



**HAL**  
open science

# Modulation pharmacologique de la cicatrisation cutanée

Sandy Peltier

► **To cite this version:**

Sandy Peltier. Modulation pharmacologique de la cicatrisation cutanée. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. hal-03128145

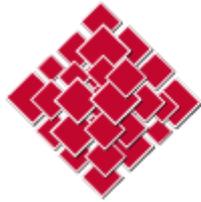
**HAL Id: hal-03128145**

**<https://ephe.hal.science/hal-03128145>**

Submitted on 2 Feb 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École Pratique  
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES  
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté

par

Sandy PELTIER

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

## **Modulation pharmacologique de la cicatrisation cutanée**

Soutenu le 16/07/2020 devant le jury suivant :

DE Sylvie Demignot - **Président**

CRHC Laurence Michel - **Tuteur scientifique**

DE Isabelle Lagroye - **Tuteur pédagogique**

Dr Christelle IONOTTO - **Rapporteur**

Dr Niclas SETTERBLAD - **Examineur**

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Laurence Michel

INSERM U976 Hôpital Saint Louis, Paris

Directeur : Armand Bensussan



Et de

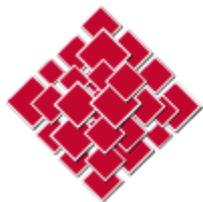
Dr Isabelle Lagroye

UMR 5218 Laboratoire de l'Intégration, du Matériau au Système (IMS)

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Les Cellules et leur Environnement : Dynamique des Interactions (CEDI)





École Pratique  
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté

par

Sandy PELTIER

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

## **Modulation pharmacologique de la cicatrisation cutanée**

Soutenu le 16/07/2020 devant le jury suivant :

DE Sylvie Demignot - **Président**

CRHC Laurence Michel - **Tuteur scientifique**

DE Isabelle Lagroye - **Tuteur pédagogique**

Dr Christelle IONOTTO - **Rapporteur**

Dr Niclas SETTERBLAD - **Examineur**

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Laurence Michel

INSERM U976 Hôpital Saint Louis, Paris

Directeur : Armand Bensussan



Et de

Dr Isabelle Lagroye

UMR 5218 Laboratoire de l'Intégration, du Matériau au Système (IMS)

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Les Cellules et leur Environnement : Dynamique des Interactions (CEDI)



## Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon stage et qui m'ont aidée lors de la rédaction de ce mémoire.

Je voudrais remercier ma tutrice scientifique, le Dr Laurence Michel qui m'a toujours soutenue et encouragée dans ma volonté de poursuivre ma formation. Sa grande confiance et sa curiosité scientifique m'ont permis de développer ma propre curiosité. Ses blagues sur les blondes et les Lorraines (nous caractérisant toutes les deux) m'ont bien fait rire.

Je tiens également à remercier ma tutrice pédagogique, le Dr Isabelle Lagroye pour ses conseils, son soutien et son implication.

Je remercie toute l'équipe pédagogique de l'EPHE pour avoir assuré la partie théorique de ma formation.

Merci à toute l'équipe de la plateforme technologique de l'IRSL pour la mise à disposition de matériel de pointe et leur support technique. Je remercie tout particulièrement Niclas Setterblad pour ses conseils, son écoute et nos nombreuses discussions.

Merci à toute mon équipe, alias « Team Michel ». Ils sont indispensables : Laulau mon binôme de projet, Fefe mon binôme de cellules, Yaya mon binôme de calculs, Gabi-Gabor pour ses histoires inventées sur les cellules, Maxou pour ses blagues et sa grande taille très utile pour les cartons en hauteur, Suzy pour son sérieux et ses GIF, Andreea (il serait temps de lui trouver un surnom) je ne te remercie pas car tu m'as volé Gabi-Gabor, Kevi-Kevou pour tes photos de chirurgies bizarres.

Un très grand merci à la team « bière » qui m'a aidée à décompresser.

Enfin merci à tous mes proches qui m'ont soutenue et ont toujours cru en moi, merci à celle qui m'appelle « tête d'ampoule » et à celui qui fait la liaison entre « mais » et « oui » : « maisoui ».

Merci à tous



## Table des matières

1.	Etat de l'art.....	1
1.1.	La peau.....	1
1.1.1.	L'épiderme.....	2
1.1.1.1.	Les kératinocytes.....	3
1.1.1.2.	Les mélanocytes.....	5
1.1.1.3.	Les cellules de Merkel.....	6
1.1.1.4.	Les cellules de Langerhans.....	6
1.1.2.	Le derme.....	7
1.1.2.1.	La matrice extracellulaire.....	7
1.1.2.2.	Les fibroblastes.....	10
1.1.3.	L'hypoderme.....	12
1.2.	Les plaies cutanées.....	13
1.2.1.	Les plaies aiguës.....	14
1.2.2.	Les plaies chroniques.....	16
1.3.	La cicatrisation cutanée.....	17
1.3.1.	Phase inflammatoire.....	18
1.3.2.	Phase de réparation.....	21
1.3.2.1.	Formation du tissu de granulation.....	22
1.3.2.2.	La réépithélialisation.....	23
1.3.2.3.	L'angiogenèse.....	23
1.3.2.4.	Contraction de la plaie.....	24
1.3.3.	Phase de remodelage.....	24
1.4.	Altérations de la cicatrisation.....	25
1.5.	Traitements des plaies.....	26
1.5.1.	Les différentes stratégies d'aide à la cicatrisation.....	26
1.5.2.	La médecine traditionnelle chinoise.....	26
1.5.2.1.	<i>Ophiopogon japonicus</i> .....	27
2.	Objectifs du projet.....	29
3.	Matériels et méthodes.....	31
3.1.	Produits testés.....	31
3.2.	Culture cellulaire.....	31
3.3.	Design expérimental.....	32
3.4.	Méthodes.....	33
3.4.1.	Viabilité.....	33

3.4.2.	Expression d'ARNm par RTqPCR .....	34
3.4.3.	Quantification des cytokines (ELISA) .....	35
3.4.4.	Prolifération.....	35
3.4.5.	Cycle cellulaire .....	36
3.4.6.	Fermeture de plaie.....	36
3.4.7.	Contraction de lattices de collagène .....	37
3.4.8.	Immunofluorescence.....	38
3.4.9.	Statistiques.....	40
4.	Résultats.....	41
4.1.	Mises au point .....	41
4.2.	Fibroblastes : effet de COHE sur leurs fonctions.....	43
4.2.1.	Viabilité .....	43
4.2.2.	Production de cytokines .....	44
4.2.3.	Prolifération.....	45
4.2.4.	Migration .....	48
4.2.5.	Activation des fibroblastes en myofibroblastes.....	49
4.2.6.	Modification de la matrice extracellulaire.....	50
4.2.7.	Contraction de lattices de collagène .....	51
4.2.8.	Production de facteurs pro-angiogéniques .....	52
4.3.	Kératinocytes : effet de COHE sur leurs fonctions.....	53
4.3.1.	Viabilité .....	53
4.3.2.	Production de cytokines .....	53
4.3.3.	Prolifération.....	55
4.3.4.	Migration .....	56
4.4.	Epiderme : effet de COHE sur sa structure.....	57
4.4.1.	Marqueurs de différenciation de l'épiderme.....	57
4.4.2.	Autres marqueurs.....	58
4.5.	Comparaison entre des fibroblastes jeunes et âgés .....	59
5.	Discussion et perspectives .....	63
6.	Références bibliographiques .....	75

## Liste des figures :

Figure 1 : Représentation schématique de la peau.....	2
Figure 2 : Structure schématique de la membrane basale.....	3
Figure 3 : Architecture et composition protéique de l'épiderme.....	4
Figure 4 : Assemblage supramoléculaire et interactions du collagène dans le derme.....	8
Figure 5 : La cicatrisation : les différentes phases et cellules impliquées.....	18
Figure 6 : Interactions réciproques des différents acteurs cellulaires dans le lit de la plaie ...	22
Figure 7 : Contraction de la MEC par les myofibroblastes .....	24
Figure 8 : Photographies d'Ophiopogon japonicus.....	28
Figure 9 : Analyse de la prolifération des fibroblastes par le système Incucyte® S3 Live Cell Analysis.....	35
Figure 10 : Cycle cellulaire .....	36
Figure 11 : Analyse de la migration des fibroblastes par le système Incucyte® S3 Live Cell Analysis.....	37
Figure 12 : Exemple de lattices de collagène prises en photo après 7 jours de culture .....	38
Figure 13 : Illustration d'une labtek .....	38
Figure 14 : Stratégie employée pour le choix des tests statistiques.....	40
Figure 15 : Mise au point de l'analyse de la F-actine par immunofluorescence .....	41
Figure 16 : Mise au point de l'analyse de la prolifération par le système Incucyte® S3 Live Cell Analysis.....	42
Figure 17 : Effet de la quantité de SVF dans le milieu de culture sur l'activation des fibroblastes en myofibroblastes .....	43
Figure 18 : Viabilité des fibroblastes .....	44
Figure 19 : Mesure de la libération de cytokines par les fibroblastes et myofibroblastes.....	45
Figure 20 : Prolifération des fibroblastes.....	46
Figure 21 : Cycle cellulaire des fibroblastes.....	47
Figure 22 : Mesure de la taille moyenne des fibroblastes et des myofibroblastes .....	47
Figure 23 : Fermeture de plaie par les fibroblastes.....	48
Figure 24 : Activation des fibroblastes en myofibroblastes .....	49
Figure 25 : Expression et synthèse de collagènes par les fibroblastes et les myofibroblastes .....	50
Figure 26 : Expression de MMP1 et 3 et de TIMP1 par les fibroblastes et les myofibroblastes .....	51
Figure 27 : Contraction de lattices de collagène par les fibroblastes.....	52
Figure 28 : Mesure de la libération de VEGF par les fibroblastes et les myofibroblastes .....	52
Figure 29 : Viabilité des kératinocytes .....	53
Figure 30 : Mesure de la libération de cytokines par les kératinocytes à l'état basal ou activés .....	54
Figure 31 : Prolifération des kératinocytes.....	55
Figure 32 : Cycle cellulaire des kératinocytes.....	56
Figure 33 : Fermeture de plaie par des kératinocytes.....	56
Figure 34 : Différenciation de l'épiderme .....	57
Figure 35 : Structure de la peau .....	58
Figure 36 : Migration de deux populations chez les fibroblastes jeunes.....	60
Figure 37 : Comparaison de fibroblastes jeunes et âgés .....	62
Figure 38 : Migration des fibroblastes en présence du milieu conditionné BRO.....	68
Figure 39 : Evolution du PDL en fonction de l'âge du donneur .....	70

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Diverses caractéristiques de fibroblastes papillaires et réticulaires .....	11
Tableau 2 : Spécifications de chaque analyse .....	32
Tableau 3 : Séquences des primers utilisés pour les qPCR.....	34
Tableau 4 : Composition pour une lattice de collagène.....	38
Tableau 5 : Les différentes conditions de marquage en immunofluorescence .....	39
Tableau 6 : Résumé des effets observés de COHE sur les différentes phases de la cicatrisation cutanée.....	66

## Liste des abréviations

**ABTS** : 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt

**ADN** : Acide DeoxyriboNucleique

**ARNm** : Acide RiboNucléique messenger

**$\alpha$ SMA** : alpha smooth muscle actin

**BSA** : Bovine Serum Albumin

**COHE** : *Ophiopogon japonicus*, Cohesium®

**CMH-II** : complexe majeur

d'histocompatibilité de classe II

**DAMP** : Damaged Associated Molecular Pattern

**DIOC6** : 3,3'-Diethyloxacarbocyanine

**DO** : Densité Optique

**ELISA** : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

**EGF** : Epithelial Growth Factor

**FGF- $\beta$**  : Fibroblast Growth Factor beta

**GAG** : glycosaminoglycane

**GRO- $\alpha$**  : Growth-Regulated Oncogene alpha

**HMGB1** : Chromatin-associated protein high mobility group box 1

**HRP** : Horseradish Peroxidase

**IGF1** : Insulin like Growth Factor

**IL** : InterLeukine

**IP** : Iodure de Propidium

**KGF** : Keratinocyte Growth Factor

**KGM** : Keratinocyte Growth Medium

**LPS** : Lipopolysaccharide

**MAPK** : Mitogen-Activated protein Kinase

**MEC** : Matrice Extracellulaire

**MMP** : Matrix MetalloProteinase

**MTC** : Médecine traditionnelle chinoise

**MTT** : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

**NET** : Neutrophil Extracellular Trap

**NF- $\kappa$ B** : Nuclear Factor kappa B

**NK** : Natural killer

**P96** : Plaque de culture 96 puits

**PAMP** : Pathogens Associated Molecular Pattern

**PBS** : Phosphate Buffer Saline

**PDGF** : Platelet-Derived Growth Factor

**PRR** : Pattern Recognition Receptor

**qPCR** : quantitative Polymerase Chain Reaction

**R0.5** : RPMI complet avec 0,5% SVF

**R10** : RPMI complet avec 10% SVF

**RANTES** : Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted

**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute

**RT** : Reverse Transcription

**SVF** : Sérum de Veau Fœtal

**TIMP** : Tissue inhibitors matrix metalloproteinases

**TLR** : Toll like Receptor

**TGF- $\beta$**  : Transforming Growth Factor beta

**TNF- $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor alpha

**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor

**$\Delta\Psi$ m** : Mitochondrial Membrane Potential



# Modulation pharmacologique de la cicatrisation cutanée

## Avant-propos

Mon travail de diplôme EPHE s'inscrit dans un projet de recherche de l'équipe « Immunité cutanée et Inflammation » faisant partie de l'unité mixte de recherche U976 « Immunologie humaine, pathophysiologie et Immunothérapies » à l'Hôpital Saint-Louis, Paris.

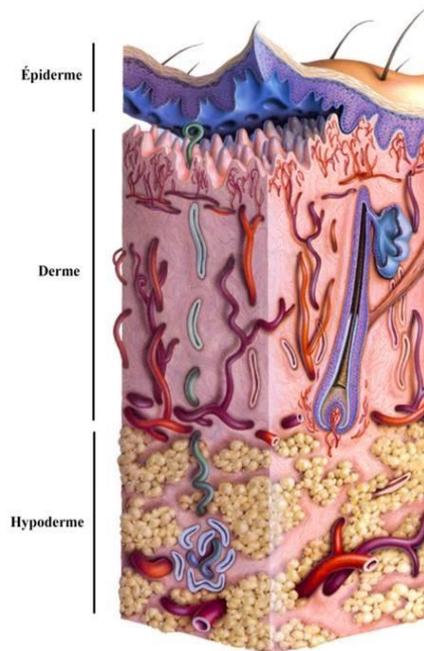
Ce mémoire présente la réalisation d'une étude pharmacologique visant à évaluer l'effet d'une herbe utilisée en médecine traditionnelle chinoise (un extrait de racine d'*Ophiopogon japonicus*) sur la cicatrisation cutanée. Avant de détailler les méthodes et protocoles utilisés ainsi que les résultats obtenus dans cette étude, une introduction générale présente les données actuelles sur la peau, sa structure, ses fonctions et les caractéristiques de ses principaux constituants cellulaires. Elle aborde ensuite le déroulement du processus de cicatrisation suite à une blessure cutanée. Enfin elle présente les principaux traitements utiles dans la cicatrisation, avec une ouverture sur les plantes médicinales de la médecine traditionnelle chinoise, dont l'une d'entre elles est étudiée en détail dans ce projet.

## 1. Etat de l'art

### 1.1. La peau

Avec ses quelques 2 m<sup>2</sup>, la peau est l'organe le plus étendu du corps humain. Elle est la première barrière de défense de l'organisme face à l'environnement ; elle empêche l'entrée d'éléments étrangers dont les micro-organismes, protège des rayons ultraviolets nocifs du soleil et permet d'éviter l'évaporation de l'eau. Elle contribue également à la régulation de la température corporelle, protège les organes internes et contient de nombreux récepteurs tels que ceux de Merkel, de Pacini, de Meissner, de Ruffini et de Krause. Ces derniers nous permettent d'obtenir des informations sur l'environnement extérieur, nous conférant notamment le sens du toucher. Son épaisseur est en moyenne de 2 mm mais peut varier selon la localisation, le sexe et l'âge. Elle est divisée en 3 couches distinctes (Figure 1) qui sont, de la

plus externe à la plus interne : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Geras, 1990) comme détaillé ci-dessous.

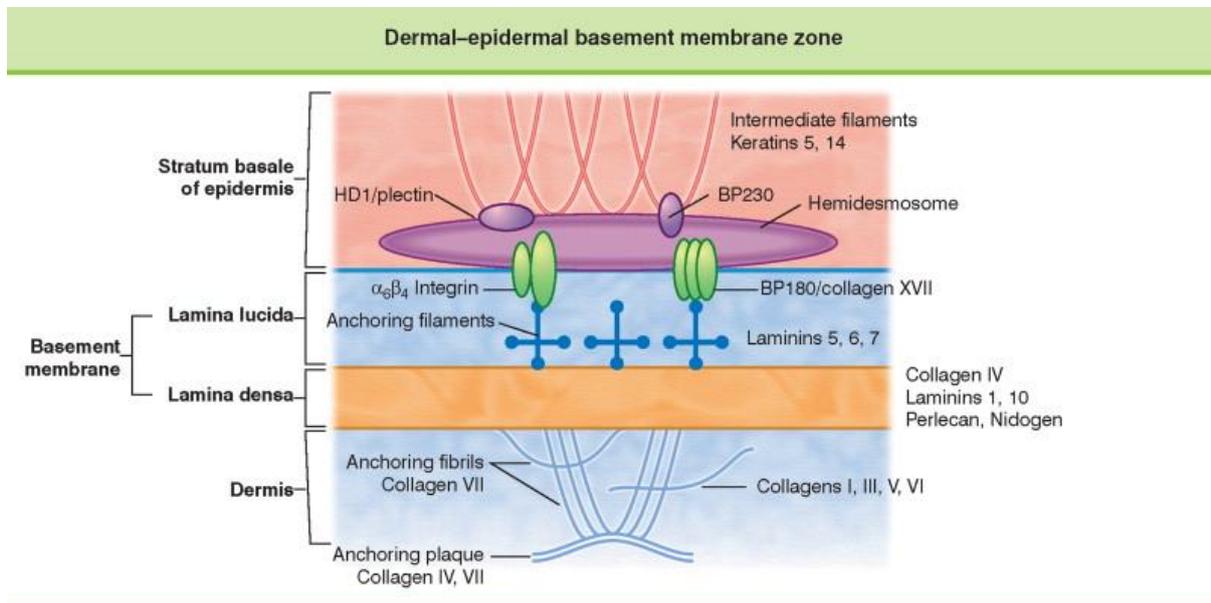


**Figure 1 : Représentation schématique de la peau**  
(Geras, 1990) Les différentes couches de la peau sont représentées, avec plusieurs appendices : follicules pileux qui débutent dans l'hypoderme et traversent l'épiderme, vaisseaux sanguins, glandes sébacées et sudoripares.

### 1.1.1. L'épiderme

L'épiderme, la couche la plus mince et la plus externe de la peau, est un épithélium pavimenteux, stratifié et kératinisé qui assure la fonction de protection vis-à-vis du milieu extérieur. Il est composé de couches pluristratifiées de kératinocytes majoritairement (environ 95% des cellules épidermiques) reposant sur la membrane basale qui sépare l'épiderme du derme. La membrane basale (Figure 2) est une matrice extracellulaire hautement spécialisée qui contrôle le passage de cellules ou de molécules bioactives entre l'épiderme et le derme. De nombreuses cytokines et facteurs de croissance peuvent s'y lier, créant un réservoir permettant ainsi de les stocker et de les rendre accessibles aux cellules épidermiques ou dermiques qui en ont besoin. Elle est composée de deux strates, comprenant des laminines, du collagène de type IV, de nidogène et d'un protéoglycane, le perlecan. Elle est reliée au derme par des fibres d'ancrage, et à l'épiderme par des hémidesmosomes eux-mêmes reliés aux filaments de kératine des kératinocytes (Breitkreutz et al., 2013).

Plusieurs types cellulaires composent l'épiderme. Ils ont des rôles structuraux et fonctionnels essentiels pour garantir la fonction de protection de la peau, décrits dans les paragraphes suivants.

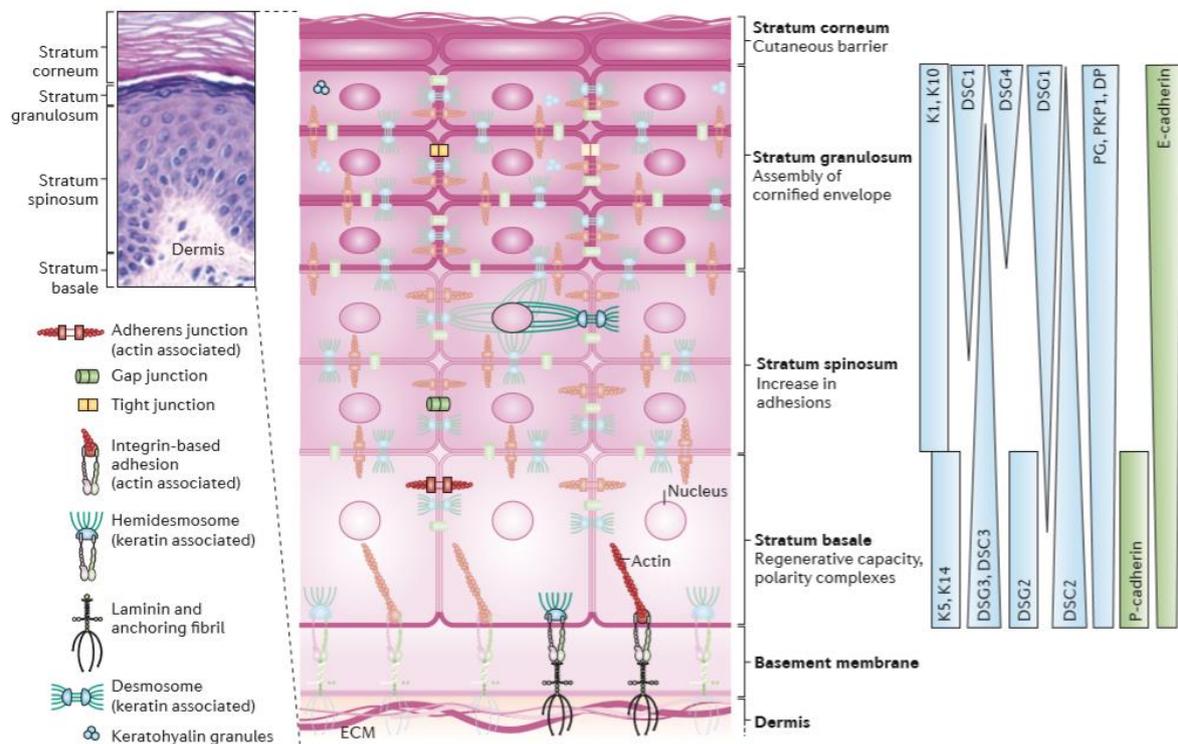


**Figure 2 : Structure schématique de la membrane basale**  
(Li and Kirsner, 2005)

#### 1.1.1.1. Les kératinocytes

Le type cellulaire le plus abondant de l'épiderme est le kératinocyte, représentant 95 % des cellules et assurant la structure de l'épiderme. Les kératinocytes basaux reposent sur la membrane basale et sont les seuls kératinocytes de l'épiderme ayant la capacité de proliférer. Lorsqu'elles se détachent de la membrane basale, les cellules filles perdent cette capacité de prolifération et entament alors un processus de différenciation. Progressivement, plusieurs couches de cellules en différenciation se créent pour permettre au final la formation d'une couche de cellules kératinisées anucléées. Différents profils d'expression de protéines sont issus de cette différenciation (Figure 3). La première couche de cellules différenciées est la couche épineuse, qui contient environ 8 couches de cellules. Elle tient son nom de l'aspect d'épines lié aux nombreuses jonctions « desmosomes » la composant. Des granules lamellaires contenant des lipides deviennent visibles ici. La couche suivante est la couche granuleuse, composée de 3 couches de kératinocytes, appelées SG1 (pour *stratum granulosum*, couche la plus superficielle), SG2 et SG3. Les kératinocytes contiennent alors de nombreux granules de kératohyaline, dans lesquels la filaggrine est formée à partir de

profilaggrine, pour agréger les kératines. Les kératinocytes perdent progressivement leurs organelles et meurent selon le processus d'apoptose programmée de différenciation qu'ils suivent depuis la couche basale. Ils deviennent anucléés et plus compacts : ils forment alors la couche cornée. Celle-ci est composée de 15 à 30 couches de kératinocytes cornifiés appelés cornéocytes. Ces cellules comprennent essentiellement des kératines et de la filaggrine, et sont recouvertes par l'enveloppe cornée formée par un ensemble de protéines (involucrine et loritrine entre autres). Les cornéocytes sont entourés d'une matrice extracellulaire riche en lipides sécrétés à partir des granules lamellaires, et sont liés entre eux par des cornéodesmosomes (Losquadro, 2017). L'ensemble forme une barrière impénétrable aux pathogènes extérieurs et imperméable à l'eau. Ces cellules sont ensuite éliminées



**Figure 3 : Architecture et composition protéique de l'épiderme**

Les 4 couches de l'épiderme sont visibles sur une coupe de peau humaine colorée par hématoxyline et éosine : couche basale, épineuse, granuleuse et cornée. La représentation schématique montre les jonctions impliquées dans les différentes couches ainsi que la distribution de certains composants spécifiques de ces jonctions : K : kératine ; DSC : desmocolline ; PG : plakoglobine ; PKP : plakophiline ; DP : desmoplakine (Simpson et al., 2011) progressivement, c'est le phénomène de desquamation. L'épiderme est constamment renouvelé grâce à un équilibre entre la prolifération des cellules basales, leur différenciation, et la desquamation (Gonzales and Fuchs, 2017). Ce renouvellement total de l'épiderme nécessite approximativement 28 jours (Baroni et al., 2012).

Les kératines forment une grande famille contenant 54 kératines : ce sont des protéines fibreuses élastiques du cytosquelette, qui représentent 80 % des protéines totales présentes dans les kératinocytes différenciés. Différentes kératines sont exprimées selon les couches de différenciation de l'épiderme. Des kératines de type I (acides) s'associent à des kératines de type II (basiques) pour former des hétéromères, qui une fois assemblés constituent les filaments intermédiaires du cytosquelette. Les kératines 5/14 sont exprimées dans la couche basale et sont remplacées par les kératines 1/10 dans les couches supérieures. Dans la couche granuleuse SG3, des complexes de profilaggrine (assemblage de 10 à 12 monomères de filaggrine) et de kératines appelés granules de kératohyaline (ou F-granules) se forment. Ces complexes disparaissent progressivement à partir de la couche SG1 par déphosphorylation de la profilaggrine, conduisant à une libération des monomères de filaggrine qui vont lier et agréger les kératines (Matsui and Amagai, 2015). Les kératines sont ancrées aux jonctions cellulaires (desmosomes et hémidesmosomes) et sont impliquées dans de nombreuses fonctions. Elles fournissent un échafaudage aux kératinocytes, leur permettant de soutenir le stress mécanique, de maintenir leur intégrité structurelle, de les protéger des variations de pression hydrostatique et d'établir la polarité cellulaire. Elles ont également des fonctions non mécaniques, telles que la signalisation cellulaire, le transport intracellulaire, la compartimentation et la différenciation cellulaire (Bragulla and Homberger, 2009).

