif est de relier le profil des facteurs de croissance sécrétés à l'effet comblement des pores du substrat dermique et stimulant des fibroblastes et des kératinocytes.

Pour finir, en comparant l'étude préliminaire [27], qui utilisait un modèle de peaux jeunes cultivées pendant 100 jours pour obtenir une sénescence *in vitro*, aux étapes 1 et 2, qui utilisent des PR composées de fibroblastes et de kératinocytes jeunes ou âgés, afin de mimer des peaux de patients jeunes ou âgés, nous réalisons que le deuxième modèle est plus aléatoire que le premier. En effet, en plus de la variabilité interindividuelle liée aux donneurs de souches d'ASCs utilisées dans tous les cas, dans les étapes 1 et 2, nous ajoutons une variabilité interindividuelle liée aux donneurs de fibroblastes jeunes et âgés d'une part et de kératinocytes jeunes et âgés d'autre part. Tous ces paramètres seront à prendre en compte lorsque nous voudrons utiliser nos résultats pour une application clinique.

3.5) Conclusions

ISPB - FACULTE DE PHARMACIE

CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : Mme CADE Sara

Depuis la fin du 19^{ème} siècle, le tissu adipeux est utilisé comme produit de comblement en chirurgie plastique et reconstructrice au niveau des rides du visage ou du dos de la main par exemple. En plus de l'effet de comblement, le tissu adipeux apporte une amélioration de la qualité de la peau au niveau de la greffe : augmentation de son épaisseur, meilleure élasticité ou encore disparition des taches brunes. Cet effet est variable selon les individus. L'hypothèse avancée pour expliquer cette variabilité est que la proportion en cellules souches mésenchymateuses (ASCs pour « Adipose-derived Stem Cells ») contenues dans la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux est variable d'un sujet à l'autre.

L'objectif de notre étude était de vérifier, dans un modèle de peau reconstruite « âgée », l'impact des ASCs sur la qualité de la peau et les mécanismes de vieillissement cutané.

Dans une étude préliminaire réalisée au laboratoire sur un modèle de sénescence *in vitro*, l'effet des ASCs sur le processus de vieillissement cutané a été démontré. En effet, leur ajout a montré une amélioration de la qualité de l'épiderme et du derme, une augmentation de la capacité de prolifération des kératinocytes et un retardement de la sénescence. Ce résultat restait à confirmer avec des ASCs d'autres donneurs et en utilisant, cette fois, un modèle de peaux reconstruites « âgées » c'est à dire préparées avec des fibroblastes et des kératinocytes de sujets âgés en comparaison avec des peaux reconstruites préparées avec des fibroblastes et des kératinocytes de sujets jeunes.

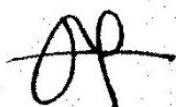
Nos résultats sont les suivants :

- L'incorporation d'ASCs au niveau du derme équivalent de peaux reconstruites peut avoir un effet bénéfique (retrouvé dans deux cas sur trois) sur les peaux reconstruites préparées avec des fibroblastes jeunes, que les kératinocytes soient jeunes ou âgés. Toutefois, cet effet est variable selon les donneurs d'ASCs (variabilité interindividuelle).
- L'effet de cette incorporation d'ASCs au niveau du derme équivalent de peaux reconstruites préparées avec des fibroblastes âgés reste à démontrer.

Finalement, les ASCs peuvent présenter un intérêt pour des applications cliniques (lutte contre le vieillissement, greffes de peau, aide à la cicatrisation, etc.) mais des contrôles d'efficacité fiables doivent être développés avant de les utiliser chez des patients.

Le Président de la thèse,
Nom : Pr. LAWTON Philippe

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le

12 MAI 2015

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

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

P/La Directrice et par délégation
La directrice adjointe
Pr. Stéphanie BRIANCON

Professeure C. VINCIGUERRA

4) Bibliographie

- [1] Röcken M, Schaller M, Sattler E, et al. Atlas de poche de dermatologie. Paris : Leclerc E ; 2013. Lavoisier
- [2] Séminaire d'enseignement de l'INSERM. Biologie de la peau humaine. Paris : Schmitt D ; 1997. Les Editions INSERM
- [3] Polivka L. Dermatologie Vénérologie. Paris : Editions Vernazobres-Grego ; 2012. GUIDE DE SURVIE POUR L'EXTERNE SOS pratique pour l'hôpital.
- [4] Peyrefitte G. Cahiers d'esthétique – cosmétique. Tome 1, Biologie de la peau. 2^{ème} édition. Paris : Peyrefitte G. ; 1995. Simep
- [5] Urgo Medical. La peau. <http://www.urgomedical.fr/Physiopathologie/La-peau-et-les-plaies/La-peau#> (consulté le 09/11/2014)
- [6] Santos MD. Rôle des protéoglycanes à héparane sulfate dans les lames basales au cours du vieillissement cutané. Thèse de doctorat : Sciences : Lyon 1 ; 2011
- [7] Lacroix S, Bouez C, Vidal S, Cenizo V, Reymermier C, Justin V, et al. Supplementation with a complex of active nutrients improved dermal and epidermal characteristics in skin equivalents generated from young or aged donors. Biogerontology. 2007;8(1):97-109
- [8] Puizina-Ivic N. Skin aging. Acta Dermatoven APA. 2008;17(2):47-54
- [9] Callahan TM, Wilhem KP. A review of ageing and examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. International Journal of Cosmetic Science. 2008;30(1):313-32
- [10] Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. International Journal of Cosmetic Science. 2008;30(1):87-95
- [11] Yaar M, Eller MS, Gilchrest BA. Fifty Years of Skin Aging. The journal of investigative dermatology. 2002;7(1):51-8
- [12] Lequeux C. Les cellules souches du tissu adipeux en vue d'une utilisation en chirurgie plastique et reconstructrice. Thèse de doctorat : Science – Santé : Lyon 1 ; 2011