Les aquaporines (AQP) sont des protéines membranaires qui forment des canaux à travers les membranes cellulaires. On en distingue 13 chez le mammifère : les AQP 0, 1, 2, 4, 5, 6 et 8 qui laissent passer l'eau seulement, et les AQP 3, 7, 9 et 10 qui sont aussi perméables au glycérol. Dans l'épiderme normal, on trouve les AQP 3, 9 et 10, mais c'est l'AQP3 qui est prédominante. Elle est surtout localisée dans la couche basale mais elle est également retrouvée dans les couches suprabasales. Cette AQP est essentielle pour maintenir une bonne hydratation de la peau (Boury-Jamot et al., 2006).

#### 1.1.1.2. Les mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules fusiformes dendritiques retrouvées au niveau de la membrane basale, où ils représentent 10 % des cellules épidermiques. On en retrouve environ 1200 par mm<sup>2</sup> et chacun d'entre eux est en contact avec 30 à 40 kératinocytes. Ils contiennent des granules appelées mélanosomes qui sont chargés de produire la mélanine. Il y a deux

types de mélanine (la phéomélanine de couleur jaune/rouge, et l'eumélanine de couleur brun/noir) qui sont tous les deux produits dans tous les mélanocytes, mais selon un ratio qui diffère dépendamment de nombreux paramètres intrinsèques. Les mélanosomes sont transférés des mélanocytes aux kératinocytes environnants par des prolongements appelés dendrites. Ces mélanosomes se positionnent de façon stratégique au-dessus du noyau du côté exposé aux rayons ultraviolets, de façon à former une structure protégeant celui-ci. Ainsi, la taille, la structure et la composition des mélanosomes influent non seulement la couleur de la peau, mais également la protection de celle-ci face aux rayons ultraviolets (Cichorek et al., 2013; Lin and Fisher, 2007).

#### 1.1.1.3. Les cellules de Merkel

Les cellules de Merkel représentent moins de 5 % de la population épidermique. Elles sont retrouvées au niveau de la jonction dermo-épidermique, où elles sont entourées de kératinocytes avec lesquels elles sont liées par des desmosomes. Des zones synaptiques associées à une fibre nerveuse sont souvent observées, mais pas systématiquement, ce qui suggère plusieurs sous-populations ayant des rôles différents. Elles sont caractérisées par la présence de granules cytoplasmiques très denses. Ces cellules sont plus nombreuses dans les paumes, les pieds et la surface plantaire des orteils. Leur fonction exacte reste à ce jour incertaine, mais il semblerait qu'elles soient dotées de fonctions endocrines (en particulier dans le développement des follicules pileux), nerveuses, mécanotransductrices (bien que leur rôle exact dans cette fonction soit encore sujet à débat) et nociceptives. Des mélanosomes originaires des mélanocytes sont parfois observés dans leur cytoplasme (Abraham and Mathew, 2019).

#### 1.1.1.4. Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans représentent 2 à 5 % de la population épidermique, et sont retrouvées dans les couches suprabasales où elles sont liées aux kératinocytes via des molécules d'adhésion E-cadhérine. Les cellules de Langerhans sont des macrophages spécialisés de l'épiderme, qui possèdent des fonctions de cellules dendritiques et par conséquent expriment les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) lorsqu'elles sont activées. Elles représentent la première ligne de défense immunologique de l'organisme. Dans des conditions normales, elles sondent leur

environnement via leurs dendrites et captent des antigènes du soi, participant ainsi à la tolérance du système immunitaire. En cas de brèche dans la couche cornée, elles étendent leurs dendrites jusqu'aux jonctions serrées afin de capter les antigènes des potentiels pathogènes et induire une réponse spécifique IgG médiée par les cellules T helper folliculaires. Ainsi, elles sont capables de préparer le système immunitaire alors même que les pathogènes n'ont pas encore traversé la barrière épidermique de jonctions serrées. Lorsque la barrière épithéliale est lésée, elles activent directement les lymphocytes T. Elles migrent constamment vers les ganglions lymphatiques afin de présenter les antigènes captés, et leur renouvellement est assuré par une faible population ayant la capacité de proliférer (<5 %) (Doebel et al., 2017).

Plusieurs appendices constituent également l'épiderme. Bien que la plupart soient retrouvés dans le derme (follicules pileux, glandes sébacées, glandes sudoripares), les cellules qui les constituent sont d'origine ectodermique, ce qui fait d'eux des appendices épidermiques.

### 1.1.2. Le derme

Le derme constitue la couche intermédiaire de la peau et joue un rôle clé car il lui confère sa résistance mécanique et son élasticité de par sa composition en tissu conjonctif résistant et flexible. Les fibroblastes sont les cellules qui le composent majoritairement, enchâssés dans la matrice conjonctive lâche. Ce sont eux qui produisent et organisent la matrice extracellulaire (MEC) du derme.

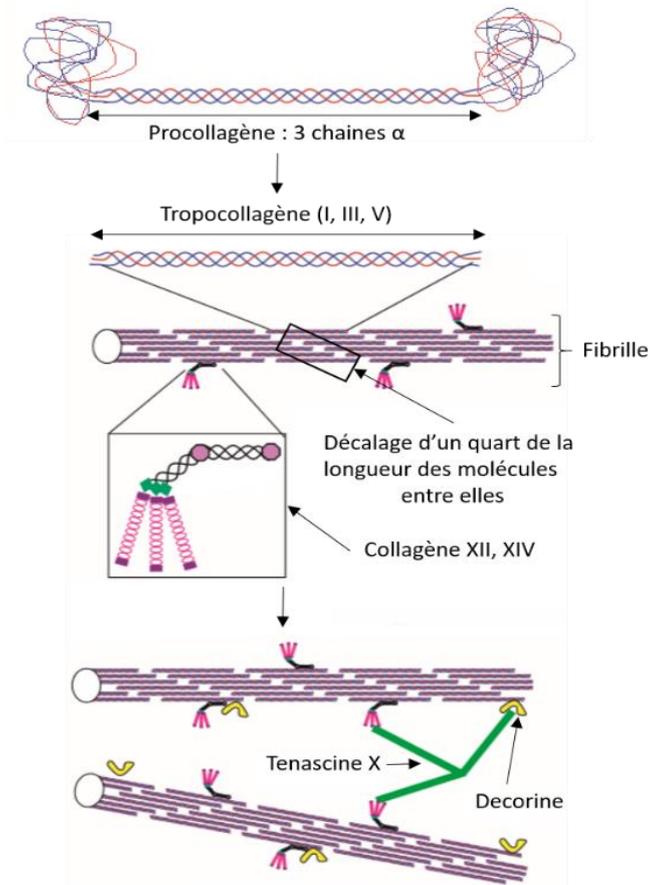
#### 1.1.2.1. La matrice extracellulaire

La MEC est composée d'un maillage de protéines et polysaccharides produits par les fibroblastes principalement. Elle est « construite » à partir d'un nombre relativement faible de type de molécules mais c'est leur assemblage en réseaux complexes avec différentes architectures et compositions qui confère au tissu dermique ses différentes propriétés (résistance, élasticité). Elle constitue un support mécanique tridimensionnel pour les cellules environnantes permettant de structurer la peau. En plus de cette fonction physique, la MEC établit et maintient le microenvironnement cellulaire, fournit des informations structurelles aux cellules, régule l'activité de molécules de signalisation, affecte le comportement des cellules dont leur forme, survie, prolifération, migration et différenciation. La MEC est

composée de protéines fibreuses (collagène, élastine, fibrilline, fibuline), de glycoprotéines (laminine, fibronectine, ténascine) et de glycosaminoglycans (Yi et al., 2017).

### Les collagènes :

Les collagènes forment une grande famille de molécules abondantes et variées avec 44 gènes et 28 protéines ayant diverses fonctions et structures. Il existe plusieurs classes de collagènes dont la plus abondante dans la peau est celle des collagènes fibrillaires, avec les collagènes de type I, III et V. Le collagène de type I est le plus représenté avec 60 à 80 % des collagènes de la peau. Les gènes des collagènes fibrillaires sont transcrits en ARNm, conduisant à la synthèse de polypeptides précurseurs (les chaînes  $\alpha$ ) qui subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, essentielles pour permettre leur repliement correct. Les chaînes  $\alpha$  s'assemblent par trois pour former des structures en triples hélices appelées monomères de procollagènes. Les cellules sécrètent ces molécules de procollagènes qui vont être converties en tropocollagène et s'aligner avec un décalage d'un quart de leur longueur pour former les fibrilles de collagène. Les fibrilles sont stabilisées ensemble par des protéines cross-link (ténascine X, décorine, perlécane, collagènes non fibrillaires...) pour former finalement les fibres de collagènes (Figure 4). Ces protéines cross-link influencent et modulent la taille et la structure des fibres de collagène. Les fibres de collagène constituent ainsi le



**Figure 4 : Assemblage supramoléculaire et interactions du collagène dans le derme**  
(Adapté d'après Krieg and Aumailley, 2011)

Les chaînes  $\alpha$  qui subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, essentielles pour permettre leur repliement correct. Les chaînes  $\alpha$  s'assemblent par trois pour former des structures en triples hélices appelées monomères de procollagènes. Les cellules sécrètent ces molécules de procollagènes qui vont être converties en tropocollagène et s'aligner avec un décalage d'un quart de leur longueur pour former les fibrilles de collagène. Les fibrilles sont stabilisées ensemble par des protéines cross-link (ténascine X, décorine, perlécane, collagènes non fibrillaires...) pour former finalement les fibres de collagènes (Figure 4). Ces protéines cross-link influencent et modulent la taille et la structure des fibres de collagène. Les fibres de collagène constituent ainsi le

squelette de l'architecture moléculaire de la peau (Haydont et al., 2019a; Krieg and Aumailley, 2011).

### **Les fibres élastiques :**

Les fibres élastiques sont issues d'un assemblage supramoléculaire responsable des propriétés élastiques de la peau. Elles sont composées de fibrillines qui s'assemblent pour former des microfibrilles auxquelles sont associées d'autres protéines telles que les fibulines, glycoprotéines associées aux microfibrilles (MAGP) et des protéoglycanes. Ces protéines constituent des échafaudages qui permettent aux molécules d'élastine de s'associer aux microfibrilles. C'est l'élastine qui est responsable de la propriété élastique de la peau. Elle contient en effet une forte teneur en acides aminés hydrophobes, favorisant le repliement de la protéine sur elle-même sans organisation déterminée afin de s'éloigner du milieu aqueux. Lorsque le tissu subit un étirement, l'élastine se déroule et expose ses résidus hydrophobes, mais cet état est instable. Ainsi, lorsque l'étirement cesse, l'élastine retourne à son état basal. Les molécules d'élastines s'assemblent en grand nombre et s'associent aux microfibrilles pour former les fibres élastiques. Il existe 3 types différents de fibres élastiques : les fibres oxytalanes (exclusivement constituées de microfibrilles), les fibres d'élaunine (fibres immatures courtes et fines composées de microfibrilles et d'élastine) et les fibres élastiques matures (Weihermann et al., 2017). A ces fibres élastiques sont associées d'autres protéines, comme la « Latent Transforming growth factor beta Binding Protein » (LTBP) qui retient le TGF- $\beta$  et régule donc sa biodisponibilité. Les fibres élastiques jouent ainsi un rôle de réservoir de facteur de croissance (Krieg and Aumailley, 2011).

### **Les protéoglycanes :**

Les protéoglycanes sont des molécules associant une protéine à un glycosaminoglycane (GAG). Ils sont intégrés soit à la matrice extracellulaire, soit dans la membrane plasmique des cellules pour y jouer un rôle dans les relations cellule-matrice. Les GAG sont constitués de disaccharides, dont il existe 6 types : sulfate de chondroïtine, sulfate de dermatane, sulfate de kératane, sulfate d'héparine, l'héparine et l'acide hyaluronique. L'acide hyaluronique est le seul GAG à ne pas être synthétisé directement glycosylé à une protéine : il se lie de façon non covalente à des protéines contenant des domaines de liaisons. Les GAG ont de nombreux groupes sulfates et carboxyles, leur conférant une charge négative permettant ainsi de retenir

l'eau dans le tissu. L'acide hyaluronique est l'une des molécules les plus abondante du derme tandis que les protéoglycanes les plus retrouvés sont le versican, la décorine et le byglycane. Les protéoglycanes remplissent non seulement les espaces vides dans la MEC, mais participent également aux interactions cellules/cellules et cellules/matrice (Lee et al., 2016).

### **Organisation de la MEC :**

Le derme est divisé en deux régions qui diffèrent par la composition en fibroblastes et l'organisation de la MEC : le derme papillaire et le derme réticulaire (Sorrell, 2004).

Le derme papillaire est le plus superficiel, il s'étend de la jonction dermo-épidermique jusqu'à 300-400 µm de profondeur en moyenne. Sa partie superficielle est typiquement arrangée en forme de papilles qui contiennent les composants vasculaires et neuronaux et soutiennent l'épiderme. Sa limite inférieure est marquée par un plexus vasculaire, le *rete subpapillare*. Il est constitué de fines fibrilles de collagène de type I et III et de fibres élastiques (élaunines et oxytalanes) orientées le plus souvent perpendiculairement à la jonction dermo-épidermique et peu organisées. Il est riche en protéoglycanes décorine, en collagène non fibrillaire XII et XVI et en ténascine C.

Le derme réticulaire est plus profond, il débute au plexus *rete subpapillare* et se prolonge jusqu'au plexus *rete cutaneum*. Le tissu conjonctif est plus dense et contient de gros faisceaux de collagènes et des fibres élastiques matures organisées parallèlement à la surface de la peau. Il y a moins de collagène de type III que dans le derme papillaire, et le nombre de cellules diminue progressivement en fonction de la profondeur. Il est riche en protéoglycane versican associé avec les fibres élastiques, collagène type XIV et ténascine X.

#### **1.1.2.2. Les fibroblastes**

Les fibroblastes sont des cellules mésenchymateuses présentes dans de nombreux tissus conjonctifs. Ils jouent un rôle majeur dans la structure de ces tissus et participent à la coordination de plusieurs processus comme la cicatrisation. La population des fibroblastes est très hétérogène et dynamique, en effet plusieurs populations sont retrouvées dans différents tissus mais aussi au sein même d'un tissu. Ces différentes populations diffèrent par la taille, le

taux de prolifération, la production de composants de la MEC et bien d'autres fonctions. Les fibroblastes sont les cellules les plus abondantes du derme et y jouent un rôle essentiel par leur capacité de se contracter, de migrer, de produire et dégrader la matrice extracellulaire. Elles peuvent également participer aux réponses immunitaires induites par une agression extérieure en recrutant des cellules inflammatoires via les médiateurs qu'elles produisent.

Les fibroblastes dermiques regroupent au moins deux populations distinctes de fibroblastes : les fibroblastes papillaires et les fibroblastes réticulaires, retrouvés respectivement dans le derme papillaire superficiel et le derme réticulaire profond. De nombreuses études tentent d'identifier des marqueurs spécifiques de ces deux types de populations afin de pouvoir isoler des populations pures et mieux les caractériser, mais il n'existe pas encore de consensus. Certaines études concluent même à la présence de plus de 2 populations fibroblastiques dans le derme (Solé-Boldo et al., 2019). Pour exemple, Korosec et al. (2019) ont montré qu'il y a plus de fibroblastes FAP+CD90- dans le derme papillaire et plus de FAP+CD90+ dans le derme réticulaire. Ces deux populations ne sont pas franchement limitées à leur compartiment dermique mais elles sont plutôt réparties selon deux gradients opposés en fonction de la profondeur dans le derme. Les fibroblastes FAP+CD90- sont décrits comme ayant un potentiel de prolifération élevé et ne pouvant pas se différencier en adipocytes. A l'inverse, les fibroblastes FAP+CD90+ sont capables de se différencier en adipocytes, contractent plus rapidement une matrice de collagène I, sont plus sensibles à l'inhibition de contact et favorisent la fermeture des plaies. Avec l'âge, le nombre d'épitopes CD90 tend à diminuer à la surface des fibroblastes, ce qui pourrait contribuer à la diminution de la cicatrisation observée chez les sujets âgés. Les différentes études portant sur ces 2 populations ont pu mettre en évidence des différences dans leur morphologie et leurs capacités fonctionnelles (Tableau 1).

**Tableau 1 : Diverses caractéristiques de fibroblastes papillaires et réticulaires**

*aSMA : « smooth muscle actin alpha », KGF : « Keratinocyte growth factor » MMP : « Matrix metalloproteinase », TIMP : « tissue inhibitor of metalloproteinases », HGF : « hepatocyte growth factor », TGF-B : « Transforming growth factor beta » (Stunova and Vistejnova, 2018).*

	Fibroblastes papillaires	Fibroblastes réticulaires
<b>Caractéristiques générales</b>		
Taille (diamètre des cellules en suspension)	petite	grande
Forme	allongée	étalée, aplatie

Taux de prolifération	élevé	faible
Contraction de collagène	faible	élevé
Densité en culture	élevé	faible
Adhésions focales	rares	nombreuses
Effet sur les kératinocytes	différenciation des kératinocytes, couche plus épaisse	moins bonne différenciation des kératinocytes, couche plus mince
Effet sur l'angiogenèse	stimulation	pas d'effet
<b>Production MEC</b>		
Collagène I	faible	élevé
Collagène VI $\alpha$ 1	élevé	faible
Collagène VI $\alpha$ 2	faible	élevé
Collagène XVI	élevé	faible
Versican	faible	élevé
Decorine	élevé	faible
Fibromoduline	élevé	faible
GAG	élevé	faible
<b>Synthèse d'autres protéines</b>		
$\alpha$ SMA	faible	élevé
KGF	faible	élevé
MMPs, TIMPs	augmentent avec l'âge	constants avec l'âge
HGF	élevé	faible
TGF- $\beta$	faible	élevé

### 1.1.3. L'hypoderme

La couche la plus profonde de la peau, l'hypoderme, est composée essentiellement de tissu adipeux blanc et de tissu conjonctif lâche. Son épaisseur est variable, de très épais au niveau de l'abdomen, des fesses et des cuisses, à inexistant au niveau des paupières. Il est organisé en lobules d'adipocytes entourés de fibres conjonctives dans lesquelles sont retrouvés des fibres nerveuses et de nombreux vaisseaux sanguins. Il forme un coussin de protection entourant les organes profonds, muscles et os, et permet d'absorber les chocs. Il est également responsable de la régulation thermique du corps, du fait du caractère isolant de la graisse. Une de ses fonctions principales est de stocker l'énergie en excès sous forme de lipides qui vont pouvoir être mobilisés en cas de besoin : il constitue ainsi une importante réserve d'énergie. Les adipocytes sont en effet des cellules dérivées des cellules mésenchymateuses dont les fibroblastes, ils contiennent une goutte lipidique permettant le stockage de

triglycérides (lipogénèse) qui prend littéralement toute la place dans la cellule, repoussant le noyau et le cytoplasme à la périphérie. La taille des adipocytes varie grandement en fonction de leur goutte lipidique, jusqu'à un facteur 20. En cas de besoin, les triglycérides sont hydrolysés, c'est la lipogénèse. Des acides gras et molécules de glycérol sont alors produits et libérés dans la circulation, afin de pouvoir servir de source d'énergie et être métabolisés par d'autres tissus. Le tissu adipeux joue également un rôle d'organe endocrinien : en effet il sécrète des cytokines appelées adipokines qui impactent de nombreux tissus cibles ainsi que la régulation systémique de la dépense énergétique et le catabolisme lipidique (Sandrine Ellero-Simatos, 2013). Enfin, lors d'une plaie cutanée, les adipocytes présents migrent dans le lit de la plaie et sécrètent des facteurs permettant le recrutement des acteurs de la cicatrisation. Il semblerait que le remodelage du tissu adipeux soit étroitement lié au cycle du follicule pileux. En effet lors de la phase anagène (phase de croissance), le tissu adipeux atteint son épaisseur maximale ; il contient 40% de nouveaux adipocytes et entre en contact avec le follicule pileux. Lors de la transition de la phase anagène vers la phase télogène (arrêt de croissance et chute), une lipolyse importante se produit ; le tissu adipeux est alors plus fin et ne touche plus le follicule pileux (Guerrero-Juarez and Plikus, 2018).

En résumé, la peau est un organe complexe composé de nombreux types cellulaires qui fournit une protection contre les agressions extérieures. Son intégrité structurelle est ainsi essentielle et en cas de blessure, un processus finement régulé se met en place : la cicatrisation. Ce phénomène est essentiel à la survie de l'organisme : il permet à la peau de retrouver une structure équivalente, bien que jamais vraiment identique, assurant ainsi efficacement sa fonction de barrière.

## **1.2. Les plaies cutanées**

Une plaie cutanée est une blessure impliquant une rupture de l'intégrité et de la fonction de la peau. Les éléments de l'environnement extérieur ont alors la capacité d'atteindre des zones habituellement inaccessibles. Chaque individu fait face à un moment ou un autre dans sa vie à une plaie cutanée ; la plupart sont mineures et peuvent être traitées à domicile, voire même ne demander aucune précaution particulière. Elles peuvent être divisées en deux catégories, en fonction de l'étiologie : les plaies aiguës et les plaies chroniques.

### 1.2.1. Les plaies aiguës

Les plaies aiguës sont des blessures ponctuelles causées par un dommage extérieur, et peuvent être de 2 types : chirurgicales ou traumatiques (Leaper, 2006).

Les plaies chirurgicales causent un minimum de dommages aux tissus car elles sont maîtrisées, réalisées avec précision dans un environnement contrôlé pour réduire les risques d'infection. Il existe plusieurs classes de plaies chirurgicales, en fonction du risque d'infection et de la localisation de celle-ci :

- La classe I regroupe les plaies considérées comme propres, il n'y a pas de signe d'infection ou d'inflammation. Elles concernent souvent la peau, le système vasculaire ou les yeux.
- La classe II concerne les plaies propres mais à risque d'infection élevée. Malgré l'absence de signe infectieux ou d'inflammation, la localisation de la plaie augmente les risques. Une plaie chirurgicale dans le système digestif, par exemple, est à haut risque d'infection.
- La classe III contient les plaies dans lesquelles sont entrés des objets extérieurs et ont donc un haut risque d'infection. Les blessures par balles en sont l'exemple le plus fréquent.
- Enfin, la classe IV regroupe les plaies considérées comme sales et contaminées, comme les plaies ayant été en contact avec de la matière fécale par exemple.

Les plaies traumatiques quant à elles sont involontaires, les dégâts sont plus souvent importants, et le risque d'infection est élevé. Elles sont généralement classées selon leur origine :

- Mécanique :
  - Abrasion : elle se produit quand la peau est frottée ou grattée contre une surface dure ou rugueuse. Elle conduit à une perte des couches les plus externes de l'épiderme. Il n'y a habituellement pas de gros saignement.
  - Piqûre : c'est un petit trou causé par un objet long et pointu, les dégâts peuvent être plus ou moins importants en fonction de la profondeur de la piqûre et des organes touchés.

- Coupure / Incision : brèche créée par un objet tranchant qui peut être plus ou moins profonde.
- Ecrasement : force extérieure exerçant une pression suffisante pour léser les tissus internes : elle cause des hématomes.
- Lacération : il s'agit d'une déchirure plus ou moins profonde de la peau. Les bords de la plaie sont irréguliers, et le saignement est plus ou moins important en fonction de la profondeur.
- Avulsion : déchirure partielle ou complète de la peau et des tissus sous-jacents survenant lors d'accidents violents comme une explosion.
- Blessure par balle : Ce type de blessure combine une brûlure autour de la zone d'impact et une déchirure profonde des tissus en forme de tunnel.
- Morsure : blessure dépendant des dents et de la force exercée. Il peut y avoir un déchirement des tissus, un écrasement, une fracture osseuse et un risque d'infection élevé.
- Chimique :
  - Acide : induit une précipitation des protéines, allant de l'irritation à la nécrose en fonction de la concentration.
  - Basique : induit une dissolution des protéines, avec apparition de tissus nécrotiques qui se liquéfient.
- Radiations : dépendant de la quantité de radiation et du temps d'exposition : lésions de type érythème, dermatite, nausées, fibrose et ulcères.
- Température :
  - Brûlure par le chaud : plusieurs degrés de gravité en fonction de la profondeur : variant du 1<sup>er</sup> degré quand l'épiderme seul est touché, au 4<sup>ème</sup> degré lorsque la peau, le tissu sous-cutané, les muscles et les os sont touchés. Elles résultent en une perte d'eau et de chaleur.
  - Brûlure par le froid : en fonction de la température et du temps d'exposition, les plaies vont de la rougeur à la gangrène conséquente.

La cicatrisation est un processus ordonné dans le temps et l'espace qui conduit à une restauration de l'intégrité fonctionnelle et anatomique de la peau, dont la durée est

dépendante de la profondeur, de la taille et de la gravité de la blessure (Bowler et al., 2001; Lazarus, 1994).

### 1.2.2. Les plaies chroniques

Les plaies chroniques sont des plaies dont le processus de cicatrisation n'est plus ordonné et conduit à une cicatrisation anormalement longue ou à une structure anatomique finale anormale ou non fonctionnelle. Les causes d'apparition les plus courantes de ces plaies peuvent être d'origine endogène (insuffisance veineuse, artériopathie, état métabolique diabétique) ou exogène (pression chronique). Par ailleurs, l'obésité, un âge avancé ou le tabagisme sont des facteurs aggravant reconnus de chronicité. Les plaies chroniques les plus fréquentes sont les escarres (liées à la position couchée), le syndrome du pied diabétique et l'ulcère de la jambe (Morton and Phillips, 2016).

L'ulcère veineux de la jambe représente 50 à 70 % des ulcères de la jambe. Il est causé par une insuffisance veineuse chronique et peut s'accompagner d'enflures et de la cambrure du membre. Il est souvent retrouvé entre le mi-mollet et la cheville, peut être simple ou multiple, souvent peu profond et de forme irrégulière.

L'ulcère artériel de la jambe représente 25 % des ulcères de la jambe. Il est causé par une athérosclérose qui induit une oxygénation inadéquate de la peau et une dégradation des tissus. Il existe de nombreux facteurs de risque tels que le diabète, l'obésité, l'hypertension, ou le tabagisme. Il conduit à une claudication et des douleurs, souvent accompagnées d'une perte des poils et d'une atrophie de la peau.

L'ulcère du pied diabétique touche 4 à 10 % des diabétiques, et est responsable de la majorité des hospitalisations et amputations chez ces patients. Le diabète induit une transpiration insuffisante et une altération de la régulation du débit sanguin, ce qui conduit à une mauvaise oxygénation des extrémités, une chaleur et un assèchement de la peau, aboutissant alors à une fragilisation et une dégradation de celle-ci.

Les ulcères de pression (escarres) sont des tissus nécrosés plus ou moins profonds, apparaissant suite à une pression exogène localisée et chronique. Ils sont retrouvés dans les cas de mobilité réduite (inconscience prolongée, paralysie, malnutrition ...).