- [13] Nae S, Bordeianu I, Stancioiu AT, Antochi N. Human adipose-derived stem cells : definition, isolation, tissue-engineering applications. *Romanian Journal of Morphology & Embryology*. 2013;54(4):919-24
- [14] Tholpady SS, Llull R, Ogle RC, Rubin JP, Futrell J.W., Katz A.J. Adipose Tissue : Stem Cells and Beyond. *Clinics in plastic surgery*. 2006;33(1):55-62
- [15] Gimble JM, Bunnell BA, Frazier T, Rowan B, Shah F, Wu X, et al. Adipose-derived stromal/stem cells. *Organogenesis forum*. 2013;9(1):3-10
- [16] Park BS, Jang KA, Sung JK, Park JS, Kwon YH., Kim KJ, et al. Adipose-Derived Stem Cells and Their Secretory Factors as a Promising Therapy for Skin Aging. *American Society for Dermatologic Surgery*. 2008;34(1):1323-6
- [17] Zhang S, Dong Z, Peng Z, Lu F. Anti-Aging Effect of Adipose-Derived Stem Cells in a Mouse Model of Skin Aging Induced by D-Galactose. *PLOS ONE*. 2014;9(5):1-7
- [18] Kim WS, Park BS, Park SH, Kim HK, Sung JH. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: Activation of dermal fibroblast by secretory factors. *Journal of Dermatological Science*. 2009;53(1):96-102
- [19] Lee SH, Jin SY, Song JS, Seo KK, Cho KH. Paracrine Effects of Adipose-Derived Stem Cells on Keratinocytes and Dermal Fibroblasts. *Ann Dermatol*. 2012;24(2):136-43
- [20] Moon KM, Park YH, Lee JS, Chae YB, Kim MM, Kim DS, et al. The Effect of Secretory Factors of Adipose-Derived Stem Cells on Human Keratinocytes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(1):1239-57
- [21] Hassan WU, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2014;22(1):313-25
- [22] Cerqueira MT, Pirraco RP, Santos TC, Rodrigues DB, Frias AM, Martins AR. Human Adipose Stem Cells Cell Sheet Constructs Impact Epidermal Morphogenesis in Full-Thickness Excisional Wounds. *Biomacromolecules*. 2013;14(1):3997-4008
- [23] 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 fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*. 2007;48(1):15-24

- [24] 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. *American Heart Association Journal*. 2004;109(1):1292-8
- [25] 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 fibroblast from oxidative stress. *Journal of Dermatological Science*. 2008;49(1):133-42
- [26] Nie C, Yang D, Xu J, Si Z, Jin X, Zhang J. Locally Administered Adipose-Derived Stem Cells Accelerate Wound Healing Through Différentiation and Vasculogenesis. *Cell Transplantation*. 2011;20(1):205-16
- [27] Metral E, Santos MD, Thépot A, Rachidi W, Mojallal A, et al. Adipose-derived Stem Cells Promote Skin Homeostasis and Prevents its Senescence in an *In vitro* Skin Model. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*. 2014;4(4):1-10
- [28] Vicanova J, Bouez C, Lacroix S, Lindmark L, Damour O. Epidermal and Dermal Characteristics in Skin Equivalent After Systemic and Topical Application of Skin Care Ingredients. *New York Academy of Sciences*. 2006;1067(1):337-42
- [29] Benaoum N. Age biologique : un concept actualisé au service de la lutte contre le vieillissement. Mémoire de DES : Biologie et Médecine : Mascara ; 2008

**« La 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. »**

Influence des cellules souches du tissu adipeux sur le vieillissement cutané : utilisation d'un modèle tridimensionnel.

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2015, 78 p.

RESUME

Lors de son utilisation comme produit de comblement en chirurgie plastique, le tissu adipeux apporte une amélioration de la qualité de la peau au niveau de la greffe. Cet effet pourrait être dû à la présence de cellules souches mésenchymateuses dans le tissu adipeux : les ASCs (pour « Adipose-derived Stem Cells »).

Une étude préliminaire, utilisant un modèle de sénescence *in vitro*, a démontré l'effet des ASCs sur le processus de vieillissement cutané.

L'objectif de ce travail est de vérifier, dans un modèle de peau reconstruite « âgée », l'impact de ces cellules souches sur la qualité de la peau et les mécanismes de vieillissement cutané.

Pour ce faire, nous avons incorporé des ASCs de deux donneurs différents au niveau du derme équivalent de peaux reconstruites préparées avec des combinaisons de fibroblastes et de kératinocytes jeunes et âgés.

Nous avons ainsi montré que l'ajout d'ASCs peut avoir un effet bénéfique sur les peaux reconstruites préparées avec des fibroblastes jeunes, épidermisés avec des kératinocytes jeunes ou âgés. Toutefois, cet effet est variable selon les donneurs d'ASCs (variabilité interindividuelle).

L'impact de l'incorporation d'ASCs au niveau du derme équivalent de peaux reconstruites préparées avec des fibroblastes âgés reste à démontrer.

En conclusion, nos résultats suggèrent que les ASCs peuvent présenter un intérêt en médecine régénérative. Des contrôles d'efficacité fiables doivent être développés avant leur utilisation clinique.

MOTS CLES

Cellules souches
Tissu adipeux
Vieillissement cutané
Peaux reconstruites

JURY

M. LAWTON Philippe, Professeur
Mme DAMOUR Odile, Docteur en Pharmacie
M. NATAF Serge, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
M. PAYS Laurent, Maître de Conférences

DATE DE SOUTENANCE

Mardi 9 juin 2015