D'autres pathologies peuvent être à l'origine de plaies chroniques, comme les vascularites ou les vasculopathies. Dans tous les cas, ces pathologies conduisent à une dégradation de la peau qui ne parvient plus à cicatriser de façon efficace du fait du caractère chronique de l'étiologie de la plaie.

Les plaies aiguës peuvent également devenir chroniques, et sont considérées comme tel quand elles ne sont pas cicatrisées après 30 jours. C'est le cas des blessures infectées ou qui se rouvrent (Oliverio et al., 2016).

### 1.3. La cicatrisation cutanée

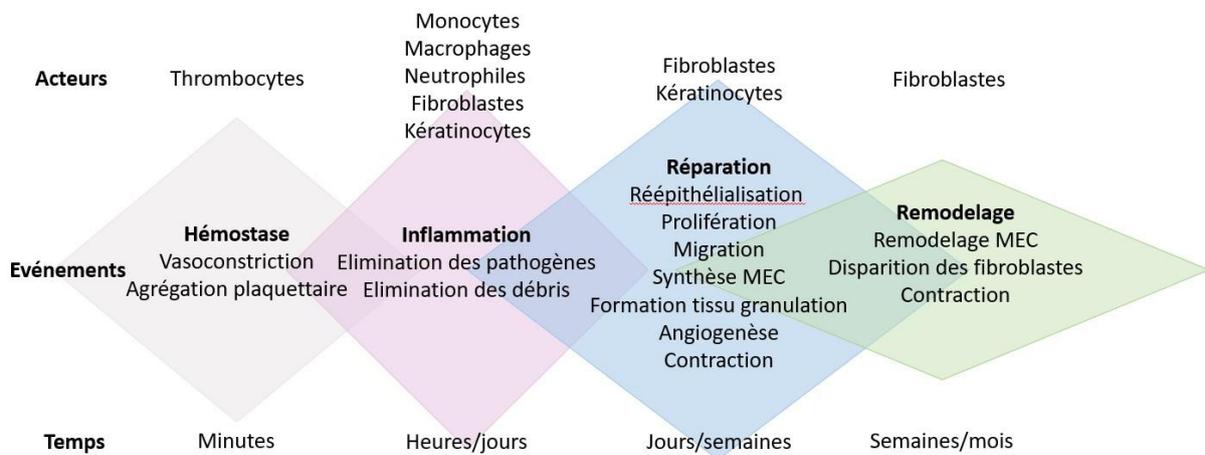
La cicatrisation est un processus évolutif conservé mais qui est toutefois différent selon l'espèce. Alors que certains vertébrés, comme le zebrafish, ont la capacité de régénérer parfaitement leur peau, la cicatrisation chez l'humain conduit à un tissu cicatriciel sans appendices et visuellement différent du tissu initial. Dans le cas de grandes cicatrices visibles, cela peut conduire à des conséquences psychologiques désastreuses, ainsi qu'à des capacités fonctionnelles, sensorielle ou de thermorégulation réduites, ce qui nuit considérablement à la qualité de vie (Takeo et al., 2015). Ainsi, il est essentiel de mieux comprendre le fonctionnement de ce processus afin de pouvoir l'améliorer en cas de besoin.

La cicatrisation prend place très rapidement après une lésion et dure en général moins de 4 semaines, mais peut durer jusqu'à plusieurs mois, voire plusieurs années. Elle est composée de plusieurs phases se chevauchant dans le temps et l'espace et faisant intervenir de nombreux acteurs et facteurs cellulaires (Figure 5) :

- Les phases d'hémostase et d'inflammation sont souvent décrites ensemble car concomitantes. Elles débutent dans les secondes suivant la blessure et persistent plusieurs jours. L'hémostase permet de colmater la plaie et d'arrêter le saignement. La phase d'inflammation active et recrute de nombreuses cellules immunitaires qui permettent d'éradiquer l'agent causal et de préparer le lit de la plaie aux phases suivantes.
- Après quelques jours, la phase de réparation (aussi appelée phase de prolifération) prend place. Les cellules résidentes de la peau (fibroblastes et kératinocytes) colonisent le lit de la plaie : elles y synthétisent une matrice qui va servir de support

durant tout le processus de cicatrisation ; le réseau vasculaire est rétabli, la plaie se contracte et est réépithélialisée.

- Enfin, au cours des semaines suivantes, la phase de remodelage débute. La matrice extracellulaire est réorganisée afin de fournir à la peau une structure plus proche de celle qu'elle avait avant la blessure.



**Figure 5 : La cicatrisation : les différentes phases et cellules impliquées**

*Il n'y a pas aujourd'hui de consensus pour décrire les différentes phases de la cicatrisation et leur chevauchement. Dans cette représentation, les phases d'hémostase et d'inflammation sont séparées, mais elles sont souvent décrites ensemble (Adaptée d'après Shedoeva et al., 2019)*

### 1.3.1. Phase inflammatoire

La phase inflammatoire est la première phase intervenant dans le processus de cicatrisation. Elle est caractérisée par deux processus concomitants : l'hémostase et l'inflammation.

**L'hémostase** permet de limiter l'hémorragie et de créer une matrice temporaire pour aider les autres acteurs cellulaires. Elle prend place tout de suite après une blessure, où les molécules de collagène exposées au traumatisme initient alors la cascade de coagulation. Les thrombocytes s'agrègent et déclenchent une vasoconstriction temporaire des vaisseaux endommagés permettant ainsi d'arrêter le saignement. Les thrombocytes sécrètent des chimiokines comme l'Epidermal growth factor (EGF) et le Platelet Derived Growth Factor (PDGF), de la fibronectine et du fibrinogène, entre autres, facilitant la formation d'un caillot. Ce caillot permet de colmater rapidement la plaie et de former une matrice provisoire qui servira de support pour aider la migration des différents acteurs cellulaires pour la réparation. Les chimiokines sécrétées permettent non seulement de recruter et activer les macrophages

et fibroblastes, mais aussi d'activer la cascade du complément, ce qui stimule les cellules inflammatoires et tue les bactéries (Reinke and Sorg, 2012; Sinno and Prakash, 2013).

**L'inflammation** conduit à l'activation du système immunitaire inné, et prend place quelques minutes après la blessure. Durant cette phase, plusieurs signaux de dangers sont exposés :

- Les « DAMPs » (Damage Associated Molecular Patterns) : ce sont des molécules libérées par les cellules stressées ou lésées qui sont engagées dans un processus de mort cellulaire rapide de type nécrose. Ce sont des protéines cytoplasmiques ou nucléaires comme HMGB1 (Chromatin-associated protein high mobility group box 1) ou les molécules de la famille S100. Dans le cas d'une peau lésée, ce sont les cellules résidentes (fibroblastes et kératinocytes majoritairement) qui vont libérer ces signaux.
- Les « PAMPs » (Pathogens Associated Molecular Patterns) : ce sont des molécules spécifiques de pathogènes, hautement conservées et essentielles pour leur survie. Les polysaccharides bactériens comme le Lipo Polysaccharide (LPS), l'ADN bactérien ou les ARN double brin en sont des exemples. Ces PAMPs sont introduits directement dans la plaie lors de la blessure (par exemple une coupure avec un objet sale ou non stérile) ou par colonisation par le microbiote de l'environnement extérieur ayant accès au lit de la plaie.

Ces signaux de dangers sont reconnus par des récepteurs spécifiques appelés Pattern Recognition Receptor (PRR) qui contiennent plusieurs types de récepteurs dont les Toll-like receptors (TLR) sont les mieux caractérisés. Les PRR sont retrouvés au niveau extracellulaire, membranaire ou intracellulaire de divers types cellulaires : les cellules résidentes de la peau (fibroblastes et kératinocytes), ainsi que les cellules du système immunitaire inné (macrophages, cellules dendritiques, cellules Natural killer (NK), et les polynucléaires). Ces récepteurs conduisent à l'activation des voies de signalisation comme la voie du facteur de transcription Nuclear Factor kappa B (NF- $\kappa$ B) et la voie des Mitogene-Activated Protein Kinases (MAPK).

L'activation de ces voies de signalisation conduit à la synthèse de nombreuses cytokines, dont les interleukines (IL) telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, et le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ). Ces cytokines vont attirer les cellules inflammatoires et stimuler les cellules voisines

qui vont à leur tour produire des chimiokines. Toutes ces cytokines et chimiokines conduisent localement à l'initiation et l'entretien de la réponse inflammatoire locale (Kaisho and Akira, 2006; Takeuchi and Akira, 2010, Landén et al., 2016).

Les kératinocytes ont, de plus, la capacité de produire des peptides antimicrobiens (AMP) de façon constitutive et de façon plus importante dans des conditions inflammatoires. Il existe 2 familles d'AMP sécrétées par les kératinocytes : les Human  $\beta$ -Defensin (hBDs) et les cathélicidines humaines (hCAP18/LL-37). Ces AMP ont des propriétés cytotoxiques directes et induisent également l'expression de cytokines pro-inflammatoires conduisant à la chimio-attraction des cellules immunitaires adaptatives (Strbo et al., 2014).

Simultanément, la perméabilité endothéliale est augmentée et les vaisseaux sanguins sont dilatés sous l'effet de médiateurs tels que l'histamine libérée par les mastocytes. L'association de ce phénomène avec la production de toutes les cytokines précédemment décrites, établie selon un gradient de concentration, permet l'afflux de leucocytes sur le site.

Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires recrutées (via l'IL-8 et les DAMPs notamment). Ils phagocytent les pathogènes puis les tuent ensuite grâce à la libération de formes réactives de l'oxygène, de protéases et de protéines antimicrobiennes. Ils sont également capables de tuer des pathogènes extracellulaires via les Neutrophil extracellular traps (NETs) qui forment une structure en réseau constituée de chromatine décondensée liée à des protéines bactéricides. Les NETs agissent en tuant les pathogènes directement ou en les piégeant physiquement dans leurs mailles, permettant la phagocytose de tout le complexe. Les neutrophiles phagocytent également les débris cellulaires et produisent des cytokines qui amplifient la réponse inflammatoire, ainsi que des substances antimicrobiennes qui permettent la détersion de la plaie. Bien que les neutrophiles soient très utiles au phénomène de cicatrisation, une présence trop longue ou en trop grande quantité peut au contraire être délétère (Ellis et al., 2018).

Les monocytes recrutés se différencient en macrophages pro-inflammatoires de type M1 et nettoient la plaie par phagocytose. Ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires permettant le recrutement et l'activation d'autres leucocytes, comme les monocytes et les cellules NK. Ils

changent ensuite de phénotype au profit des macrophages M2 qui expriment des médiateurs anti-inflammatoires (antagonistes du récepteur à l'IL-1, IL-10) et des facteurs favorisant la prolifération des fibroblastes, la synthèse de la matrice extracellulaire et l'angiogenèse (Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), Vascular endothelial growth factor (VEGF), Insulin-like growth factor (IGF1)). Ils induisent également l'apoptose des neutrophiles et phagocytent leurs débris. La transition M1-M2 des macrophages est essentielle pour la résolution de l'inflammation et le passage à la phase de cicatrisation suivante. Les macrophages sont souvent considérés comme le type de cellules immunitaires le plus important dans le processus de cicatrisation (Ellis et al., 2018).

Des cellules NK sont également recrutées dans le lit de la plaie, leur rôle et implication sont aujourd'hui encore méconnus dans le contexte de la cicatrisation cutanée mais des hypothèses basées sur leurs fonctions connues dans d'autres contextes sont avancées. Les macrophages activent les cellules NK, induisant une production de cytokines (Interféron (IFN) gamma (IFN- $\gamma$ ) et TNF- $\alpha$ ) et une cytotoxicité. Cette activation conduit à la stimulation d'autres cellules immunitaires et à l'élimination des pathogènes intracellulaires. Les cellules NK participeraient donc à la cicatrisation en maintenant l'inflammation et en éliminant les pathogènes (Liippo et al., 2010).

Différents facteurs de croissance et des cytokines (PDGF, TGF- $\beta$ , Fibroblast Growth Factor beta (FGF- $\beta$ ), VEGF, TNF- $\alpha$ , Growth regulated oncogene alpha (GRO $\alpha$ )...) sont également produits lors de cette phase par les cellules résidentes ou les cellules infiltrées. Ils sont retenus dans la matrice provisoire, qui servira de réservoir pour la phase suivante (Werner and Grose, 2003).

### 1.3.2. Phase de réparation

Généralement, 3 jours après la blessure, sous l'influence des facteurs sécrétés, la phase de réparation débute : cette phase est essentielle pour la formation d'une nouvelle barrière fonctionnelle au cours des jours suivants. Plusieurs événements majeurs la constituent : reconstitution du réseau vasculaire, formation du tissu de granulation, contraction et réépithélialisation de la plaie. Ces événements sont concomitants et sont tous influencés les uns par les autres (Figure 6).



intervenants cellulaires. Les facteurs solubles vont également stimuler les fibroblastes à produire des molécules qui vont à leur tour activer les kératinocytes afin de favoriser la réépithélialisation.

#### 1.3.2.2. La réépithélialisation

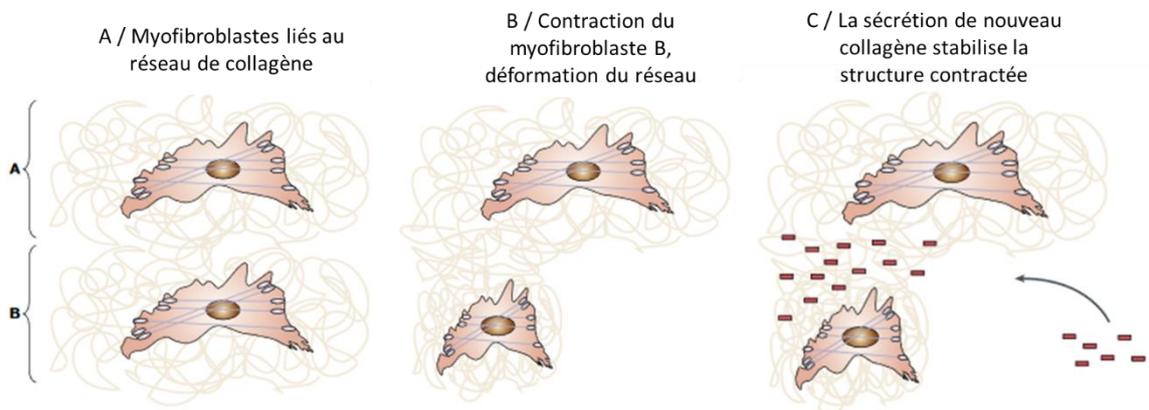
La réépithélialisation requiert la prolifération et la migration des kératinocytes. Elle est influencée par les fibroblastes et les macrophages M2 présents dans le tissu de granulation. Elle est initiée par des facteurs de croissance tels que l'EGF, le Keratinocyte growth factor (KGF) et le TGF $\alpha$  qui sont produits par les thrombocytes, kératinocytes, fibroblastes et macrophages M2. Les kératinocytes qui permettent la réépithélialisation sont issus de plusieurs populations de cellules souches épithéliales : les kératinocytes de la couche basale, les cellules souches épithéliales interfolliculaires et les cellules souches épithéliales du bulge du follicule pileux (Lau et al., 2009). Ainsi, les kératinocytes des marges de la plaie et les cellules souches épithéliales migrent progressivement sur la membrane basale et la matrice en cours de formation vers le centre de la plaie. Ils se mettent ensuite à proliférer et à se différencier afin de recouvrir toute la plaie et assurer une réépithélialisation progressive et efficace (Landén et al., 2016). Les kératinocytes produisent également des molécules (fibronectine, ténascine C, laminine) qui vont stimuler les fibroblastes à produire la nouvelle MEC, conduisant ainsi à une boucle d'activation paracrine (Ellis et al., 2018).

#### 1.3.2.3. L'angiogenèse

Durant la phase de prolifération, les macrophages M2 représentent la population cellulaire dominante et coordonnent les interactions entre les cellules endothéliales, les fibroblastes, les kératinocytes, et la MEC. Cette forte activité cellulaire couplée à la diminution de l'apport sanguin, induit un milieu hypoxique au sein de la plaie qui représente un stimulus majeur de l'angiogenèse. L'hypoxie conduit à la production de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, en formant un gradient de concentration qui va permettre la migration des cellules endothéliales à partir des vaisseaux sains et qui sont soutenues par les nouveaux composants de la MEC. Les vaisseaux néoformés sont ensuite anastomosés afin de reconstituer un réseau vasculaire fonctionnel du tissu en cours de réparation (Cañedo-Dorantes and Cañedo-Ayala, 2019; Li et al., 2007).

#### 1.3.2.4. Contraction de la plaie

Progressivement, en réponse aux forces de tension et au TGF- $\beta$  produit localement, les fibroblastes s'activent et se différencient en myofibroblastes. Ils expriment fortement l' $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) qui conduit à la formation de grosses fibres de stress responsables d'importantes forces. Dans ces conditions, les myofibroblastes produisent eux-mêmes du TGF- $\beta$  conduisant à une boucle d'auto-activation. Les fibres de stress composées de gros filaments d'actine, forment un complexe intracellulaire relié au collagène et à la fibronectine extracellulaire via des protéines transmembranaires (intégrines). Ce système de mécanotransduction permet aux myofibroblastes de transmettre les forces générées à la MEC environnante. Ainsi, la contraction des fibres de stress induit une contraction de la MEC qui crée des espaces vides, comblés par le collagène produit par les myofibroblastes (Figure 7).



**Figure 7 : Contraction de la MEC par les myofibroblastes**  
(Adaptée d'après Tomasek et al., 2002)

Ces effets sont localisés mais avec le nombre croissant de myofibroblastes dans la plaie, ils aboutissent à une fermeture de la plaie progressive et à un tissu de granulation riche en collagène. Les myofibroblastes, dans un environnement riche en collagène, diminuent progressivement leur production de collagène et ce, même en présence de TGF- $\beta$  : la phase de prolifération prend alors fin (Greaves et al., 2013).

#### 1.3.3. Phase de remodelage

Quelques semaines après la blessure, une fois que le caillot de fibrine est complètement remplacé par le tissu de granulation, la phase de remodelage prend place et peut durer jusqu'à plusieurs années. Elle se caractérise principalement par un changement de composition de collagène.

La composition en collagène de la MEC est modifiée, les macrophages M2 et les myofibroblastes produisent des MMP, ainsi que leurs régulateurs les TIMPs (Visse and Nagase, 2003). Ces molécules permettent de dégrader de façon contrôlée le collagène III synthétisé pendant la formation du tissu de granulation. Ce type de collagène présente l'avantage d'être rapide à synthétiser et est donc produit en premier lieu, mais n'est pas aussi résistant à la traction que les fibres de collagène I présentes naturellement et majoritairement dans le derme. Ainsi, le collagène III est progressivement remplacé par du collagène I, donnant à la peau une résistance à la traction de plus en plus importante jusqu'à atteindre 70-80 % de la capacité pré-lésionnelle (Ellis et al., 2018). Lorsque le remodelage prend fin, les myofibroblastes disparaissent soit par apoptose, soit en se différenciant en adipocytes. Une diminution progressive des nombreux vaisseaux sanguins est également observée.

La cicatrice ainsi produite ne comporte cependant pas les appendices normalement présents dans la peau : follicules pileux, glandes sébacées et sudoripares (Landén et al., 2016). Ces derniers seront progressivement reconstitués au cours des mois qui suivent, si et seulement si la lésion n'est pas trop importante, et si les cellules souches assurant leur croissance sont présentes et opérationnelles.

#### **1.4. Altérations de la cicatrisation**

Ainsi, la cicatrisation est un mécanisme finement régulé dans l'espace et le temps : dès lors, l'altération de l'un de ses acteurs peut induire un retard de cicatrisation, une cicatrisation non efficace, excessive ou bien chronique.

Avec l'âge, des altérations cellulaires et moléculaires apparaissent, induisant souvent un retard de cicatrisation et une phase de remodelage altérée. Les études précédentes du laboratoire (Brun et al., 2016) ont montré que les fibroblastes issus de donneurs âgés ont une capacité d'activation, de migration et de contraction réduite, sont plus sensibles au stress oxydatif et produisent moins de composants de la MEC. Ces modifications peuvent, pour la plupart, favoriser les défauts de cicatrisation et les changements morphologiques cutanés visibles avec l'âge.

A l'inverse, des défauts de cicatrisation peuvent également conduire à une cicatrisation excessive. Cela conduit à des cicatrices hypertrophiques ou à la formation de chéloïdes. Dans ce cas, la cicatrice peut être douloureuse, conduire à un prurit et à une apparence disgracieuse provoquant souvent un mal-être chez le patient.

## 1.5. Traitements des plaies

### 1.5.1. Les différentes stratégies d'aide à la cicatrisation

Il existe aujourd'hui de nombreuses stratégies d'aide à la cicatrisation, quel que soit le type de plaies (aigüe, chronique, traumatique, ou chirurgicale), par exemple (Oliverio et al., 2016) :

- Le débridement : il peut être précis, chirurgical, autolytique, enzymatique, ou mécanique. Il a pour but de retirer, entre autres, l'exsudat, les tissus nécrosés et le biofilm bactérien qui gêne la cicatrisation.
- Les pansements : couche de contact, hydrocolloïde, film transparent, hydrogel, mousse, alginate ou antimicrobien. Avec des modes d'actions propres à chaque type, les pansements permettent de retirer l'excès d'exsudat, d'assurer la détersion de la plaie, de maintenir un environnement humide, de prévenir les infections et de favoriser la cicatrisation.
- Les applications topiques : crème, gel, spray, onguents. A base d'actifs efficaces, elles permettent de réparer, apaiser, assainir, et de limiter la perte en eau des plaies.
- Les thérapies avancées de nature variée permettant d'accélérer la cicatrisation : pression négative, compression, bioingénierie, oxygénothérapie hyperbare, facteurs de croissance, greffe.

### 1.5.2. La médecine traditionnelle chinoise

La médecine traditionnelle chinoise (MTC) a une façon particulière de voir l'univers et ses relations, c'est en quelque sorte une philosophie. Elle est basée sur un ensemble de théories et de pratiques visant à maintenir l'harmonie de l'énergie à l'intérieur du corps ainsi qu'entre le corps et les éléments extérieurs. Selon cette médecine, tout ce qui nous entoure et nous constitue est essentiellement le fruit d'une même composante fondamentale : le Qi (prononcé tchi). C'est un flux énergétique qui circule dans le corps au moyen d'un réseau immatériel de voies appelées méridiens, dont le débit peut être régularisé à l'aide des points

d'acupuncture. Pour que l'organisme soit en bonne santé, le Qi doit être en quantité suffisante et bien circuler. L'équilibre est constamment en mouvement entre deux forces opposées : le Yin (négative) et le Yang (positive). Le Yin représente les forces de type passif (ombre, froid, profondeur, humidité...) tandis que le Yang représente les forces de type actif (lumière, chaud, surface, sécheresse...). La médecine traditionnelle chinoise considère la maladie comme un déséquilibre des forces. En conséquence, elle soigne le tout, l'être humain dans sa globalité, plutôt que de traiter un organe de façon isolée. La MTC a recours à 5 pratiques principales : l'acupuncture, la pharmacopée chinoise, la diététique chinoise, le massage Tui Na et les exercices énergétiques. L'utilisation d'herbes médicinales dans la MTC a été largement documentée pour le traitement de nombreuses maladies, comme les plaies cutanées notamment (Chak et al., 2013). Pour exemple, l'*Aloe vera* est l'une des plantes utilisées depuis plus de 5000 ans pour traiter les plaies en MTC mais aussi de par le monde par différents peuples anciens (Égyptiens, Romains, Africains, Asiatiques et Amérindiens/Américains). Grâce à ses activités antimicrobiennes et pro-inflammatoires, cette plante permet une meilleure cicatrisation (Shedoeva et al., 2019). D'autres plantes pourraient également être efficaces dans ce domaine, telles que l'*Ophiopogon japonicus*.

#### 1.5.2.1. *Ophiopogon japonicus*

L'*Ophiopogon japonicus* (aussi appelé *Ophiopogonis Radix*, muguet du Japon ou barbe de serpent) est très utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise. C'est une plante herbacée vivace dotée de petites fleurs pendantes en début d'été, suivies de baies bleues non comestibles (Figure 8). La racine d'*Ophiopogon japonicus* était utilisée initialement pour traiter la stagnation du Qi dans le cœur mais son utilisation s'est élargie pour nourrir le Yin des poumons, du cœur, de l'estomac et de la rate. Elle est réputée promouvoir la production des liquides biologiques, humidifier les organes et apaiser l'esprit. Elle est utilisée pour traiter la sécheresse pulmonaire (toux, pharyngite ...), les abcès pulmonaires, les menstruations ou lactations insuffisantes, ou encore l'insuffisance cardiaque et pulmonaire entre autres. Chen et al., (2016) ont collecté toutes les informations de diverses ressources concernant cette plante : livres sur les herbes chinoises, *google scholar*, *sciFinder*, *web of science*, Elsevier, ACS, Pubmed et « China Knowledge Resource Integrated » (CNKI). Ils ont recensé de nombreuses activités pharmacologiques telles qu'une protection cardiovasculaire, une immunomodulation, une action anti-inflammatoire, anti-cancéreuse, antioxydante,

antimicrobienne, antitussive et anti-diabétique. Bien que l'utilisation d'*Ophiopogon japonicus* ne soit pas décrite dans la littérature chinoise pour le soin cutané, un brevet a été déposé en 2008 par Sylab (Société Industrielle Limousine D'application Biologique) sous le nom de Cohesium®, pour une utilisation cosmétique en hydratation/réparation de la peau. Nous n'avons pas trouvé de données publiées attestant de son efficacité dans ce domaine. Cela pourrait expliquer la raison pour laquelle, un des clients de ce fournisseur d'actifs nous a mandatés pour caractériser plus avant les effets biologiques de Cohesium® sur les différentes composantes de la peau, parallèlement à 7 autres produits issus de plantes utilisées en MTC.



**Figure 8 : Photographies d'*Ophiopogon japonicus***

## 2. Objectifs du projet

L'objectif de ce projet est d'étudier la modulation pharmacologique de la cicatrisation cutanée par des composants issus de plantes utilisées en médecine traditionnelle chinoise. Huit produits d'origine naturelle utilisés en phytothérapie ont été sélectionnés de façon empirique sur leur effet bénéfique en application topique. Dans notre étude, ils sont testés sur deux types cellulaires clés de la peau : les fibroblastes et les kératinocytes, afin de déterminer leur effet sur les différents mécanismes impliqués dans le processus de réparation cutanée. Nous avons fait le choix de ne présenter les résultats que pour l'un des produits testés : un extrait de racine d'*Ophiopogon japonicus*, Cohesium® (COHE). En effet ce produit a donné les résultats préliminaires les plus prometteurs concernant la cicatrisation, et nous avons approfondi davantage l'étude de ce produit *in vitro*.

Deux axes ont été étudiés :

- Un premier axe principal visant à évaluer l'effet de COHE sur les populations majoritairement présentes dans la peau et impliquées dans le phénomène de cicatrisation. Des cultures primaires de fibroblastes et de kératinocytes ont été utilisées dans ce but. Dans un premier temps, la cytotoxicité de COHE a été évaluée afin de déterminer une gamme de concentrations non toxiques utilisable. Nous avons ensuite observé l'effet de COHE sur différentes fonctions des fibroblastes : production de cytokines inflammatoires et angiogéniques, prolifération, fermeture de plaie, activation en myofibroblastes, synthèse de composants de la MEC, MMP et TIMP, et contraction de lattices de collagène. Différentes fonctions des kératinocytes ont également été étudiées en présence de COHE : production de cytokines inflammatoires, prolifération et migration. Enfin des explants de peau saines ont été utilisés *ex vivo* afin d'observer l'effet des produits sur sa structure.
- Un axe secondaire cherchant à déterminer si ce produit peut être utile pour favoriser la cicatrisation cutanée chez des personnes âgées. En effet, ces dernières sont souvent victimes de cicatrisations retardées ou peu efficaces. Dans un premier temps, les différentes fonctions des fibroblastes obtenus à partir de donneurs jeunes et âgés ont été évaluées afin de mettre en évidence celles qui étaient altérées avec l'âge. Dans un second temps, COHE a été mis en contact avec ces cellules afin de déterminer s'il pouvait restaurer ces fonctions.

•

### 3. Matériels et méthodes

#### 3.1. Produits testés

Dans le laboratoire, nous testons des extraits de plantes issus d'orchidées, de plantes vertes et de champignons. Sur les huit produits testés à ce jour, nous avons fait le choix de présenter les résultats obtenus pour le plus efficace : un extrait riche en fructosanes de tubercule d'*Ophiopogon japonicus* (Cohesium®) que nous appellerons COHE dans la suite de ce mémoire. Les fructosanes sont des polymères du fructose, un polysaccharide rattaché à une molécule de glucose. Ils sont trouvés naturellement dans plusieurs plantes aromatiques ou plantes médicinales telles que l'ail, l'artichaut, les graminées (notamment les grains d'orge jeunes) et le topinambour.

COHE nous est fourni sous forme liquide ; de cette solution mère (dite 100%), nous préparons différentes dilutions extemporanément dans le milieu de culture adéquat pour les types cellulaires testés.

#### 3.2. Culture cellulaire

Les cultures de fibroblastes et de kératinocytes sont établies à partir de peaux obtenues lors de chirurgie plastique mammaire. Il s'agit de dons de déchets post-opératoires par le service de chirurgie plastique du Pr. Mimoun à l'hôpital Saint-Louis, dont nous pouvons disposer après signature d'un consentement de non-opposition par les sujets volontaires opérés.

- Pour obtenir les fibroblastes, des fragments de peau dégraissée de 1 mm<sup>2</sup> sont déposés côté derme dans des boîtes de pétri de 60 mm de diamètre, puis mis en culture dans du milieu R10, composé de RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM de L-glutamine, 1 % d'antibiotiques, 25 µg/mL d'amphotéricine B, et 5 µg/mL de plasmocine. Après 3 semaines environ, les fibroblastes migrent des explants et prolifèrent pour former un tapis plus ou moins confluent. Les explants sont alors délicatement éliminés et les fibroblastes sont détachés par action de la trypsine à 0,05 % puis sontensemencés en flacons de culture à la densité de 13 000 cellules/cm<sup>2</sup> afin de les amplifier par « passages » (détachement et réensemencement) hebdomadaires. Ils sont utilisés jusqu'au 4<sup>ème</sup> passage.

- Pour les kératinocytes, des lambeaux de peau dégraissée sont incubés une nuit à 4°C en présence de trypsine 0,25 % afin de permettre la dissociation du derme et de l'épiderme. L'épiderme détaché est ensuite incubé 30 minutes à 37°C sous agitation dans un milieu de

Pucks contenant 10 % de SVF puis la suspension cellulaire obtenue est filtrée successivement à travers une compresse et un tamis de 100  $\mu\text{m}$ . Les cellules sont alors centrifugées avant d'êtreensemencées à la densité de 150 000 cellules/cm<sup>2</sup> en milieu KGM™ (Keratinocyte Growth Medium, Lonza) complémenté par de l'hydrocortisone, de la transferrine, de l'épinéphrine, de la gentamicine, du BPE (Bovine Pituitary Extract), du hEGF (Human Endothelial Growth Factor), et de l'insuline). Cinq pourcent de SVF sont également ajoutés durant les 24 premières heures de culture. Les kératinocytes sont ensuiteensemencés à la densité de 4 000 cellules/cm<sup>2</sup> en milieu KGM pour les passages suivants et sont utilisés jusqu'au 3<sup>ème</sup> passage.

### 3.3. Design expérimental

Les cellules sontensemencées dans les supports de cultures adéquats puis au moment voulu, COHE est ajouté à différentes dilutions de la solution stock considérée « 100% », comme indiqué dans le tableau 2.

**Tableau 2 : Spécifications de chaque analyse**

*F : fibroblastes, K : kératinocytes, Pxx : plaque x puits, BP60 : boîte de pétri de diamètre 60 mm, J : jour*

Test	Support	Nb cellules / puits	Dilutions COHE (%)	Jours d'analyse
MTT	P96	7 500 F	0,1 - 0,5 - 1 - 2,5 - 5 - 10	J2 et J5
		5 000 K	0,05 - 0,1 - 0,5 - 1 - 2,5 - 5 - 10	
DIOC6	P24	50 000 F	0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,5 - 1 - 5 - 10	J2 et J5
ARNm	P6	250 000 F	0,1 - 0,5 - 1 - 5	J1
ELISA	P6	250 000 F	0,1 - 0,5 - 1 - 5	J1
		300 000 K	0,1 - 0,5 - 1 - 5	
Prolifération	P96	2 500 F	0,5 - 1 - 5	J1 à J4
		5 000 K	0,5 - 1 - 5	
Migration	P96	10 000 F	0,5 - 1 - 5	J1 à J4
		20 000 K	0,5 - 1 - 5	
Cycle	BP60	250 000 F	0,5 - 1 - 5	J1
		100 000 K	0,5 - 1 - 5	
Lattices Collagène	P6	250 000 F	0,5 - 1 - 5	J1 à J7
Immunofluorescence	Labtek	3 500 F	0,5 - 1 - 5	J2
	P6	Peau 0,5cm <sup>2</sup>	1 - 5	J1

Dans certaines expériences, nous reproduisons l'activation des fibroblastes en myofibroblastes qui a lieu durant la cicatrisation, par l'ajout de TGF- $\beta$  à 5 ng/mL. Le TGF- $\beta$  se lie aux protéines et peut alors être neutralisé par les protéines du SVF (présentes en grande quantité). Il est donc nécessaire d'ajouter une étape de déprivation qui consiste à réduire la concentration de SVF à 0,5 % dans le milieu de culture (ce milieu est alors appelé R0,5). Les cellules sont déprivées une nuit avant l'ajout de COHE, dilué en R0,5, en présence ou non de TGF- $\beta$ .

De même, afin de mimer l'inflammation lors de la cicatrisation, les kératinocytes sont stimulés dans certaines expérimentations avec du TNF- $\alpha$  (10 ng/mL).

### 3.4. Méthodes

#### 3.4.1. Viabilité

La viabilité des cellules est étudiée selon deux techniques :

- Le test MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) : c'est un essai colorimétrique indicateur de l'activité métabolique cellulaire. Les enzymes dépendantes du NAD(P)H telles que l'oxydoréductase et la déshydrogénase réduisent le MTT qui forme alors un précipité insoluble violet : le formazan. Les cellules sontensemencées puis les dilutions de COHE sont ajoutées après 24 heures. Après 2 et 5 jours de culture, le MTT est ajouté dans chaque puits à la concentration finale de 0,5 mg/mL et est incubé 4 h à 37°C. Le formazan est ensuite dissout par addition de DMSO pur puis une mesure de la densité optique est réalisée à 550 nm (MultiSkan FC, ThermoFisher). Le signal est directement proportionnel à la viabilité / activité cellulaire.
- L'analyse par cytométrie en flux du marqueur DIOC6 (3,3'-Diethyloxcarbocyanine) couplé à l'iodure de propidium (IP) : elle permet d'évaluer l'intégrité mitochondriale de la cellule par mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Le DIOC<sub>6</sub> est une carbocyanine amphiphile avec une charge positive délocalisée qui s'accumule à l'intérieur des mitochondries (chargées négativement). Les cellules fortement marquées par le DIOC<sub>6</sub> indiquent donc un potentiel transmembranaire mitochondrial intact. La diminution de cette fluorescence se traduit par une diminution de l'accumulation du marqueur dans les mitochondries et donc une perte

du potentiel transmembranaire mitochondrial souvent associée à une progression de la cellule vers l'apoptose plus ou moins irréversible. Le marquage par l'IP démontre quant à lui une mort de la cellule lorsqu'il est positif. Les cellules sontensemencées et cultivées 24 heures avant d'ajouter les différentes dilutions de COHE. Après 2 et 5 jours de culture, les cellules sont détachées par action de la trypsine et marquées avec 0,1  $\mu\text{M}$  de DIOC<sub>6</sub> en R10 pendant 30 minutes à 37°C puis avec l'IP à 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Les cellules sont analysées rapidement au cytomètre en flux (BD FACSCalibur).

### 3.4.2. Expression d'ARNm par RTqPCR

Les fibroblastes sontensemencés puis déprivés en R0,5 après 48 heures de culture, pour une nuit. Ils sont ensuite activés en myofibroblastes avec du TGF- $\beta$  (5 ng/mL) pendant 24h en présence de COHE. Les cellules sont lavées une fois en PBS puis les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen) et dosés par spectrophotométrie (Nanodrop 2000c, ThermoScientific). La transcription inverse (RT) est réalisée à partir de 250  $\mu\text{g}$  d'ARN avec le Reverse Transcription Master Mix Kit (Fluidigm). Les produits de RT sont dilués au 1/5 et la réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative est réalisée avec 5  $\mu\text{L}$  de cDNA (ADN complémentaire, produit de la RT) et 15  $\mu\text{L}$  d'un mélange contenant les amorces des gènes d'intérêt (400 nM final par amorce, Tableau 3) et le PowerSYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystem). Le thermocycleur « 7300 Real Time PCR System » d'Applied Biosystems est utilisé pour générer 35 cycles d'amplification, suivis d'une étape de dissociation afin de vérifier la présence d'un seul produit de PCR sur la courbe de dissociation. Les résultats de qPCR sont normalisés sur le gène de ménage  $\beta$ -2-microglobuline (B2M).

**Tableau 3 : Séquences des primers utilisés pour les qPCR**

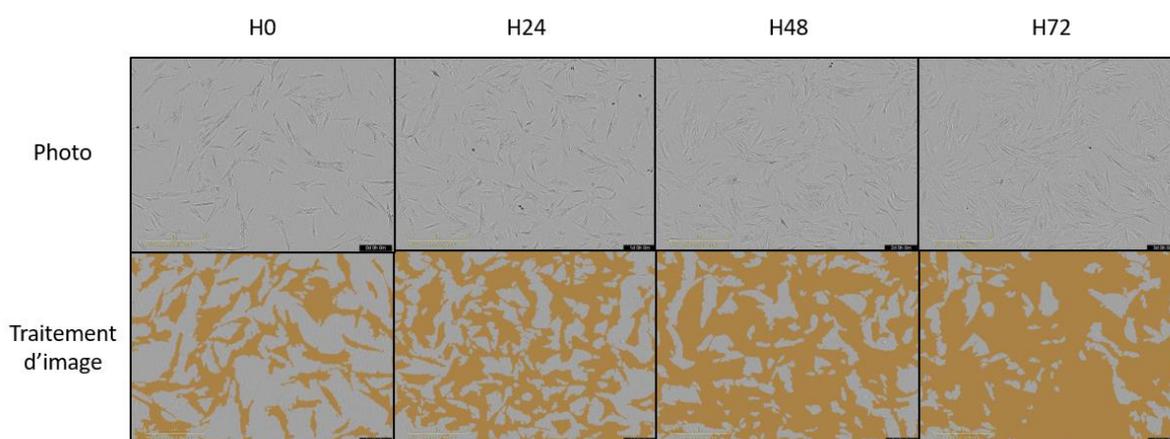
Gène	Séquence Sens 5' → 3'	Séquence antisens 5' → 3'
B2M	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT
COL1A	GGGCAAGACAGTGATTGAATACAA	ACGTCGAAGCCGAATTCCT
TGF- $\beta$ 1	GGGAAATTGAGGGCTTTTCG	GAACCCGTTGATGTCCACTTG
$\alpha$ SMA	GGCTGTTTTCCCATCCATTG	TGTCCCATTCCCACCATCA
COL3	GGAGCTGGCTACTTCTCGC	GGGAACATCCTCCTTCAACAG
MMP1	AAGCGTGTGACAGTAAGCTA	AACCGGACTTCATCTCTG
MMP3	GGGCCATCAGAGGAAATGAG	CACCGTTGGAGGGAAACCTA
TIMP1	CTGTTGTTGCTGTGGCTGATAG	CGCTGGTATAAGGTGGTCTGG

### 3.4.3. Quantification des cytokines (ELISA)

Les fibroblastes sont ensemencés, et après 48 heures de culture, sont déprivés en R0.5 pour une nuit ; ils sont alors activés en myofibroblastes par l'ajout de TGF- $\beta$  (5 ng/mL) pendant 24h en présence de COHE. Les kératinocytes à subconfluence sont activés avec 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  pendant 24h en présence de COHE. Les surnageants sont récupérés, centrifugés 5 minutes à 500 g pour éliminer les débris cellulaires puis conservés à -80 °C. Les cytokines libérées dans les surnageants sont dosées par ELISA Sandwich (Peprotech). Rapidement, un anticorps spécifique de la cytokine est adsorbé en P96 une nuit à température ambiante. Les puits sont lavés puis saturés en PBS-BSA 1 % (Bovine Serum Albumin) 1 heure minimum. Après lavages, les échantillons sont incubés pendant 2h, puis les puits sont lavés et l'anticorps de détection biotinylé est déposé et incubé pendant 2h. Une solution d'avidine-HRP est ensuite ajoutée pendant 30 minutes puis après lavages, le substrat ABTS est déposé. La réaction est suivie par mesure de la densité optique (DO) à 405 nm avec une correction à 650 nm jusqu'à ce que le point le plus fort de la gamme atteigne une DO avoisinant 1. L'équation de la courbe étalon est calculée, ce qui permet de déterminer la concentration en cytokines des échantillons en fonction de leur DO.

### 3.4.4. Prolifération

Les cellules sont ensemencées à faible densité puis différentes dilutions de COHE sont ajoutées lorsque la confluence avoisine les 30 %. Des photos sont réalisées toutes les heures par l'IncuCyte<sup>®</sup> S3 Live Cell Analysis System et la confluence des cellules est calculée par le

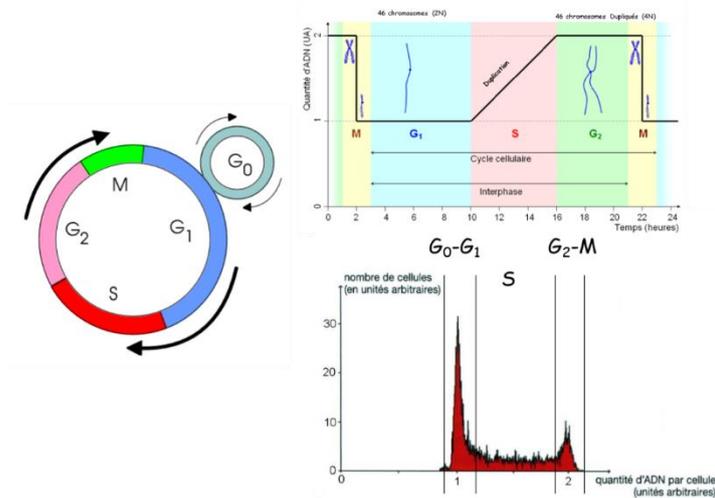


**Figure 9 : Analyse de la prolifération des fibroblastes par le système Incucyte<sup>®</sup> S3 Live Cell Analysis**  
Le logiciel détecte et calcule la surface occupée par les cellules (en orange) au cours du temps.

logiciel intégré (Figure 9). Le suivi de la prolifération est réalisé jusqu'à ce que les conditions contrôles atteignent 100 % de confluence.

### 3.4.5. Cycle cellulaire

L'analyse du cycle cellulaire est effectuée par un marquage à l'IP après perméabilisation : la fluorescence émise est alors proportionnelle à la quantité d'ADN, dépendante de la phase du cycle dans laquelle la cellule se trouve (Figure 10).



**Figure 10 : Cycle cellulaire**

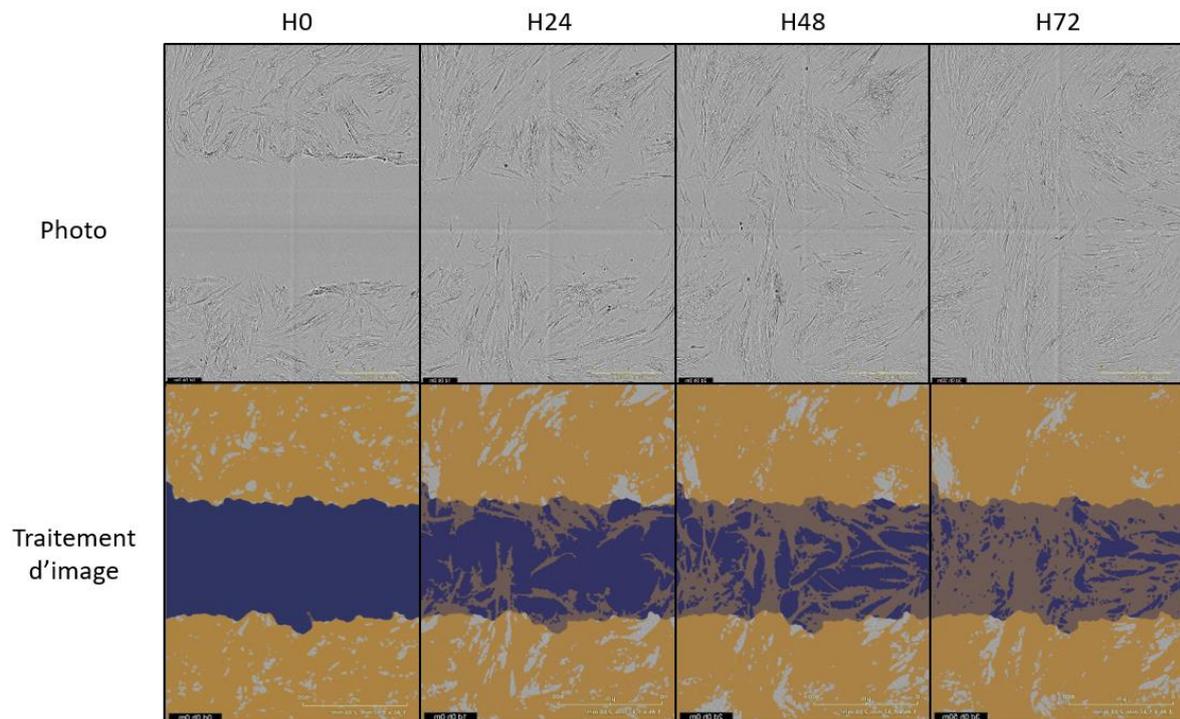
Représentation des différentes phases du cycle cellulaire (à gauche), de la quantité d'ADN variant en fonction des phases (en haut) et figure typique obtenue par cytométrie en flux (en bas).

Les cellules sontensemencées, puis après 24 heures de culture, le produit COHE dilué est ajouté pendant 24 heures. Les cellules sont décollées de leur support par trypsination puis sont lavées en PBS froid. La perméabilisation membranaire et nucléaire est réalisée avec de l'éthanol 70 % à 4°C pendant une heure, puis les cellules sont lavées deux fois en PBS. Les ARN sont éliminés par ajout de RNase à 10 µg/mL pendant 30 minutes à 37°C, puis après un lavage en PBS, une solution d'iodure de propidium est ajoutée à la concentration de 10 µg/mL pendant 30 minutes à 4 °C. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux.

### 3.4.6. Fermeture de plaie

Les cellules sontensemencées à forte densité de façon à obtenir un tapis de cellules le lendemain, puis une blessure (scratch) est réalisée de façon semi-automatique grâce à un peigne au format « 96 puits ». Les cellules sont lavées une fois en PBS afin d'éliminer les débris causés par le scratch, puis les différentes dilutions de COHE sont ajoutées. Des photos sont

réalisées toutes les heures par l'Incucyte® S3 Live Cell Analysis System et la surface occupée par les cellules (confluence) dans le scratch est calculée par le logiciel intégré (Figure 11). Les cellules migrent progressivement et envahissent la blessure, le suivi étant réalisé jusqu'à ce que les conditions contrôles atteignent 100 % de confluence dans le scratch. L'expérience étant réalisée sans antimétabolite, elle ne reflète pas seulement la migration, mais aussi la



**Figure 11 : Analyse de la migration des fibroblastes par le système Incucyte® S3 Live Cell Analysis**  
Le logiciel détecte le scratch (en violet) et calcule la surface occupée par les cellules (en orange) à l'intérieur de celui-ci au cours du temps.

prolifération. Ces deux phénomènes sont impliqués dans la cicatrisation et c'est pourquoi nous parlons de fermeture de plaie, plus précis que le terme migration seule.

### 3.4.7. Contraction de lattices de collagène

Les lattices sont une matrice de collagène tridimensionnelle dans laquelle sont ensemencés les fibroblastes. Sous l'action des forces contractiles de ceux-ci, les lattices diminuent de taille (Figure 12). La mesure de la taille des lattices dans le temps est donc indicative de la capacité des fibroblastes à contracter leur environnement.

Les lattices sont réalisées en ajoutant les différents constituants dans l'ordre indiqué dans le tableau 4. Le collagène est conservé en milieu acide, il est donc nécessaire de neutraliser le pH avec du NaOH. Il est donc important de ne rajouter les cellules qu'en dernier (lorsque le pH est neutre), afin d'éviter qu'elles ne meurent. Le collagène polymérise lorsqu'il est à une

température supérieure à 4°C, la réalisation des lattices doit donc être faite sur glace. Après 1h d'incubation à 37°C, le collagène a polymérisé et forme une lattice contenant les cellules. Des photos sont réalisées deux fois par jour pendant une semaine, puis l'aire des lattices est calculée sur ImageJ.



**Figure 12 : Exemple de lattices de collagène prises en photo après 7 jours de culture**  
Les lattices faisaient la taille des puits au premier jour.

**Tableau 4 : Composition pour une lattice de collagène**

	Volumes (mL)	Concentration finale
Volume total	2.5	/
R10	1.375	/
Collagène	0.75	1.46 mg/mL
NaOH 0.1 N	0.125	0.005 N
Cellules	250 000 cellules dans 0.25 mL R10	100 000 cellules / mL

#### 3.4.8. Immunofluorescence

Plusieurs types d'échantillons ont été analysés par immunofluorescence : des coupes de peau et des fibroblastes subconfluents cultivés en labteks. Les labteks sont des lames de microscopie traitées pour la culture cellulaire ayant des compartiments détachables qui permettent de travailler avec 8 conditions différentes sur la même lame (Figure 13).



**Figure 13 : Illustration d'une labtek**

- Fibroblastes : Les cellules sontensemencées en labteks puis déprivées en R0,5 après 2 jours. Les fibroblastes sont activés en myofibroblastes par l'ajout de TGF- $\beta$  5 ng/mL pendant 48 heures. Les marquages sont ensuite réalisés comme indiqué dans le tableau 5.
- Coupes de peau : Des explants de peau de 0,5 cm<sup>2</sup> environ sont incubés en présence de COHE dilué en R10, pendant 48 heures. Les explants sont ensuite plongés 30 secondes en azote puis congelés à -80 °C. Ils sont ensuite inclus en milieu d'enrobage (Cryomatrix<sup>®</sup>) et des coupes de 5  $\mu$ m d'épaisseur sont réalisées avec un cryotome. Les marquages sont réalisés comme indiqué dans le tableau 5.

Echantillons	anticorps primaire	Référence (Abcam)	Localisation cellulaire	Hôte	Fixation	Perméabilisation	Saturation	dilution	anticorps - secondaire
Coupes de peau	Aquaporine 3	ab125219	membranaire	rabbit	acétone 10min TA		PBS BSA1%- Tween0,05% Goat serum2%	500	goat anti rabbit Alexa-Fluor488 a11070 (Thermofisher) dilution 1/1000
	B-catenin	ab32572	intracellulaire	rabbit	PFA 4% 10min 4°C	PBS-Triton X-100 0,1% 10 min TA		200	
	Cytokeratine 5	ab75869	intracellulaire	rabbit	acétone froid 10min TA			200	
	Cytokeratin 10	ab76318	intracellulaire	rabbit	acétone froid 10min TA			2500	
	E-cadhérine	ab40772	membranaire	rabbit	PFA 4% 10min 4°C	/		500	
	Fillagrin	ab81468	intracellulaire	rabbit	acétone froid 10min TA			200	
	Involucrine	ab181980	intracellulaire	rabbit	acétone froid 10min TA			100	
Labtek	aSMA	ab5694	intracellulaire	rabbit	PFA 4% 10min 4°C	PBS-Triton X-100 0,1% 20min TA		100	
	Collagène I	131001 (southern biotech)	extracellulaire	goat	PFA 4% 10min 4°C	/	PBS BSA2%	1000	donkey anti goat Alexa-Fluor 594 dilution 1/500
	Actine-F	P5282 (Sigma)	intracellulaire	Amanita phalloïdes	PFA 4% 10min 4°C	PBS-Triton X-100 0,1% 20min TA	/	100	/

**Tableau 5 : Les différentes conditions de marquage en immunofluorescence**

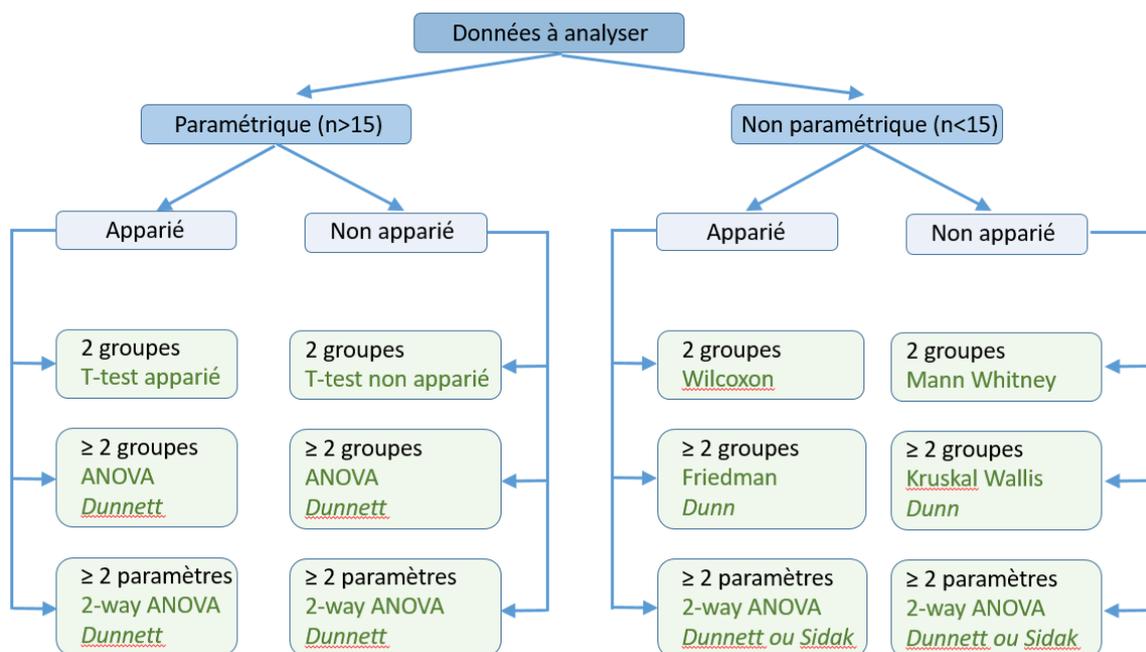
Presque tous les marquages sont réalisés à l'aide d'anticorps primaires spécifiques des protéines étudiées, détectés par un anticorps secondaire (spécifique de l'hôte de l'anticorps primaire) couplé à un fluorochrome. Le marquage de l'actine filamenteuse (F-actine, assemblage de monomères d'actine) fait exception car elle est détectée par de la phalloïdine fluorescente. La phalloïdine est une toxine extraite du champignon *Amanita phalloïdes* qui se lie spécifiquement à l'actine filamenteuse et la stabilise en empêchant sa dépolymérisation. Ces propriétés font d'elle un outil très utile pour l'étude des filaments d'actine.

Toutes les lames sont montées à l'aide d'un milieu de montage (Vectashield) contenant du DAPI (marqueur fluorescent bleu de l'ADN, et donc des noyaux) et scellées avec du vernis

transparent. Les photos sont réalisées sur un microscope à fluorescence AxioVert avec un temps d'exposition identique entre chaque condition. Les images sont quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ. Concernant les marquages de cellules sur labtek, l'intensité de fluorescence de chaque champ est mesurée puis est normalisée par le nombre de noyaux (DAPI) afin d'obtenir l'intensité moyenne de fluorescence par cellule. Pour les coupes de peau, des régions d'intérêt (Region of Interest ou ROI) sont dessinées dans les zones d'intérêt (différentes couches de l'épiderme) et l'intensité de fluorescence y est mesurée.

### 3.4.9. Statistiques

Plusieurs tests statistiques ont été réalisés en fonction des conditions comme indiqué dans la Figure 14. Toutes les figures et analyses statistiques sont réalisées sur GraphPad Prism 7.04. Les différences sont considérées significatives lorsque  $p < 0,05$  : \*,  $p < 0,01$  : \*\*,  $p < 0,001$  : \*\*\* et  $p < 0,0001$  : \*\*\*\*. Si ce n'est pas précisé, elles sont toujours exprimées en fonction du contrôle 0 %. Les formules «  $n=x$  » indiquées désignent le nombre de cultures provenant de donneurs différents.



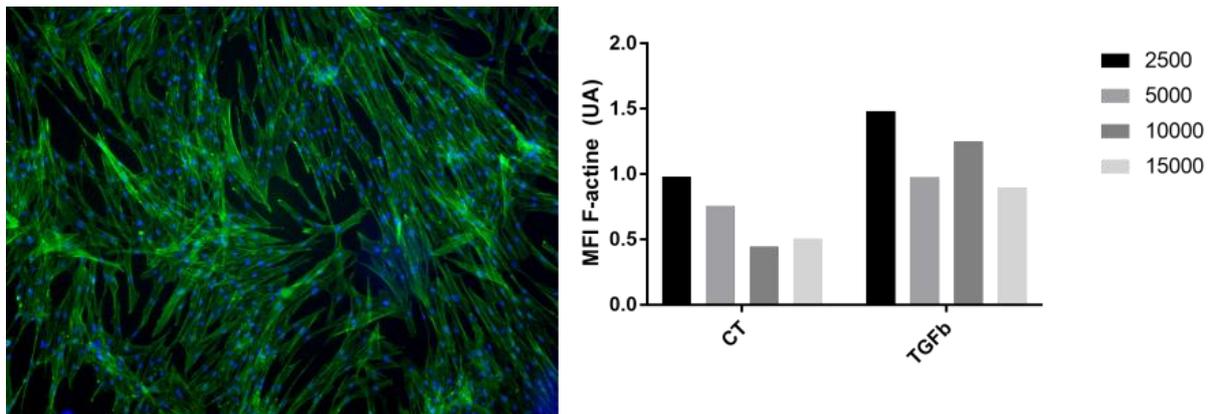
**Figure 14 : Stratégie employée pour le choix des tests statistiques**

Pour chaque comparaison, le test statistique et le test de comparaison multiple post hoc (en italique) sont indiqués.

## 4. Résultats

### 4.1. Mises au point

Certaines analyses présentées dans ce rapport ont demandé des mises au point ou des vérifications afin de les optimiser. Les résultats de ces essais sont présentés ici. Pour l'analyse de la F-actine en immunofluorescence, nous avons observé que la densité cellulaire influençait son organisation. Nous avons donc testé plusieurs « doses » de cellules afin de sélectionner la concentration cellulaire idéale pour réaliser le marquage. Nous avons testé entre 2500 et 15000 cellules par puits de labtek en présence ou non de TGF- $\beta$  afin d'induire leur activation en myofibroblastes. La simple observation des images (Figure 15) nous indique qu'à de très fortes concentrations cellulaires, les cellules se chevauchent, rendant alors le traitement d'image moins fiable. L'analyse quantitative montre alors que la quantité de F-actine tend à diminuer lorsque la densité cellulaire augmente. Pour la suite des expérimentations, nous avons donc décidé de choisir une dose relativement faible de cellules : 3500 cellules par puits, de sorte que la densité cellulaire ne soit pas trop élevée et que la quantité de F-actine ne soit pas diminuée.



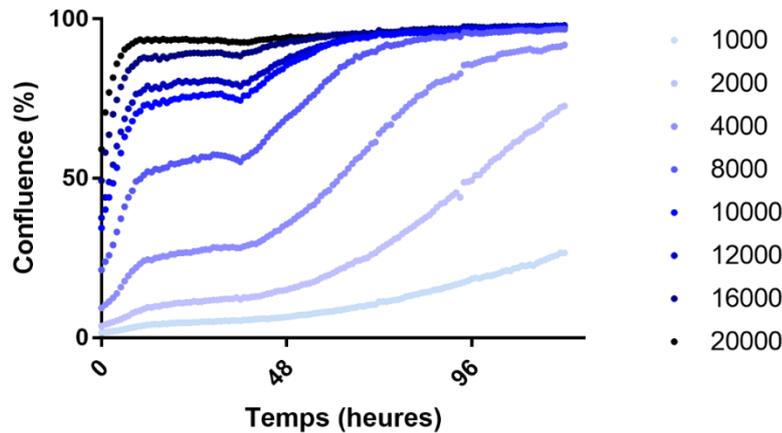
**Figure 15 : Mise au point de l'analyse de la F-actine par immunofluorescence**

2 500 à 15 000 fibroblastes sont ensemencés en labtek, déprivés puis activés ou non en myofibroblastes par du TGF- $\beta$  à 5ng/mL. Après 48h les cellules sont fixées puis marquées par la phalloïdine-FITC, spécifique de la F-actine. Deux images sont prises par condition et sont analysées sur ImageJ. L'intensité moyenne de fluorescence de chaque champ est normalisée par le nombre de noyaux (DAPI) afin d'obtenir l'intensité moyenne de fluorescence par cellules (MFI). **A gauche** : une image représentative avec 15 000 cellules. **A droite** : quantification de la F-actine.

Expérimentation réalisée sur une seule souche de fibroblastes, moyenne des 2 champs

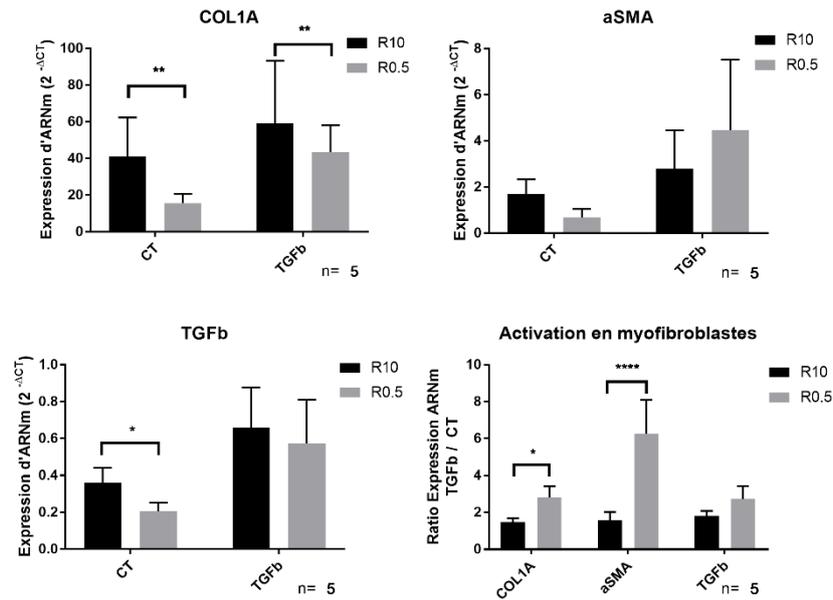
Pour l'analyse de la prolifération par Incucyte<sup>®</sup>, nous avons également réalisé une gamme de densités cellulaires afin de sélectionner la densité cellulaire assurant le meilleur profil de prolifération. Nous avons ensemencé entre 1 000 et 20 000 cellules par puits de P96 et avons observé la prolifération pendant 5 jours. Les résultats présentés en figure 16 nous ont permis

de choisir la concentration de 2 500 cellules par puits. En effet la densité de 2 000 cellules par puits montre une pente bien linéaire de prolifération mais qui n'atteint pas le plateau après 5 jours (correspondant à la confluence des cellules). Nous avons donc choisi une densité cellulaire supérieure pour atteindre la confluence au cours de l'expérience.



**Figure 16 : Mise au point de l'analyse de la prolifération par le système Incucyte® S3 Live Cell Analysis**  
1 000 à 20 000 fibroblastes sontensemencés par puits de P96 puis le pourcentage de recouvrement de la surface du puits (confluence) est observé pendant 5 jours grâce au système Incucyte® S3 Live Cell Analysis. Expérimentation réalisée sur 2 souches de fibroblastes avec des résultats similaires, une seule souche est présentée ici.

L'activation des fibroblastes en myofibroblastes est induite par ajout de TGF- $\beta$  à 5ng/mL dans le milieu de culture classiquement déprivé en SVF (R0,5). Nous avons voulu vérifier que cette condition de déprivation était réellement nécessaire à l'activation des fibroblastes. Les résultats présentés dans la figure 17 montrent qu'en condition basale, l'utilisation de milieu R0,5 diminue l'expression de l'ARNm des 3 marqueurs étudiés par rapport au R10. En présence de TGF- $\beta$ , les marqueurs augmentent par rapport à la condition basale, que ce soit en R0,5 ou R10. En étudiant le ratio d'activation (figure en bas, à droite), on observe que l'activation en myofibroblastes est meilleure en condition R0,5 concernant les marqueurs  $\alpha$ SMA et COL1A. L'utilisation du milieu R0,5 permet ainsi d'obtenir une meilleure activation en myofibroblastes.



**Figure 17 : Effet de la quantité de SVF dans le milieu de culture sur l'activation des fibroblastes en myofibroblastes**

250 000 fibroblastes sont ensemencés par puits de P6 puis sont activés ou non en myofibroblastes par du TGF- $\beta$  à 5ng/mL dans un milieu de culture contenant 0,5% de SVF (R0,5) ou 10% (R10). Les ARNm sont extraits et plusieurs gènes connus pour être augmentés chez les myofibroblastes sont analysés par RT-qPCR, le gène  $\beta$ -2-microglobuline est utilisé pour normaliser les résultats. Moyenne  $\pm$  SD 2-way ANOVA et test de comparaison multiple de Sidak

Comme introduit ci-avant, nous présentons dans la suite de ce rapport, les résultats des effets de COHE sur les différentes fonctions des fibroblastes d'une part, et des kératinocytes d'autre part.

## 4.2. Fibroblastes : effet de COHE sur leurs fonctions

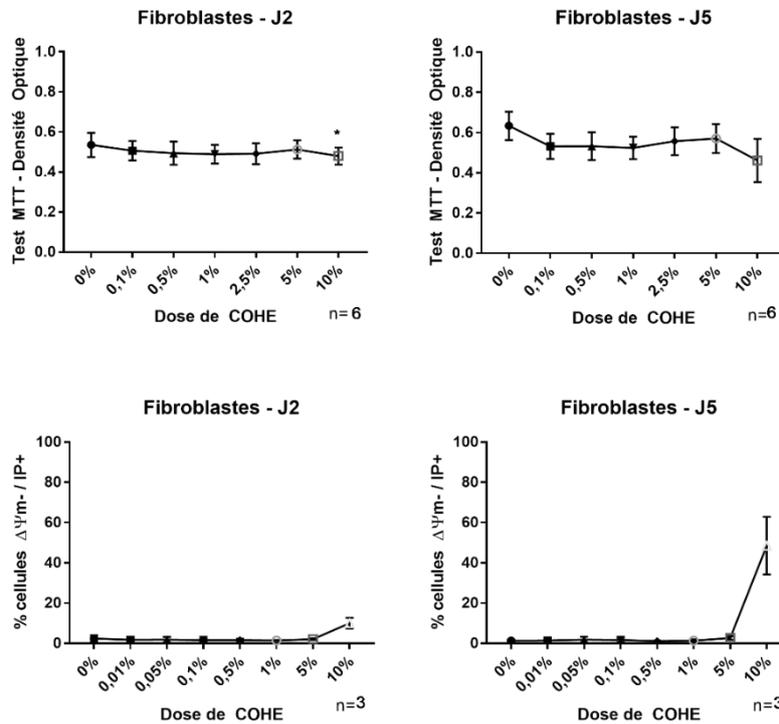
Les fibroblastes sont les cellules majoritaires du derme, et sont essentiels lors du processus de cicatrisation grâce à leurs nombreuses fonctions. Nous présentons ici les résultats obtenus pour l'étude de la viabilité, la prolifération, la fermeture de plaie, la contraction et la synthèse de médiateurs solubles ou non solubles en présence de COHE.

### 4.2.1. Viabilité

Avant toute analyse fonctionnelle, nous avons voulu étudier l'effet de COHE sur la viabilité des fibroblastes. Les tests MTT (Figure 18, haut) montrent une diminution faible mais non significative de l'activité cellulaire entre les dilutions 0,1 et 5 % après une exposition courte (2 jours) ou plus longue (5 jours). Une diminution significative est observée à 10 %. Le marquage

par DIOC6/IP (Figure 18, bas) indique une diminution du potentiel membranaire avec mort cellulaire uniquement à la dilution 10 %.

Ces données indiquent que COHE n'influence pas l'activité métabolique et la viabilité des fibroblastes jusqu'à la dilution de 5 %. Au-dessus de cette dilution, le produit devient toxique. Nous avons donc décidé de poursuivre les expériences avec des dilutions de 5 % ou moins.



**Figure 18 : Viabilité des fibroblastes**

**En haut :** Test MTT : 7 500 fibroblastes sontensemencés (6 réplicats) par puits de P96, puis après 24h COHE est ajouté. La viabilité/activité cellulaire est évaluée après 2 et 5 jours par ajout de MTT pendant 4h à 37°C, avant la lyse des cellules en DMSO et mesure de l'absorbance à 550nm. Moyenne ± SEM. **En bas :** Test DIOC6 : 50 000 fibroblastes sontensemencés par puits de P24, puis après 24h COHE est ajouté. La viabilité est évaluée après 2 et 5 jours par un marquage DIOC6/IP et analyse par cytométrie en flux. Moyenne ± SD, ANOVA de Friedman et test de comparaison multiple de Dunn.

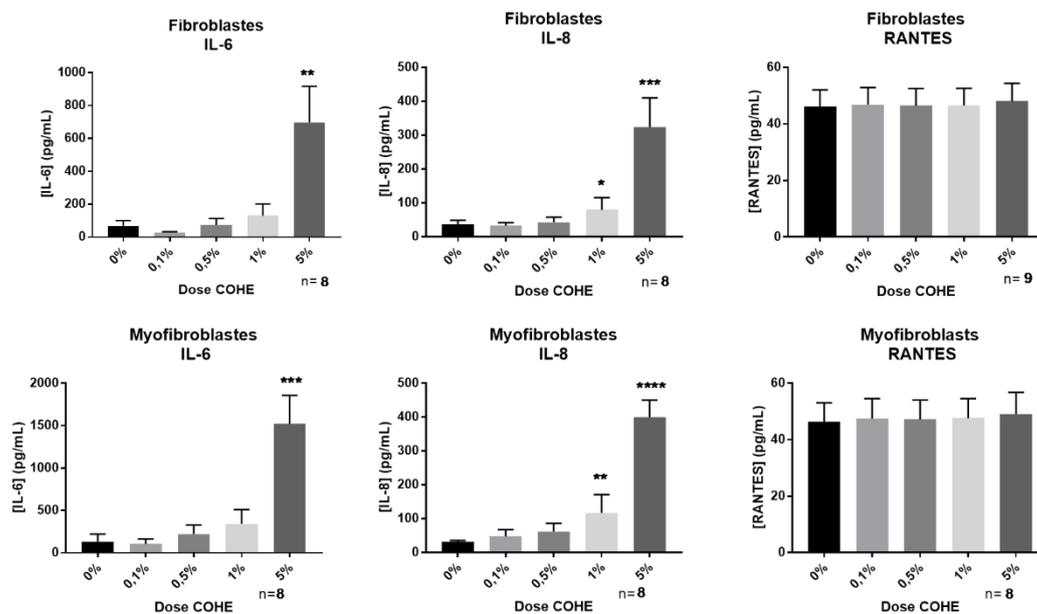
#### 4.2.2. Production de cytokines

Les fibroblastes ont la capacité de réagir à leur environnement en produisant des cytokines dans le but d'activer ou de recruter d'autres types cellulaires. Dans le processus de cicatrisation, la production de cytokines est une phase cruciale. En effet elle permet d'initier et de moduler tous les événements qui la composent.

L'effet de COHE sur la production de cytokines a été étudié sur des fibroblastes dans deux états d'activation : les fibroblastes et les myofibroblastes obtenus par activation des fibroblastes avec 5 ng/mL de TGF-β. COHE est mis au contact des cellules pendant 24 heures

à différentes dilutions, puis les surnageants sont récupérés afin de doser les différentes cytokines par ELISA : IL-6, IL-8 et RANTES.

En présence de COHE, les fibroblastes et myofibroblastes produisent significativement plus de cytokines IL-6 (à la dilution 5 %) et IL-8 (aux dilutions 1 % et 5 %). En revanche, la production de la chimiokine RANTES n'est pas influencée par la présence de COHE, que ce soit pour les fibroblastes ou les myofibroblastes (Figure 19).



**Figure 19 : Mesure de la libération de cytokines par les fibroblastes et myofibroblastes**

250 000 fibroblastes sont ensemencés en P6 puis après 24h ils sont activés en myofibroblastes ou non avec du TGF- $\beta$  à 5 ng/mL en présence de COHE pendant 24h. Les surnageants sont récupérés et les taux de cytokines sont mesurés par ELISA. **En haut** : Analyse des fibroblastes. **En bas** : Analyse des myofibroblastes. Moyenne  $\pm$  SEM, ANOVA de Friedman et test de comparaison multiple de Dunn.

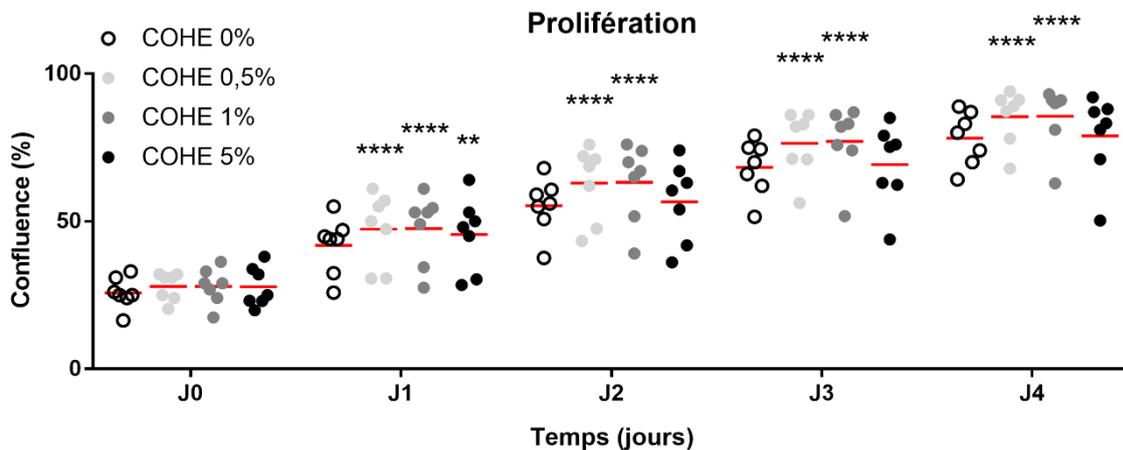
#### 4.2.3. Prolifération

En cas de besoin, les fibroblastes ont la capacité de proliférer afin d'amplifier leur réponse à l'environnement. Lors de la phase de réparation, les fibroblastes migrent et prolifèrent pour former le tissu de granulation, ce qui sert de support pour la réépithélialisation. C'est donc un événement clé dans le processus de cicatrisation cutanée.

Nous avons étudié la prolifération des fibroblastes par deux techniques complémentaires : analyse de la confluence en fonction du temps grâce à la technologie Incucyte® et analyse du

pourcentage de cellules engagées dans les différentes phases du cycle cellulaire par cytométrie en flux.

La figure 20 présente les résultats de l'analyse Incucyte®. On observe que COHE induit une augmentation significative de la confluence des fibroblastes à toutes les dilutions testées dès le premier jour de culture, puis seulement pour les dilutions 0,5 et 1 % pour les jours suivants jusqu'à la fin de la culture au jour 4.

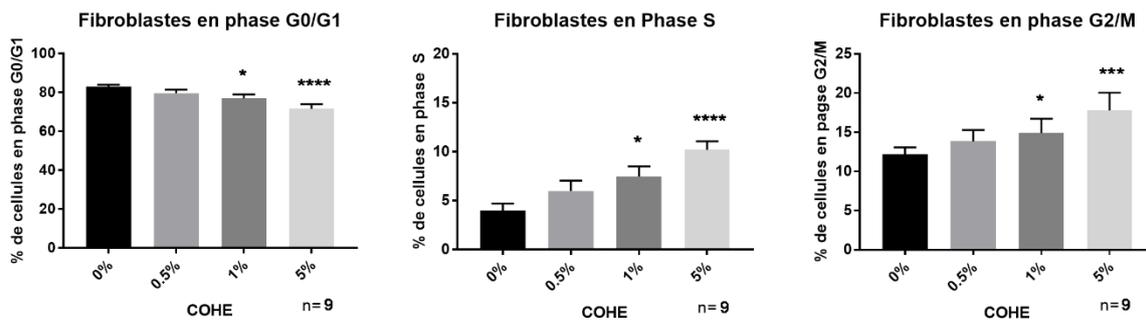


**Figure 20 : Prolifération des fibroblastes**

3 500 fibroblastes sontensemencés par puits de P96 en triplicate, COHE est ajouté lorsque les cellules sont environ à 20-30% de confluence. La confluence est mesurée chaque jour grâce au système Incucyte® S3 Live Cell Analysis pendant 4 jours. Sept donneurs indépendants sont représentés individuellement avec la moyenne (trait rouge), n=7, 2-way ANOVA et test de comparaison multiple de Dunnett.

Ce paramètre de mesure pouvant être influencé à la fois par la prolifération et la morphologie des cellules, nous avons complété notre analyse par une étude des différentes phases du cycle cellulaire, indicative de la prolifération.

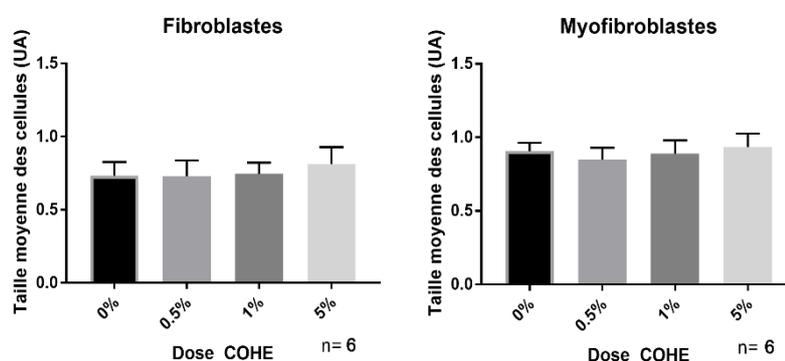
Les résultats de cycle cellulaire représentés sur la figure 21 montrent qu'après 24h, COHE induit une augmentation significative du nombre de cellules en phase S (réplication de l'ADN) et G2/M (préparation à la mitose / mitose) avec les dilutions 1 et 5 % de COHE. Parallèlement, le nombre de cellules en phase G0/G1 (quiescence / préparation à la réplication) diminue significativement aux mêmes dilutions. Ces données confirment que COHE possède un effet pro-prolifératif sur les fibroblastes.



**Figure 21 : Cycle cellulaire des fibroblastes**

250 000 fibroblastes sontensemencés par puits de P6, puis après 24h COHE est ajouté pour 24h de culture. Le cycle cellulaire est ensuite évalué par un marquage à l'IP et analyse en cytométrie en flux. La moyenne du pourcentage de cellules dans les différentes phases pour des donneurs indépendants est représentée  $\pm$  SEM, ANOVA de Friedman et test de comparaison multiple de Dunn.

Ainsi, les deux techniques n'ont pas mis en évidence les mêmes dilutions de COHE capables d'impacter la prolifération. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que la technique Incucyte® se base sur la surface occupée par les cellules : ceci dépend du nombre mais aussi de la taille des cellules. Il est donc nécessaire d'étudier la taille moyenne des cellules en présence de COHE afin de vérifier cette hypothèse. C'est ce que nous avons fait en mesurant par ImageJ la « taille » des fibroblastesensemencés sur labtek et marqués pour la F-actine (permettant de définir le contour des cellules). Les résultats présentés en Figure 22 ne permettent pas de démontrer une différence de taille des cellules en fonction de la dilution de COHE mise en contact.



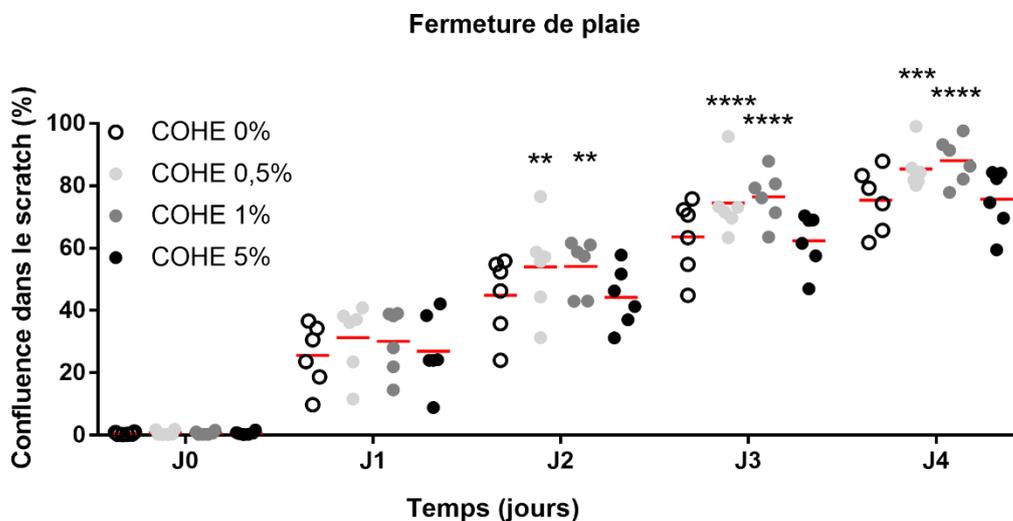
**Figure 22 : Mesure de la taille moyenne des fibroblastes et des myofibroblastes**

Des images d'immunofluorescence de cellules marquées par la phalloïdine-FITC (spécifique de la F-actine) sont utilisées. Ce marquage permet de définir facilement le contour des cellules et d'en mesurer la surface. La surface occupée par les cellules est mesurée dans 3 champs et est normalisée par le nombre de noyaux (marqués au DAPI) du même champ. Moyenne de 6 donneurs  $\pm$  SEM

Nous pouvons en conclure que les deux techniques, Incucyte® et analyse du cycle par cytométrie en flux, sont complémentaires pour étudier la prolifération de cellules. COHE induit une augmentation de la prolifération des fibroblastes à plusieurs dilutions : 0,5 %, 1 % et 5 % dès 24h de culture.

#### 4.2.4. Migration

La fonction de migration va de pair avec la prolifération des fibroblastes dans la phase de réparation de la cicatrisation. Nous l'avons étudiée par l'analyse de la fermeture de plaie par l'Incucyte®. La Figure 23 montre que COHE augmente significativement la fermeture de plaie aux dilutions 0,5 et 1 % à partir du deuxième jour de culture et jusqu'à la fin de l'expérimentation après 4 jours de culture.



**Figure 23 : Fermeture de plaie par les fibroblastes**

10 000 fibroblastes sontensemencés par puits (5 réplicats par condition) de P96 puis une blessure (scratch) est réalisée après 24h. COHE est ajouté puis la confluence dans le scratch est mesurée chaque jour grâce au système Incucyte® S3 Live Cell Analysis. Six donneurs indépendants sont représentés individuellement avec la moyenne (trait rouge), n=6, 2-way ANOVA et test de comparaison multiple de Dunnett.

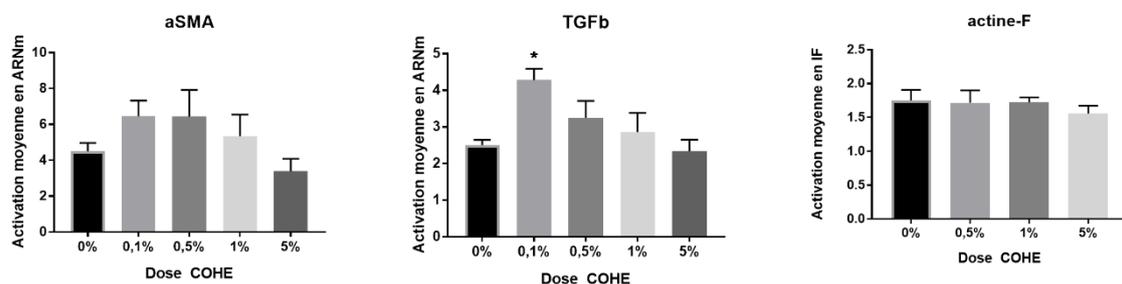
Pour aller plus loin, il serait intéressant de déterminer si COHE n'agit que sur la migration des cellules ou si son action sur la prolifération participe aussi à la fermeture de la plaie *in vitro*, ce qui est vraisemblable. Pour le démontrer, nous pourrions traiter, ou non, les cellules par de la mitomycine (10µg/mL) avant l'apport de COHE sur les cellules et suivre alors la migration. Cette étude est envisagée en perspective.

#### 4.2.5. Activation des fibroblastes en myofibroblastes

Lors de la phase de réparation, sous l'influence des facteurs présents dans l'environnement de la plaie, les fibroblastes s'activent en myofibroblastes. Ils permettent la synthèse de la nouvelle MEC et la contraction de la plaie. Cette activation peut s'observer par l'augmentation de l'actine ( $\alpha$ SMA) et la production de TGF- $\beta$ . Nous avons donc induit *in vitro* l'activation des fibroblastes en myofibroblastes par du TGF- $\beta$  afin d'observer l'effet de COHE sur celle-ci via l'expression d'ARNm des marqueurs d'activation et leur expression protéique.

La Figure 24 montre qu'il n'y a pas de modification de l'activation transcriptionnelle d' $\alpha$ SMA, alors que l'activation du TGF- $\beta$  est significativement augmentée avec la faible dilution 0,1 %. Le TGF- $\beta$  produit par les myofibroblastes eux-mêmes, permet leur activation en continu grâce à une boucle autocrine. L'analyse au niveau protéique par immunofluorescence ne montre pas de modification de la F-actine (assemblage de monomères d'actine dont  $\alpha$ SMA).

Il n'est pas possible d'étudier l'activation du TGF- $\beta$  au niveau protéique car c'est précisément ce facteur qui est utilisé pour induire l'activation : la quantité introduite de TGF- $\beta$  exogène biaiserait l'analyse d'une sécrétion par les fibroblastes. Il semblerait donc que malgré l'activation augmentée au niveau transcriptionnel du TGF- $\beta$ , l'activation des fibroblastes en myofibroblastes ne soit pas influencée par la présence de COHE.



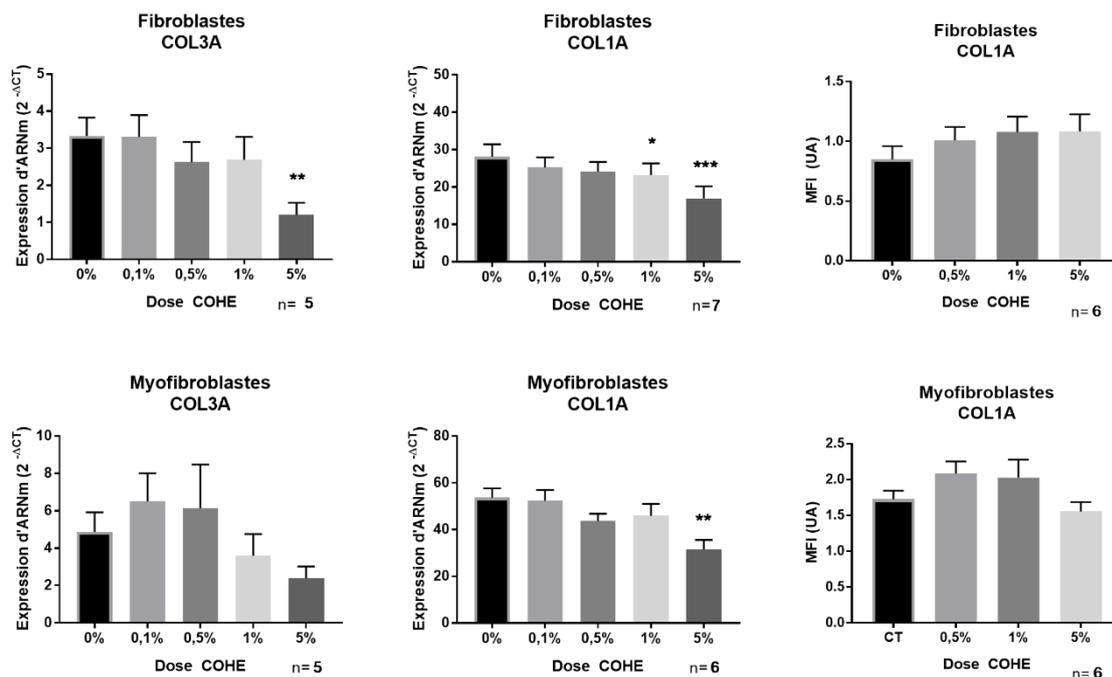
**Figure 24 : Activation des fibroblastes en myofibroblastes**

L'activation moyenne en myofibroblastes est exprimée par le ratio des valeurs de myofibroblastes par celles des fibroblastes. **A gauche et au milieu :** Analyse de l'expression des ARNm : 250 000 fibroblastes sont ensemencés par puits de P6 puis sont activés ou non en myofibroblastes par du TGF- $\beta$  à 5ng/mL en présence de COHE dilué en R0,5 pendant 24h. Les ARNm sont extraits et analysés par RT-qPCR, le gène  $\beta$ -2-microglobuline est utilisé pour normaliser les résultats. **A droite :** Quantification de la F-actine par IF : 3 500 fibroblastes sont ensemencés par puits de labtek puis sont activés ou non en myofibroblastes par du TGF- $\beta$  à 5 ng/mL en présence de COHE dilué en R0,5 pendant 48h. Les cellules sont fixées puis marquées. Trois images sont prises par condition et sont analysées sur ImageJ. L'intensité de fluorescence de chaque champ est normalisée par le nombre de noyaux (DAPI) afin d'obtenir l'intensité moyenne de fluorescence par cellule.

Moyenne  $\pm$  SEM, n=6, ANOVA de Friedman et test de comparaison multiple de Dunn.

#### 4.2.6. Modification de la matrice extracellulaire

Lors de la cicatrisation, les fibroblastes produisent en premier lieu du collagène III qui est facile et rapide à synthétiser. Dès lors, les cicatrices fraîches contiennent une majorité de ce type de collagène, mais il n'est pas aussi résistant à la traction que le collagène classiquement retrouvé : le collagène I. Celui-ci est synthétisé plus tardivement, en même temps que des MMP, qui vont dégrader le collagène III au fur et à mesure, permettant au collagène I de le remplacer progressivement. Nos résultats (Figure 25) montrent que COHE induit une diminution significative de l'expression d'ARNm de collagène III et de collagène I par les fibroblastes, et de collagène I par les myofibroblastes. L'analyse par immunofluorescence ne montre cependant pas de modification significative de la production de collagène I.



**Figure 25 : Expression et synthèse de collagènes par les fibroblastes et les myofibroblastes**

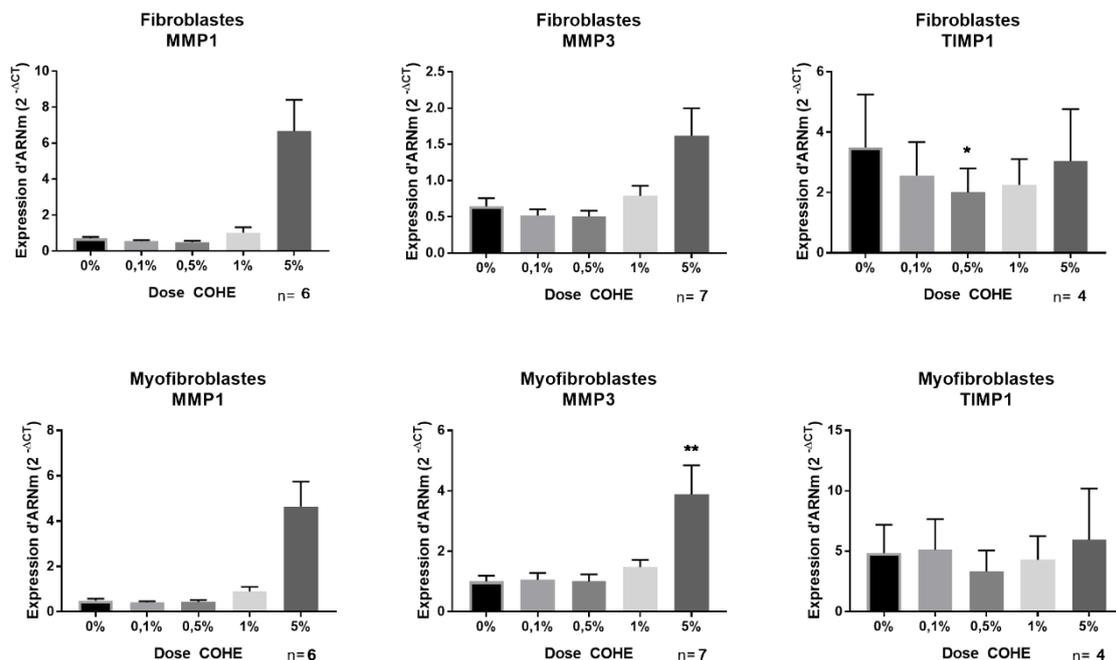
**Colonnes 1 et 2 :** Analyse de l'expression des ARNm : 250 000 fibroblastes sont ensemencés par puits de P6 puis sont activés ou non en myofibroblastes par du TGF-β à 5ng/mL en présence de COHE dilué en R0,5 pendant 24h. Les ARNm sont extraits et analysés par RT-qPCR, le gène β-2-microglobuline est utilisé pour normaliser les résultats. **Colonne 3 :** Quantification de l'expression protéique par IF : 3 500 fibroblastes sont ensemencés par puits de labtek puis sont activés ou non en myofibroblastes par du TGF-β à 5ng/mL en présence de COHE dilué en R0,5 pendant 48h. Les cellules sont fixées puis marquées. 3 images sont prises par condition et sont analysées sur ImageJ. L'intensité de fluorescence de chaque champ est normalisée par le nombre de noyaux (DAPI) afin d'obtenir l'intensité moyenne de fluorescence par cellules (MFI).

**En haut :** Analyse des fibroblastes. **En bas :** Analyse des myofibroblastes

Moyenne ± SEM, ANOVA de Friedman et test de comparaison multiple de Dunn.

On observe parallèlement (figure 26) une forte augmentation (mais non significative du fait de la grande variabilité de l'amplitude de la réponse) de l'expression des ARNm des MMP1 et MMP3 par les fibroblastes et les myofibroblastes avec la dilution 5 %.

COHE induit donc une diminution de l'expression d'ARNm de collagène III, une augmentation des ARNm MMP1 (collagénase) et MMP3 (stomélyline-1), une diminution du facteur inhibiteur TIMP1 des MMP, mais sans modification de la sécrétion de collagène I.

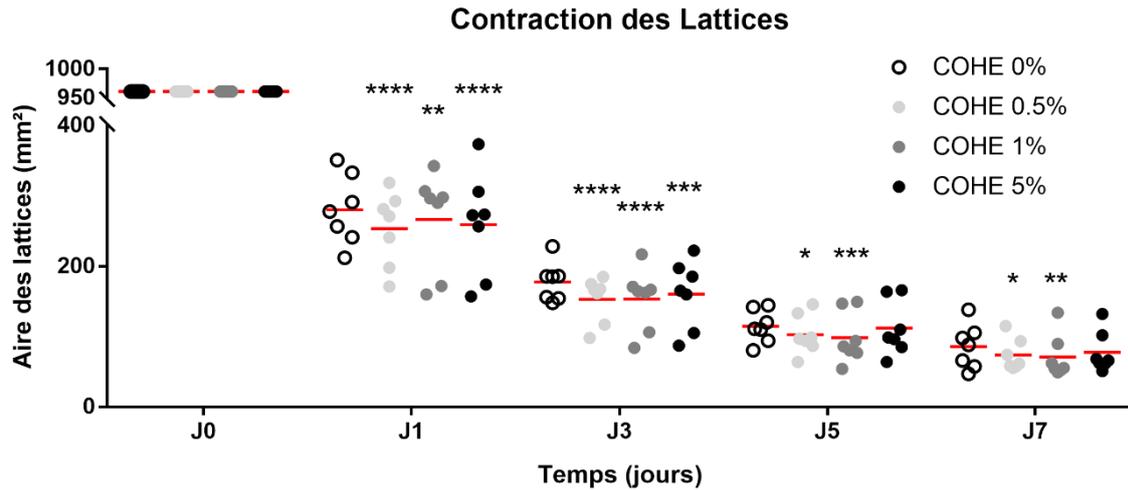


**Figure 26 : Expression de MMP1 et 3 et de TIMP1 par les fibroblastes et les myofibroblastes**

Analyse de l'expression des ARNm : 250 000 fibroblastes sont ensemencés par puits de P6 puis sont activés ou non en myofibroblastes par du TGF- $\beta$  à 5ng/mL en présence de COHE dilué en R0,5 pendant 24h. Les ARNm sont extraits et analysés par RT-qPCR, le gène  $\beta$ -2-microglobuline est utilisé pour normaliser les résultats **En haut** : Analyse des fibroblastes. **En bas** : Analyse des myofibroblastes  
Moyenne  $\pm$  SEM, n=4-7, ANOVA de Friedman et test de comparaison multiple de Dunn.

#### 4.2.7. Contraction de lattices de collagène

Les fibroblastes ont des capacités contractiles importantes qui permettent de rapprocher les bords de la plaie et favorisent ainsi la fermeture efficace de la lésion. Nous avons observé sur une période de 7 jours la contraction de lattices de collagène en présence de COHE (Figure 27). On observe une diminution significative de l'aire des lattices en présence de COHE à partir du premier jour de culture. Cette diminution perdure jusqu'à la fin de l'analyse pour les dilutions 0,5 et 1 %. L'aire des lattices est inversement proportionnelle à la contractilité des fibroblastes, ce qui nous permet de conclure que COHE favorise la contraction des fibroblastes et dès lors la fermeture efficace des plaies cutanées.

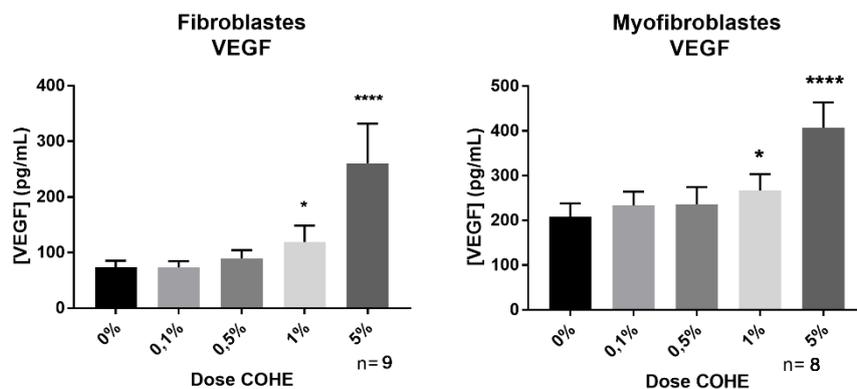


**Figure 27 : Contraction de lattices de collagène par les fibroblastes**

250 000 fibroblastes sont ensemencés en duplicates en P6 dans une matrice de collagène en présence de COHE. Des photos sont réalisées 2 fois par jour pendant 7 jours. L'aire des lattices est mesurée grâce au logiciel ImageJ. Les donneurs sont affichés individuellement avec la moyenne (trait rouge),  $n=7$ , 2-way ANOVA et test de comparaison multiple de Dunnett.

#### 4.2.8. Production de facteurs pro-angiogéniques

L'angiogenèse est essentielle durant la cicatrisation car elle permet la formation de néo-vaisseaux assurant l'apport de nutriments et d'oxygène sur le site, indispensables aux différents acteurs cellulaires. Elle est influencée notamment par le facteur de croissance VEGF produit par les fibroblastes. Celui-ci est significativement augmenté dans le surnageant des fibroblastes et des myofibroblastes cultivés pendant 24h en présence de COHE aux dilutions de 1 et 5 % (Figure 28). Ceci permet de supposer que COHE va favoriser une néovascularisation de la plaie, étape nécessaire pour une bonne cicatrisation.



**Figure 28 : Mesure de la libération de VEGF par les fibroblastes et les myofibroblastes**

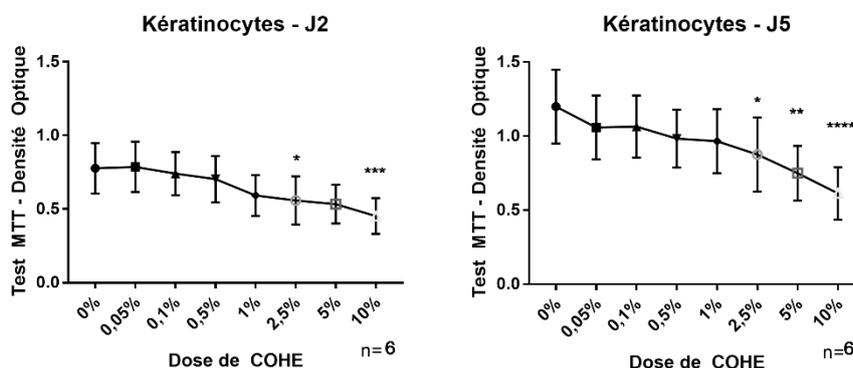
250 000 fibroblastes sont ensemencés en P6 puis après 24h ils sont activés en myofibroblastes avec du TGF- $\beta$  à 5ng/mL en présence de COHE pendant 24h. Les surnageants sont récupérés et le taux de VEGF est mesuré par ELISA. Moyenne  $\pm$  SEM,  $n=8-9$  ANOVA de Friedman et test de comparaison multiple de Dunn.

### 4.3. Kératinocytes : effet de COHE sur leurs fonctions

Les kératinocytes sont les principales cellules qui constituent l'épiderme, avec leur structure particulière et assemblage en plusieurs couches qui donnent à la peau sa fonction efficace de barrière. C'est pourquoi lors d'une blessure cutanée, les kératinocytes doivent former une nouvelle barrière afin de restaurer cette fonction. Ces cellules sont ainsi clés dans le processus de cicatrisation. Nous avons étudié les effets de COHE sur les différentes fonctions des kératinocytes impliquées dans la cicatrisation.

#### 4.3.1. Viabilité

Les kératinocytes sont des cellules sensibles et voient leur activité métabolique diminuer progressivement dès la plus faible dilution de COHE utilisée et cette diminution devient significative à partir de la dilution 2,5 % (Figure 29).



**Figure 29 : Viabilité des kératinocytes**

*Test MTT : 5 000 kératinocytes sontensemencés (6 réplicats) par puits de P96, puis après 24h COHE est ajouté. La viabilité/activité cellulaire est évaluée après 2 et 5 jours par ajout de MTT pendant 4h à 37°C, puis lyse des cellules en DMSO et mesure de l'absorbance à 550nm. Moyenne ± SEM, ANOVA de Friedman et test de comparaison multiple de Dunn.*

Malgré la diminution métabolique observée à la dilution 5 %, nous avons décidé de poursuivre les expérimentations avec les mêmes dilutions que cellules utilisées pour les fibroblastes afin de conserver les mêmes conditions expérimentales.

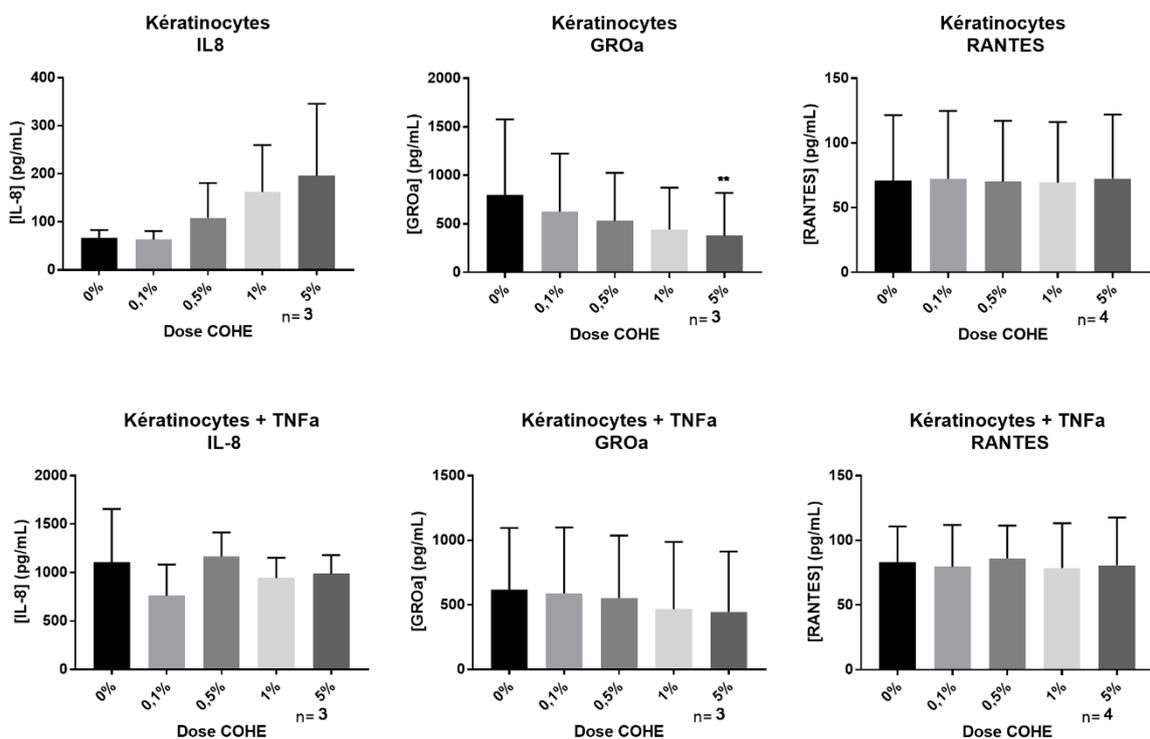
#### 4.3.2. Production de cytokines

Tout comme les fibroblastes, les kératinocytes réagissent à leur environnement en produisant des cytokines dans le but d'activer ou de recruter d'autres types cellulaires. Dans ce sens, nous avons étudié la sécrétion par les kératinocytes de plusieurs cytokines responsables du

recrutement d'acteurs cellulaires impliqués dans la phase inflammatoire : IL-8, GRO $\alpha$  et RANTES.

L'effet de COHE sur la production de ces cytokines a été étudié sur les kératinocytes en condition basale, et les kératinocytes en condition inflammatoire (cultivés avec 10 ng/mL de TNF- $\alpha$ ). COHE est mis au contact des cellules pendant 24 heures à différentes dilutions, puis les surnageants sont récupérés afin de doser les différentes cytokines par ELISA.

Sur les kératinocytes en condition basale, on observe une augmentation progressive mais non significative de la production d'IL-8 alors qu'une diminution significative est observée pour GRO $\alpha$  à la dilution 5 % (Figure 30). La production de la chimiokine RANTES n'est pas influencée par la présence de COHE. Pour les kératinocytes en condition inflammatoire, aucune modification de la production des cytokines n'est observée en présence de COHE.



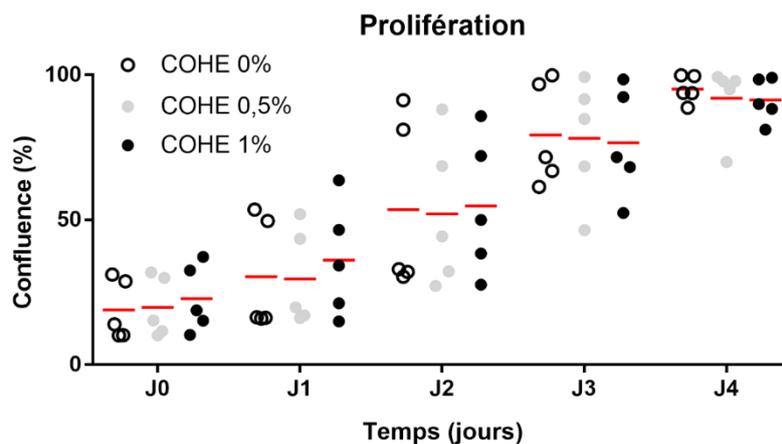
**Figure 30 : Mesure de la libération de cytokines par les kératinocytes à l'état basal ou activés**  
300 000 kératinocytes sont ensemencés en P6 puis après 24h, ils sont activés avec du TNF- $\alpha$  10ng/mL en présence de COHE pendant 24h. Les surnageants sont récupérés et les taux de cytokines sont mesurés par ELISA. **En haut** : Analyse des kératinocytes. **En bas** : Analyse des kératinocytes activés par le TNF- $\alpha$ . Moyenne  $\pm$  SD, n=3-4, ANOVA de Friedman et test de comparaison multiple de Dunn.

### 4.3.3. Prolifération

Lors de la cicatrisation, les kératinocytes prolifèrent afin d'envahir la surface de la nouvelle matrice synthétisée et refermer la plaie.

Nous avons étudié la prolifération des kératinocytes par deux techniques complémentaires : l'analyse de la confluence en fonction du temps grâce à la technologie Incucyte® et l'analyse du pourcentage de cellules engagées dans les différentes phases du cycle cellulaire par cytométrie en flux.

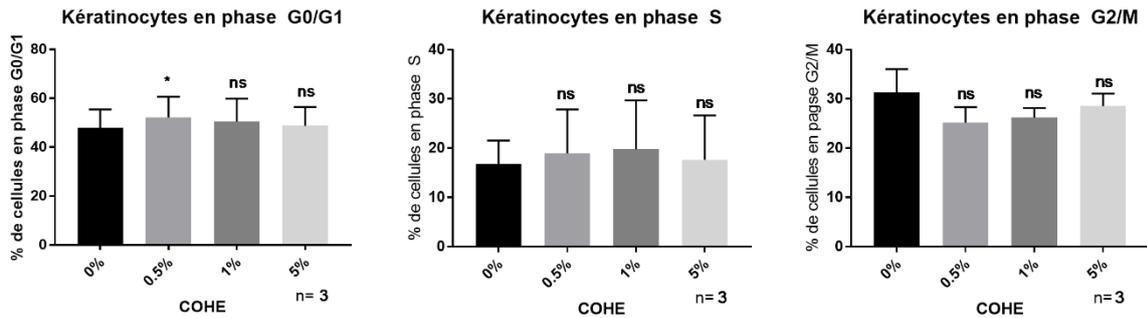
L'analyse de la prolifération par la technique de l'Incucyte® s'est révélée difficile. En effet, les kératinocytes sont des cellules qui poussent en îlots, ce qui induit une très grande hétérogénéité de la confluence en fonction de la zone observée. De plus, la dilution 5% induit la présence de nombreuses particules qui empêchent l'analyse de la confluence par le système. La dilution 5% induisant une diminution de l'activité métabolique des kératinocytes, il est probable que ces particules soient des débris cellulaires. Les résultats sont présentés dans la figure 31 mais ne permettent pas de mettre en évidence d'effet significatif de COHE sur la prolifération des kératinocytes.



**Figure 31 : Prolifération des kératinocytes**

5 000 kératinocytes sont ensemencés par puis de P96 en triplicats, COHE est ajouté lorsque les cellules sont environ à 20-30% de confluence. La confluence est mesurée chaque jour grâce au système Incucyte® S3 Live Cell Analysis. La moyenne (trait rouge) des réplicats des 5 donneurs indépendants sont représentés individuellement, 2-way ANOVA et test de comparaison multiple de Dunnett.

L'analyse du cycle cellulaire a cependant pu être réalisée sans problème et est présentée en Figure 32. On observe une augmentation significative du pourcentage de cellules en phase G0/G1 avec la dilution 0,5 % de COHE. Les autres phases ne montrent pas de différence significative mais ces résultats suggèrent une diminution de la prolifération en présence de COHE à 0,5 % après 24 heures de culture.



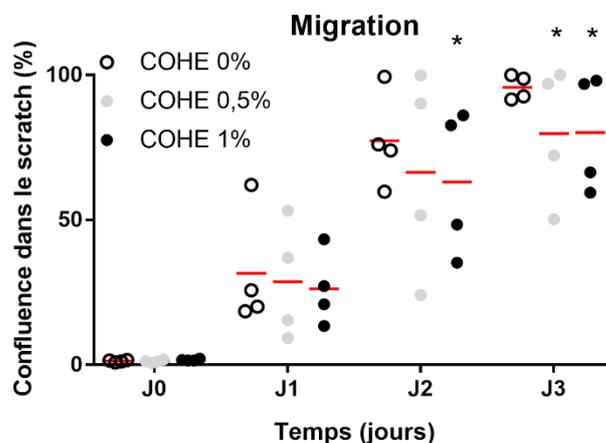
**Figure 32 : Cycle cellulaire des kératinocytes**

100 000 kératinocytes sont ensemencés par BP60 puis après 24h COHE est ajouté pour 24h de culture. Le cycle cellulaire est ensuite évalué par un marquage à l'IP et analyse en cytométrie en flux. La moyenne du pourcentage de cellules dans les différentes phases pour 3 donneurs indépendants est représentée  $\pm$  SD, ANOVA de Friedman et test de comparaison multiple de Dunn.

#### 4.3.4. Migration

Outre leur prolifération, les kératinocytes migrent afin de recouvrir la nouvelle matrice produite par les fibroblastes. Ces deux phénomènes couplés à la différenciation des kératinocytes conduisent à la réépithélialisation de la zone lésée. La migration permet de refermer la plaie et de redonner à la peau lésée sa fonction de barrière.

Nous présentons en Figure 33 les données de l'analyse de la migration kératinocytaire. Il y a là encore une grande hétérogénéité des résultats, mais cette fois, celle-ci est attribuée à des capacités intrinsèques de migration différentes entre les différentes souches. Ici encore la dilution 5 % induit de nombreuses particules, empêchant l'analyse par le système. On observe à partir du deuxième jour de culture une diminution significative de la migration des



**Figure 33 : Fermeture de plaie par des kératinocytes**

20 000 kératinocytes sont ensemencés par puits (5 réplicats par condition) de P96 puis une blessure (scratch) est réalisée après 24h. COHE est ajouté puis la confluence dans le scratch est mesurée chaque jour grâce au système Incucyte® S3 Live Cell Analysis. Les donneurs indépendants sont représentés individuellement, avec la moyenne (trait rouge), 2-way ANOVA et test de comparaison multiple de Dunnett.

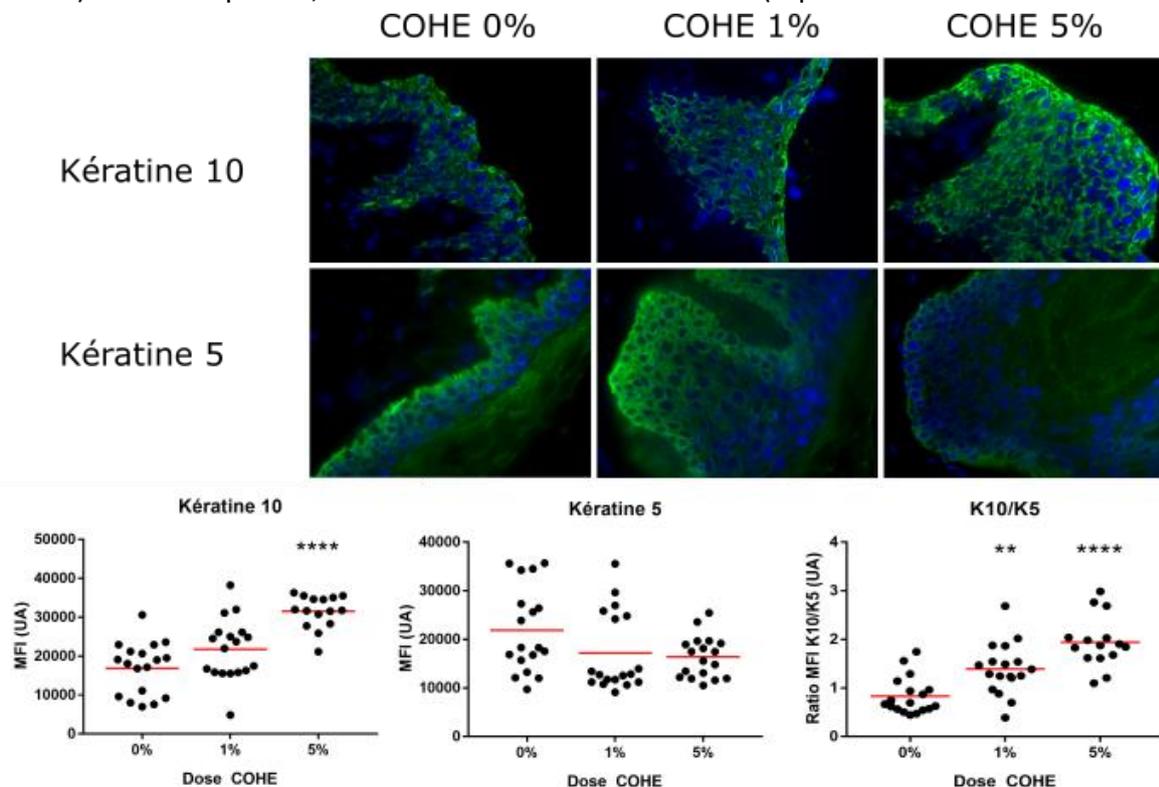
kératinocytes avec la dilution 1 %, et au dernier jour la migration est significativement diminuée pour les deux dilutions testées.

#### 4.4. Epiderme : effet de COHE sur sa structure

La structure de l'épiderme est ce qui fait de la peau une barrière efficace à l'environnement. Nous avons étudié ici l'effet de COHE sur des explants de peaux saines non lésées afin de déterminer son influence sur la structure de l'épiderme.

##### 4.4.1. Marqueurs de différenciation de l'épiderme

Les kératines sont des protéines ancrées aux jonctions cellulaires des kératinocytes qui sont impliquées dans de nombreuses fonctions. Différentes kératines sont exprimées en fonction des couches de l'épiderme et sont utilisées comme des marqueurs de différenciation. La figure 34 présente des images représentatives et la quantification moyenne de kératines dans des peaux mises en contact avec COHE. On observe une augmentation de la kératine 10 (retrouvée dans les couches supra-basales) et une diminution de la kératine 5 (retrouvée dans la couche basale). En conséquence, le ratio kératine 10 sur kératine 5 (représentatif de la différenciation



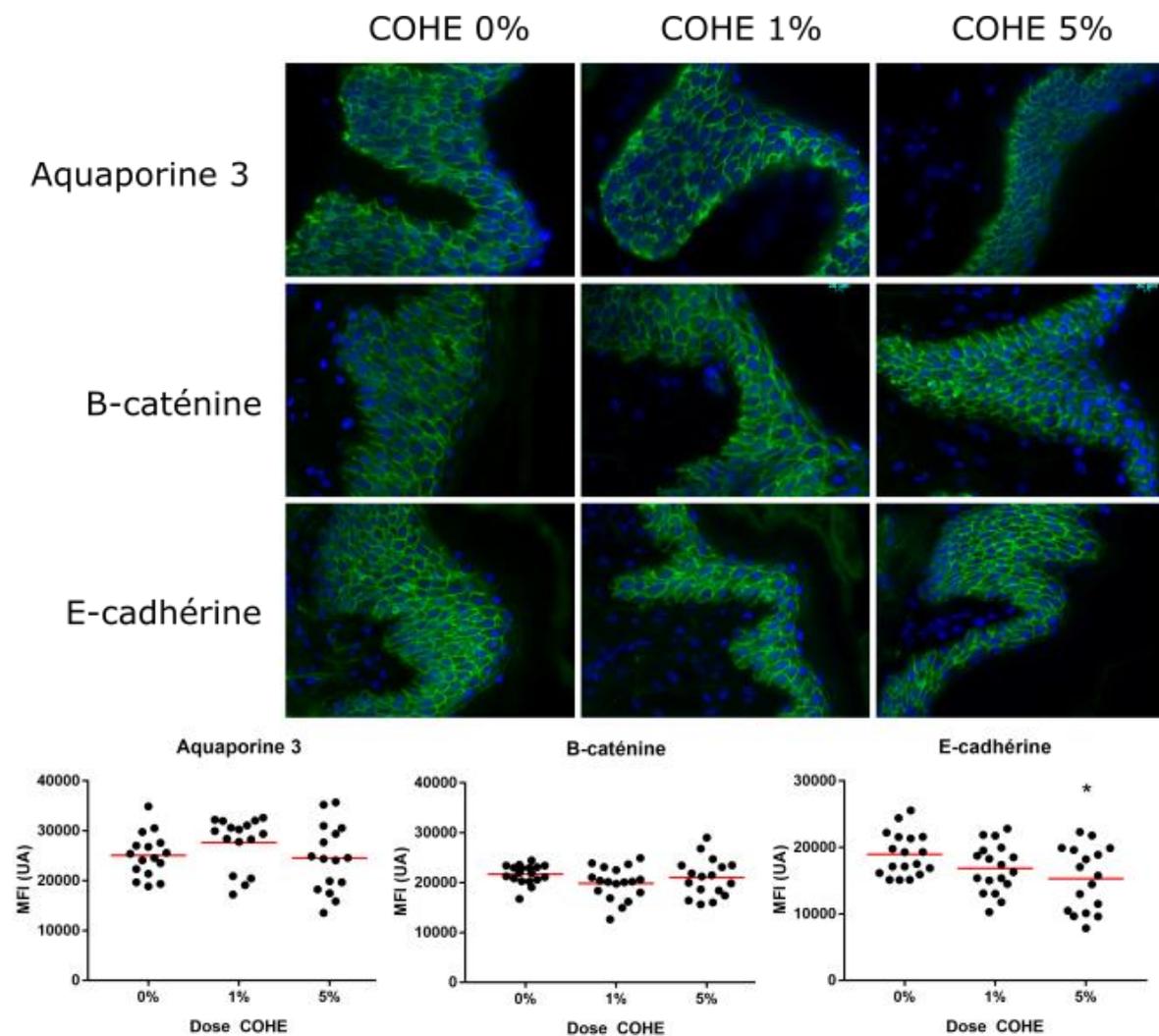
**Figure 34 : Différenciation de l'épiderme**

Des explants de peau saine de 0,5cm<sup>2</sup> sont mis en contact avec COHE pendant 24 heures puis des coupes de 5µm sont réalisées. Des immunomarquages pour les kératines 5 et 10 sont effectués (en vert) et les noyaux sont contre-marqués avec du DAPI (bleu). Six images par donneur sont analysées par ImageJ. **En haut** : Images représentatives. **En bas** : Quantifications, n=18 images de 3 donneurs, moyenne (trait rouge), ANOVA et test de comparaisons multiple de Dunnett.

des kératinocytes dans l'épiderme) est significativement augmenté en présence de COHE aux dilutions 1 et 5 % après 24 heures de traitement.

#### 4.4.2. Autres marqueurs

L'intégrité de la structure de la peau en général est essentielle pour qu'elle puisse maintenir sa fonction de barrière efficacement. Nous avons étudié l'influence de COHE sur différentes protéines impliquées dans la structure de la peau : l'aquaporine 3 (impliquée dans la fonction d'hydratation), la  $\beta$ -caténine et la E-cadhérine (impliquées dans la cohésion des cellules et donc l'imperméabilité et la fonction barrière). Les résultats (Figure 35) ne montrent pas de



**Figure 35 : Structure de la peau**

Des explants de peau de 0,5 cm<sup>2</sup> sont mis en contact avec COHE pendant 24 heures puis des coupes de 5  $\mu$ m sont réalisées. Des immunomarquages pour les différentes protéines sont effectués (en vert) et les noyaux sont contremarqués avec du DAPI (bleu). Six images par donneurs sont analysées par ImageJ. **En haut** : Images représentatives. **En bas** : Quantifications, n=18 images de 3 donneurs, moyenne (trait rouge), ANOVA et test de comparaisons multiple de Dunnnett.

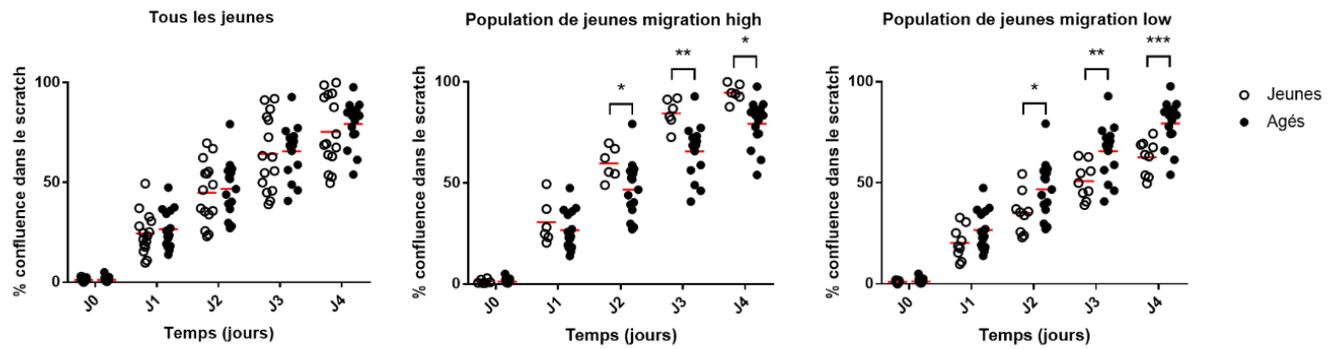
différence significative pour l'aquaporine 3 et la  $\beta$ -caténine. En revanche on observe une diminution significative de la E-cadhérine à la dilution de 5 %.

L'ensemble des résultats concernant les effets de COHE présentés ci-dessus vient d'être rédigé sous la forme d'un article scientifique dont je suis co-première auteure. Cet article sera soumis prochainement au journal *Experimental Dermatology*.

#### **4.5. Comparaison entre des fibroblastes jeunes et âgés**

Comme nous l'avons introduit dans nos objectifs, nous avons comparé les différentes capacités fonctionnelles de fibroblastes provenant de peaux de donneurs soit jeunes (<35 ans), soit âgés (>55 ans) afin de mettre en évidence d'éventuelles altérations liées à l'âge dans ce compartiment cellulaire.

En ce qui concerne la fermeture de plaie, l'analyse globale des données de migration ne montre pas de différence significative entre les fibroblastes issus de donneurs jeunes et ceux de donneurs âgés (Figure 36, gauche). Toutefois, l'observation plus détaillée de ces données permet de distinguer clairement 2 populations avec des capacités différentes de migration parmi les fibroblastes jeunes. L'analyse de la migration de chacune de ces 2 populations séparément montre qu'elles possèdent des taux de capacités migratoires très distinctes, notamment comparées à celles des fibroblastes âgés : la population des fibroblastes jeunes ayant une forte capacité de migration (appelée « jeunes migration high » dans la Figure 36 au milieu) présente une migration significativement supérieure à celle des fibroblastes âgés ; tandis que la population de fibroblastes migrant moins bien (appelée « jeunes migration low » dans la Figure 36 à droite) a une migration significativement inférieure à celle des fibroblastes âgés.



**Figure 36 : Migration de deux populations chez les fibroblastes jeunes**

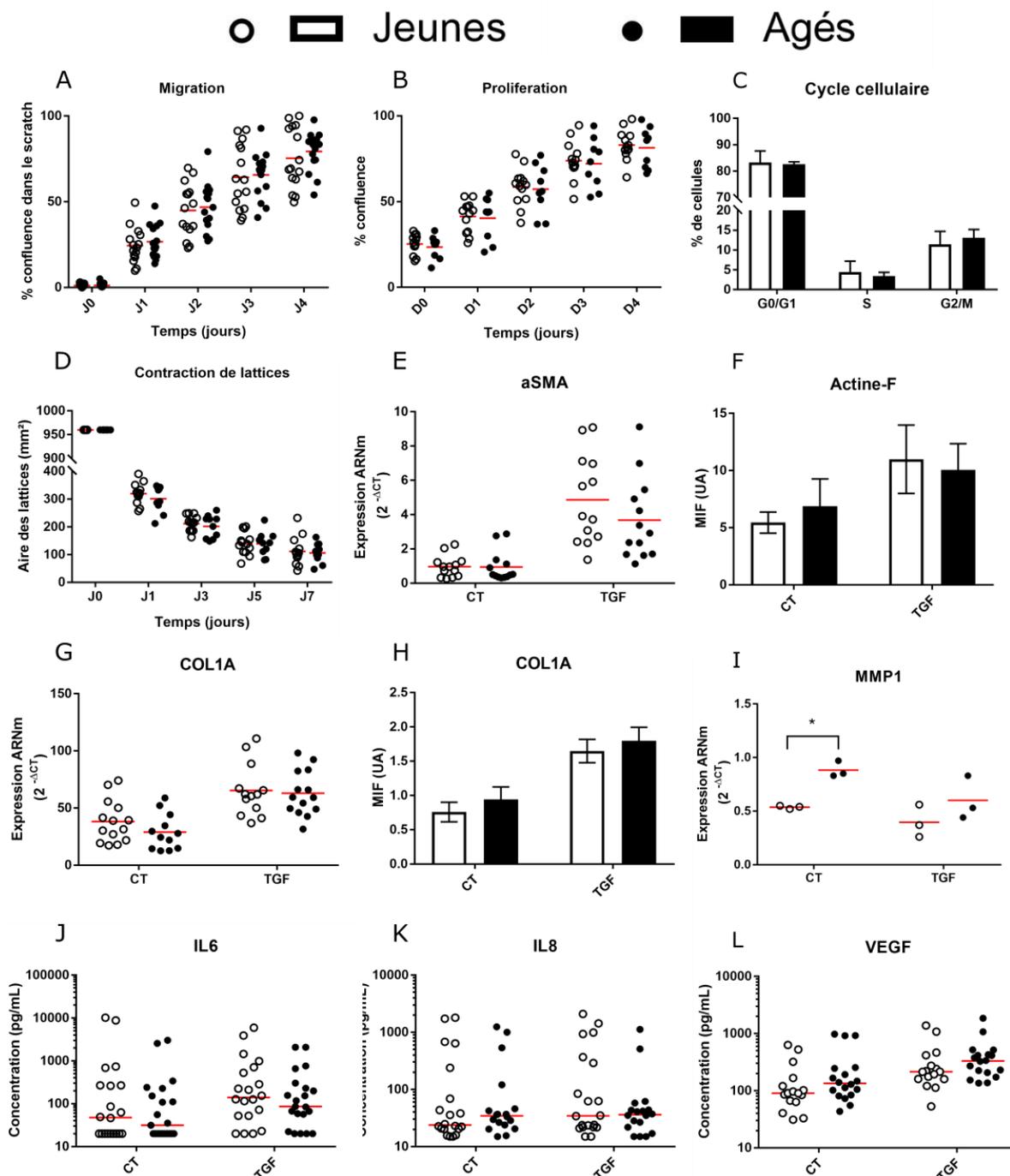
**A gauche :** Migration,  $n=15$  J et  $n=15$  A, moyenne (trait rouge), 2-way ANOVA. **Au milieu :** La population de fibroblastes jeunes migrant le plus est comparée aux fibroblastes âgés,  $n=6$  J et  $n=15$  A, moyenne (trait rouge), 2-way ANOVA et test de comparaisons multiple de Sidak. **A droite :** La population de fibroblastes jeunes migrant le moins est comparée aux fibroblastes âgés,  $n=9$  J et  $n=15$  A, moyenne (trait rouge), 2-way ANOVA et test de comparaisons multiple de Sidak

Notre hypothèse est que les fibroblastes qui migrent à partir des explants de peaux jeunes pourraient représenter les 2 populations distinctes présentes initialement dans la peau jeune, à savoir celle des fibroblastes papillaires, qui migreraient davantage, et celle des fibroblastes réticulaires, plus profonds, qui migreraient moins. Dans la peau âgée, seule la population de fibroblastes réticulaires persisterait, comme le suggère la littérature (Mine et al., 2008).

Les autres fonctions testées sont la prolifération, le cycle cellulaire, la contraction de lattices de collagène, les marqueurs de myofibroblastes et la production de collagène I et de cytokines. Les résultats sont présentés dans la Figure 37. L'analyse de la prolifération met en évidence une grande variabilité interindividuelle, empêchant alors d'observer une différence significative entre les fibroblastes jeunes et âgés. Le cycle cellulaire et la contraction de lattices de collagène montrent en revanche moins de variabilité mais ne permettent pas cependant de mettre en évidence une différence entre les 2 groupes étudiés. L'étude de l'expression génique d' $\alpha$ SMA ainsi que celle de l'expression protéique de la F-actine ne montrent pas de différence significative entre les fibroblastes jeunes et âgés, mais là encore une grande variabilité est observée, notamment dans les conditions basales. De la même façon, l'étude du collagène I montre des résultats similaires. Une augmentation significative de MMP1 est observée avec l'âge en condition basale ; l'étude sur un plus grand nombre d'échantillons devrait permettre de mettre en évidence une différence significative en condition TGF- $\beta$  également. Enfin, aucune différence significative n'est observée en ce qui concerne la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de VEGF. Mais encore une fois, la variabilité des données est très

importante, de telle sorte que l'échelle a dû être affichée en logarithme pour pouvoir représenter tous les donneurs. Etant donné la variabilité observée dans presque tous les paramètres mesurés, il serait nécessaire d'augmenter le nombre d'échantillons jeunes et âgés afin de pouvoir mettre en évidence plusieurs populations distinctes et des différences significatives entre fibroblastes jeunes et âgés, comme nous avons pu le faire pour la migration. L'analyse des sous-populations permettrait alors d'identifier les fonctions réellement altérées avec le temps.

A noter que nous avons pour objectif initial d'identifier les fonctions fibroblastiques altérées avec l'âge afin de déterminer si elles pouvaient être modifiées, voire restaurées, avec COHE. Cependant, comme nous venons de le voir, les résultats obtenus dans les conditions utilisées ne permettent pas d'observer de réelle différence de fonction entre les fibroblastes issus de donneurs jeunes ou âgés. Nous n'avons dès lors pas été encore en mesure de déterminer l'efficacité éventuelle de COHE sur une peau âgée.



**Figure 37 : Comparaison de fibroblastes jeunes et âgés**

Des fibroblastes jeunes (J, <35 ans) et âgés (A, >55 ans) sont utilisés pour comparer leurs capacités. **A/** Migration,  $n=15$  J et  $n=15$  A, moyenne (trait rouge), 2-way ANOVA. **B/** Prolifération,  $n=13$  J et  $n=9$  A, moyenne (trait rouge), 2-way ANOVA. **C/** Cycle cellulaire,  $n=5$  J et  $n=4$  A, moyenne  $\pm$  SD, 2-way ANOVA. **D/** Contraction,  $n=13$  J et  $n=10$  A, moyenne, 2-way ANOVA. **E/** Expression du gène aSMA par RTqPCR,  $n=13$  J et  $n=13$  A, moyenne (trait rouge), 2-way ANOVA. **F/** Quantification de la F-actine par IF,  $n=3$  J et  $n=3$  A, moyenne  $\pm$  SD, 2-way ANOVA. **G/** Expression du gène COL1A par RTqPCR,  $n=14$  J et  $n=14$  A, moyenne (trait rouge), 2-way ANOVA. **H/** Quantification du COL1A par IF,  $n=3$  J et  $n=3$  A, moyenne  $\pm$  SD, 2-way ANOVA. **I/** Expression du gène MMP1 par RTqPCR,  $n=3$  J et  $n=3$  A, moyenne (trait rouge), 2-way ANOVA et test de comparaisons multiple de Sidak. **J/** Quantification par ELISA de la sécrétion d'IL6,  $n=20$  J et  $n=21$  A, médiane (trait rouge), 2-way ANOVA. **K/** Quantification par ELISA de la sécrétion d'IL8,  $n=20$  J et  $n=18$  A, médiane (trait rouge), 2-way ANOVA. **L/** Quantification par ELISA de la sécrétion de VEGF,  $n=16$  J et  $n=18$  A, médiane (trait rouge), 2-way ANOVA.

## 5. Discussion et perspectives

Ainsi, dans notre première étude, nous démontrons que COHE présente de nombreux effets sur les fonctions des deux populations cellulaires clé de la peau : les fibroblastes et les kératinocytes.

L'étude de la production de cytokines inflammatoires en présence de COHE indique une augmentation de la production d'IL-6 (par les fibroblastes et les myofibroblastes) et IL-8 (par les fibroblastes, myofibroblastes et kératinocytes). Ces cytokines sont impliquées dans le chimiotactisme des neutrophiles, la perméabilité endothéliale, la migration et la prolifération des kératinocytes entre autres (Barrientos et al., 2008; Werner and Grose, 2003). Leur augmentation peut potentiellement induire un meilleur recrutement des neutrophiles, essentiels à la détersion de la plaie mais elle peut aussi favoriser la phase de réparation. RANTES n'est quant à elle pas influencée par la présence de COHE. Cette chimiokine permet le recrutement et l'activation des leucocytes en général, mais particulièrement des basophiles et éosinophiles qui sont impliqués dans les phénomènes d'allergies. L'augmentation de son expression a été démontrée dans certaines pathologies inflammatoires (Lechner and von Baehr, 2015) tandis qu'une forte diminution est retrouvée dans les plaies chroniques (Bekeschus et al., 2017). En revanche, la production de GRO $\alpha$ , un puissant chimioattractant permettant le recrutement des neutrophiles (Barrientos et al., 2008; Ellis et al., 2018) est diminuée en présence de COHE.

Ces résultats suggèrent que COHE pourrait avoir une influence sur la phase inflammatoire de la cicatrisation, en favorisant l'arrivée des cellules immunitaires sur le site. Cette augmentation de cytokines pro-inflammatoires est légèrement contrebalancée par la diminution de GRO $\alpha$ , ce qui pourrait s'avérer bénéfique. Il est possible que COHE n'induisse qu'une stimulation partielle de la réponse inflammatoire qui reste ainsi modérée, évitant une activation exacerbée et le risque d'une phase inflammatoire non résolue conduisant à une cicatrisation non efficace, devenant chronique.

Nos expériences montrent aussi que COHE induit une augmentation significative de la prolifération des fibroblastes, ainsi qu'une augmentation de leur capacité à migrer et à permettre la fermeture d'une blessure. Ces deux activités sont essentielles à la phase de réparation dans le processus de cicatrisation. Elles permettent aux fibroblastes d'arriver en

nombre sur le site lésé et de colmater la lésion en produisant une nouvelle matrice extracellulaire. Les kératinocytes quant à eux permettent la réépithélialisation de la blessure par migration, prolifération et différenciation. Cependant, COHE semble peu efficace sur la prolifération des kératinocytes, et pourrait même diminuer leur migration. En revanche, COHE semble modifier la différenciation épidermique comme nous l'avons observé sur des explants de peaux saines. En analysant l'expression des marqueurs de différenciation épidermique, notamment les kératines 5 et 10 (K5 et K10) qui sont exprimées différenciellement selon les strates de l'épiderme, il apparaît que COHE augmente le ratio K10/K5 aux dilutions 1 et 5%. Cet indicateur de l'état de différenciation suggère que cet extrait de plante peut favoriser une bonne différenciation de l'épiderme à ces dilutions. L'augmentation de la différenciation des kératinocytes est en accord avec leurs capacités de prolifération et migration diminuées, puisque seules les cellules de la couche basale ont la capacité de proliférer et de migrer, les autres se différenciant.

Somme toute, nos données indiquent que COHE peut améliorer la phase de réparation cutanée d'une peau lésée ou juste irritée en favorisant non seulement la migration et la prolifération des fibroblastes mais également en facilitant la différenciation des kératinocytes, pour assurer la reconstitution d'un épiderme structuré.

Comme le démontrent les essais de contraction en lattices de collagène, COHE induit une meilleure capacité contractile des fibroblastes qui permettrait ainsi une meilleure contraction de leur environnement matriciel, et donc potentiellement la contraction et fermeture d'une plaie, favorisant alors la cicatrisation.

L'angiogenèse, événement crucial de la cicatrisation (Werner and Grose, 2003), est positivement influencée par COHE. En effet le VEGF, qui permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, est significativement augmenté dans les surnageants de fibroblastes mis en contact avec COHE aux dilutions 1 et 5 %.

Toutefois, l'activation des fibroblastes en myofibroblastes semble inchangée en présence de COHE. Si une augmentation de l'activation des ARNm du TGF- $\beta$  (facteur autocrine responsable de l'activation des fibroblastes en myofibroblastes) est observée pour la dilution 0,1%, l'activation de l'expression génique d' $\alpha$ SMA n'est pas significativement modifiée, tout

comme l'expression protéique de la F-actine. Ainsi, COHE n'a pas d'effet sur les fibres de stress des myofibroblastes et la capacité des fibroblastes à s'activer en myofibroblastes.

Par ailleurs, nous avons étudié l'effet de COHE sur différents éléments de la MEC. L'expression génique des collagènes I et III est diminuée tandis que celle des MMP 1 et 3 est augmentée et celle de TIMP1 peu modifiée. Toutefois, l'expression protéique du collagène I ne semble guère modifiée. Qu'en est-il de celle du collagène III ? L'activité enzymatique des MMP est-elle réellement altérée ? Une analyse en zymographie permettrait de répondre à cette dernière question. Une diminution de la production des collagènes associée à une augmentation de l'activité des MMP conduirait à un déséquilibre du remodelage de la MEC avec *in fine* une diminution de la quantité globale des collagènes, essentiels à la structure de la peau.

De plus, nous avons étudié des marqueurs de l'intégrité de la structure de l'épiderme. L'aquaporine 3 qui est impliquée dans l'hydratation, n'est pas influencée alors que la E-cadhérine (impliquée dans les jonctions adhérentes) est diminuée à la dilution 5%. Ceci pourrait-il suggérer une altération de la cohésion épidermique ou juste une différenciation en pleine activité ? D'autres expériences seront cependant nécessaires pour conclure.

L'ensemble des effets de COHE aux différentes dilutions étudiées est résumé dans le tableau 6. Aux dilutions 1 et 5 %, COHE montre des effets bénéfiques, bien que la dilution 5% présente aussi des effets délétères : diminution de la viabilité, déséquilibre de la balance du remodelage de la MEC, diminution de la cohésion de la peau. Ainsi, la dilution 1% semble être la plus bénéfique des dilutions testées pour faciliter la cicatrisation d'une petite plaie. En effet, elle n'a pas d'effet délétère sur la viabilité des cellules et induit une augmentation de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8, favorisant ainsi la phase inflammatoire stimulante de la cicatrisation. Elle induit également une augmentation de la prolifération et de la migration des fibroblastes ainsi qu'une augmentation de la production du facteur pro-angiogénique le VEGF. Ces éléments sont en faveur d'une phase de réparation améliorée.

**En conclusion de cette partie**, d'après nos études *in vitro*, l'utilisation de COHE à la dilution 1% peut sensiblement améliorer les phases d'inflammation et de réparation de la cicatrisation cutanée.

**Tableau 6 : Résumé des effets observés de COHE sur les différentes phases de la cicatrisation cutanée**

Les tendances sont indiquées par des flèches rouges pour un effet délétère et des flèches vertes pour un effet bénéfique.

Phase de cicatrisation	Paramètre observé	Cellules	COHE 0,5%	COHE 1%	COHE 5%	Total
/	Viabilité	Fibroblastes	∅	∅	∅	1 ↘ à 5%
		Kératinocytes	∅	∅	↘	
Inflammation	IL-6	Fibroblastes	∅	∅	↗	1 ↗ à 1% 2 ↗ et 1 ↘ à 5%
	GRO $\alpha$	Kératinocytes	∅	∅	↘	
	IL-8	Fibroblastes	∅	↗	↗	
		Kératinocytes	∅	∅	∅	
	RANTES	Fibroblastes	∅	∅	∅	
		Kératinocytes	∅	∅	∅	
Réparation	Prolifération	Fibroblastes	↗	↗	↗	3 ↗ et 1 ↘ à 0,5% 5 ↗ et 1 ↘ à 1% 4 ↗ à 5%
		Kératinocytes	∅	∅	∅	
	Migration	Fibroblastes	↗	↗	∅	
		Kératinocytes	↘	↘	/	
	Différenciation	Kératinocytes	∅	↗	↗	
	VEGF	Fibroblastes	∅	↗	↗	
	Activation en myofibroblastes	Fibroblastes	∅	∅	∅	
	synthèse COL1A	Fibroblastes	∅	∅	∅	
	Contraction	Fibroblastes	↗	↗	↗	
Remodelage	ARNm COL3A	Fibroblastes	∅	∅	↘	1 ↘ à 1% 3 ↘ à 5%
	Balance ARNm MMP/TIMP	Fibroblastes	∅	∅	↘	
	Structure épiderme	Kératinocytes	/	↘	↘	
<b>Total</b>			<b>3 ↗ 1 ↘</b>	<b>6 ↗ 2 ↘</b>	<b>6 ↗ 5 ↘</b>	

Après avoir caractérisé *in vitro* les effets de COHE, il nous est paru intéressant de comparer ses effets à ceux d'un agent végétal cicatrisant connu : l'*Aloe vera*. L'*Aloe vera* est en effet une plante médicinale utilisée depuis plus de 5000 ans dans le domaine de la dermatologie. Elle a été utilisée pour la première fois par les Egyptiens pour traiter les plaies, brûlures et infections. Les Grecs, Espagnols et Africains ont eux aussi utilisé cette plante par la suite pour diverses indications (Hashemi et al., 2015).

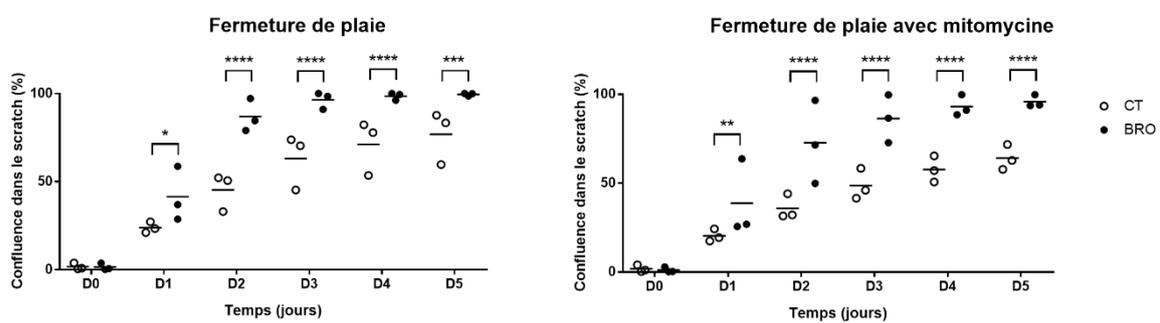
De nombreuses études récentes documentent son activité et ses effets bénéfiques pour la cicatrisation : l'*Aloe vera* induit une augmentation de la prolifération et de la migration des fibroblastes et des kératinocytes (Teplicki et al., 2018; Wahedi et al., 2017), du recrutement des macrophages et des neutrophiles, de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TGF- $\beta$ ), ainsi que de l'angiogenèse (Wahedi et al., 2017). Ces effets sont, en grande partie, similaires à ceux de COHE. La synthèse de collagène et d'acide hyaluronique est également augmentée (Tanaka et al., 2015). Toutes ces observations sont en faveur d'une cicatrisation améliorée, ce qui a été montré sur un modèle murin présentant une cicatrisation accélérée (Kusmardi et al., 2019; Wahedi et al., 2017).

Des études ont également été réalisées chez l'homme et démontrent l'efficacité de l'*Aloe vera* dans le traitement des brûlures, comme le décrit une revue bibliographique réalisée par Maenthaisong et al. (2007). L'analyse de 4 études cliniques comprenant 371 patients révèle un temps de cicatrisation raccourci et une réépithélialisation plus efficace en présence d'*Aloe vera*. Les auteurs en concluent que l'*Aloe vera* pourrait être efficace dans le cas des brûlures du premier et second degré. Une autre revue systématique évalue l'utilisation de l'*Aloe vera* dans le cadre de plaies aiguës et chroniques (Dat et al., 2012). Elle a inclus 7 études avec 347 patients, mais conclut que ces études cliniques sont trop hétérogènes et contiennent des biais, pour pouvoir conclure positivement quant à l'efficacité de l'*Aloe vera* dans ce contexte.

L'*Aloe vera* est également associée à des pansements à base d'alginate. Pereira et al. (2013) montrent que l'absorption de l'eau par les pansements est dépendante de la quantité contenue en *Aloe vera*, ce qui est une caractéristique utile pour permettre la libération contrôlée de molécules bioactives. Ils démontrent également que la dégradation protéolytique des pansements est améliorée en présence d'*Aloe vera* alors qu'ils restent résistants à la dégradation hydrolytique. Plusieurs études récentes démontrent les effets

bénéfiques de cette association (Gómez Chabala et al., 2017; Koga et al., 2018; Rubio-Elizalde et al., 2019).

Notre équipe étudie actuellement l'effet de pansements à base d'alginate sur la réponse innée dans la cicatrisation et a déjà démontré leur effet bénéfique sur les fibroblastes dermiques (données en cours de publication). De la même façon, on peut supposer qu'une association de COHE avec des milieux conditionnés de pansements à base d'alginate pourrait être efficaces dans le cas de plaies cutanées étendues. Récemment, nous avons réalisé une étude proche de celle de COHE, sur les effets d'un milieu conditionné provenant d'un pansement à base d'alginate de calcium : Algostérial®. Sans détailler cette étude confidentielle<sup>1</sup>, nous observons que le pansement, appelé ici BRO, favorise la migration des fibroblastes dans les expériences de fermeture de plaies *in vitro* (*scratching assay*, Incucyte®), comme le montre la Figure 38. Ces résultats indiquent également que la fermeture de plaie par les fibroblastes n'implique que peu la prolifération car la présence de mytomicine n'affecte la fermeture que dans les conditions contrôles au troisième jour ( $p < 0,05$ ). Aucune différence significative de la fermeture de la blessure n'est observée en présence de l'agent anti-mitotique et du pansement. Ceci indique clairement que le pansement agit principalement sur la migration des fibroblastes pour favoriser la réparation cutanée. Ce résultat est rassurant pour ce pansement qui ainsi stimulerait principalement la réparation du tissu cutané, sans favoriser pour autant une fibrose. Comme le montre son utilisation en clinique, l'application



**Figure 38 : Migration des fibroblastes en présence du milieu conditionné BRO**

10 000 fibroblastes sont ensemencés par puits (5 réplicats par condition) de P96. Après 24h, la mitomycine est ajoutée à la concentration de 10µg/mL pendant 2h puis une blessure (scratch) est réalisée. La confluence dans le scratch est mesurée chaque jour grâce au système Incucyte® S3 Live Cell Analysis. Trois donneurs indépendants sont représentés individuellement avec la moyenne (trait noir),  $n=3$ , 2-way ANOVA et test de comparaison multiple de Dunnett.

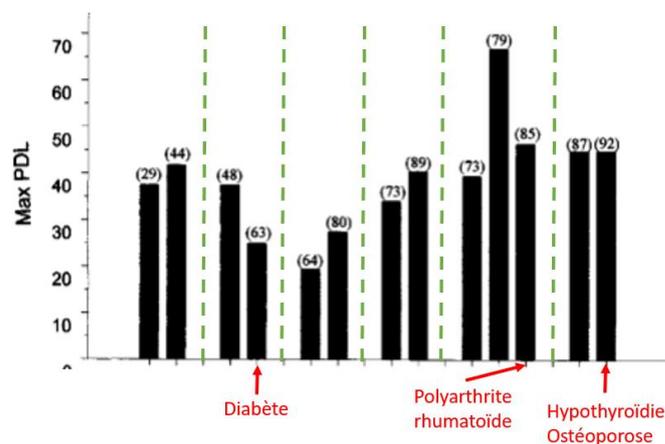
<sup>1</sup> . Pour cette étude, je rédige actuellement en premier auteur un court article destiné à un journal spécialisé tel que « *Wound Repair and Regeneration* ».

répétée de ce pansement sur les plaies aiguës favorise en effet une réparation efficace, non fibrosante.

Concernant l'étude des fonctions potentiellement altérées avec le temps, nous n'avons trouvé que très peu de différence significative entre les fibroblastes jeunes et âgés. Des données de la littérature ont pourtant déjà démontré certaines différences liées à l'âge. Les travaux de Hayflick dans les années 60 (résumés dans Hayflick, 1979) semblent avoir suscité de l'intérêt pour l'étude du vieillissement en montrant pour la première fois une capacité de prolifération des fibroblastes inversement proportionnelle à l'âge du donneur. Il évalue cette capacité en établissant le niveau de doublement de la population (PDL) qui correspond au nombre maximal de doublement qu'une population cellulaire peut effectuer en culture. Des résultats similaires sont obtenus par Schneider, 1979 qui montrent un PDL et une vitesse de prolifération diminuée avec l'âge du donneur. Reed et al. (1994) démontrent également une prolifération diminuée avec l'âge en observant le taux de synthèse d'ADN. Leurs travaux suivants (Reed et al., 2001) mettent en évidence une variabilité interindividuelle chez les donneurs âgés, avec des fibroblastes ayant une bonne capacité migratoire et d'autres avec une capacité diminuée, en association avec une moins bonne contraction en lattices. Boraldi et al. (2003) ont également montré une diminution de la prolifération des fibroblastes liée à l'âge, mais cette différence n'est significative qu'en comparaison à un groupe très jeune de donneurs ( $15 \pm 2$  ans) et ils n'observent pas de différence entre les autres tranches d'âge ( $41 \pm 4$  ans et  $82 \pm 3$  ans). Mine et al. (2008) montrent que seuls les fibroblastes papillaires subissent une modification de leur capacité fonctionnelle avec le temps (diminution de la prolifération, augmentation de la contraction) tandis que les réticulaires ne semblent pas influencés. Notre équipe a également montré des différences liées à l'âge : augmentation d'ARNm liés à la sénescence associée à une diminution d'ARNm liés au cycle cellulaire ou à la MEC (COL1 et 3A), activation en myofibroblastes, contraction de collagène, et migration en réponse au PDGF- $\beta$  diminués (Brun et al., 2016). De nombreuses études s'accordent pour démontrer une différence de transcriptome / sécrétome / protéome entre des fibroblastes issus de donneurs jeunes et âgés bien que les molécules mises en évidence soient rarement les mêmes (Boraldi et al., 2003; Haydont et al., 2019; Solé-Boldo et al., 2019; et données non publiées de notre équipe). La balance rédox est modifiée (Boraldi et al., 2010; Brun et al., 2016), les MMP augmentées (Reed et al., 2001; Shin et al., 2019) et les cytokines associées à

la sénescence sont augmentées (Brun et al., 2016; Waldera Lupa et al., 2015). Des études *in situ* comme celle de Varani et al. (2006) ont démontré des modifications de la structure dermique liées à l'âge, avec l'observation de réseaux de collagènes désorganisés, plus fins, moins en contact avec des fibroblastes qui sont moins étalés et ont moins d'adhésions focales.

Cependant, de nombreux travaux ne montrent pas de différence fonctionnelle liée à l'âge. La contraction de lattices de collagène et la production de collagène I en réponse au TGF- $\beta$  ne semblent pas influencées selon Reed et al. (1994). Les travaux suivants de cette même équipe (Reed et al., 2001) ne permettent pas de conclure à une réelle implication du temps dans les diminutions de contraction et migration observées. Les travaux de Cristofalo et al. (1998) sont particulièrement intéressants : ils ont analysé les fibroblastes issus de 120 donneurs de tout âge (certifiés sains par un examen médical) et montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre le PDL / vitesse de prolifération et l'âge du donneur. Ils possèdent également des fibroblastes issus du même donneur mais à différents âges avec jusqu'à 16 ans de différence. Ils montrent que pour un même donneur, les capacités prolifératives des fibroblastes ne sont pas diminuées avec le temps, mais sont au contraire souvent augmentées (5 donneurs sur 6) (Figure 39).



**Figure 39 : Evolution du PDL en fonction de l'âge du donneur**

*Modifiée d'après Cristofalo et al., 1998*

*Dans cette étude, les auteurs disposent de prélèvements de 6 donneurs à différents âges (chiffre indiqué entre parenthèse au-dessus des barres). Les donneurs étaient sains au moment de leur inclusion dans l'étude mais ont pu par la suite développer des pathologies, indiquées en rouge par des flèches sur le prélèvement concerné.*

C'est la seule étude à ma connaissance ayant pu étudier les fibroblastes issus d'un même donneur avec autant d'écart dans le temps, ce qui serait peut-être le meilleur modèle d'étude

du vieillissement de cette population. Boraldi et al. (2010) montrent également qu'il n'y a pas de modification de PDL, morphologie, ou d'expression de la F-actine avec le temps.

Il est largement accepté aujourd'hui que les fibroblastes perdent en capacité avec le temps, et ce dogme a permis d'émettre l'hypothèse d'une cicatrisation moins efficace chez les personnes âgées. Il existe cependant de nombreuses données contradictoires et certaines capacités, comme la prolifération, demeurent aujourd'hui incertaines quant à leur évolution dans le temps. Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer ces différences d'observation, dont celle de l'hétérogénéité fibroblastique. Il est en effet désormais relativement admis que le derme est composé d'au moins 2 populations de fibroblastes distinctes : les fibroblastes papillaires et les fibroblastes réticulaires, qui ont des capacités différentes (Mine et al., 2008; Stunova and Vistejnova, 2018). Or dans la plupart des études portant sur le vieillissement des fibroblastes dermiques citées précédemment, il n'est pas précisé (car très probablement inconnu) sur quel type de fibroblastes sont réalisées les expériences. Il est probable qu'il s'agisse plutôt de fibroblastes papillaires ou encore de mélanges de populations ou d'échantillons de populations différentes. De plus, Balin (2002) met en évidence plusieurs populations de fibroblastes coexistantes avec des capacités différentes en faisant migrer successivement 4 fois des fibroblastes des mêmes explants. Ils montrent également que les capacités des fibroblastes sont influencées par la concentration en  $O_2$  et le milieu de culture utilisé. Or toutes les études citées précédemment n'utilisent pas le même milieu de culture (MEM, DMEM ou RPMI). Cristofalo et al. (1998) supposaient que de nombreuses études tiennent leurs fibroblastes « âgés » de donneurs qui ne seraient pas sains, ce qui peut grandement influencer les résultats. Il est évident que plus l'âge est avancé, plus il est difficile d'obtenir des prélèvements de sujets parfaitement sains et de corrélérer les résultats uniquement à l'âge. De plus, la moyenne d'âge des différents groupes est souvent bien différente d'une étude à une autre, surtout concernant la limite entre jeunes et âgés. Enfin, la technique de purification des cellules n'est pas assez standardisée pour pouvoir comparer toutes les études : site anatomique de biopsie, taille de biopsie, profondeur de derme, temps de sortie des fibroblastes des explants, milieu de culture.

Toutes ces données permettent d'expliquer que nous n'observons pas de différence réellement significative entre fibroblastes de donneurs jeunes et âgés. Nous ne pouvons

affirmer avec certitude à l'heure actuelle quelle est la population (papillaire ou réticulaire) majoritaire de nos cultures. Ces deux populations sont peut-être responsables des différences de migration observées parmi les fibroblastes jeunes (Figure 36). Afin de répondre à la question, nous analysons actuellement plusieurs marqueurs décrits dans la littérature comme spécifiques et permettant de différencier les 2 populations fibroblastiques : papillaires et réticulaires.

Différents paramètres peuvent influencer les résultats obtenus. Entre autres, nous utilisons comme milieu de culture, du RPMI, qui est moins utilisé par les autres équipes (ceci est dû à notre intérêt pour l'analyse des populations immunes également). Nous pouvons également suggérer que bien que les peaux que nous recevons de chirurgie plastique soient en théorie issues de femmes en bonne santé, il n'est pas impossible que certaines pathologies ou traitements non liés à la chirurgie ne soient pas déclarés et qu'ils puissent influencer le comportement des fibroblastes. De plus, les peaux que nous utilisons sont issues de plasties mammaires, une partie anatomique à l'abri du soleil la plupart du temps. Ce n'est cependant pas forcément vrai pour tous les cas avec la pratique du « topless », et ce sans que nous puissions le vérifier ; les altérations des fibroblastes induites par les rayonnements ultraviolets étant nombreuses. Enfin, nous ne pratiquons pas de sélection en fonction de la couleur de peau : les fibroblastes sont dès lors issus de donneurs de n'importe quel phototype, ce qui ne permet pas de tenir compte des différences de structure et des modulations géniques liées au phototype.

**En conclusion de cette partie**, nos données actuelles obtenues avec les conditions décrites dans ce mémoire, ne mettent pas en évidence de différence majeure des capacités fonctionnelles des fibroblastes issus de peaux jeunes et âgées.

**Perspectives** : De façon générale, comme déjà discuté ci-avant, différentes expériences complémentaires seraient utiles pour enrichir l'ensemble de nos données, à savoir : des études géniques en RT-qPCR de TIMP ou MMP sur les fibroblastes de peaux jeunes et âgées ; la quantification par ELISA du collagène, voire du TGF- $\beta$  sécrété pour l'activation des fibroblastes. En ce qui concerne l'étude de l'extrait de COHE, nous pourrions également compléter nos données par une quantification du collagène de type 3 au niveau protéique par immunofluorescence notamment, pour valider un effet sur la sécrétion de ce collagène qui

serait généré sous l'effet de COHE dès les premières phases de la réparation cutanée et qui pourrait différer avec l'âge. Peut-être l'activité des MMP varie-t-elle localement avec l'âge ou encore sous l'effet des plantes de la MTC, ce que nous pourrions vérifier par une approche en zymographie. Enfin, la caractérisation des sous-populations fibroblastiques ouvrira un nouveau champ d'investigation qui permettra de mieux caractériser les altérations du derme liées au vieillissement intrinsèque associé à l'horloge biologique, ce qui offrira de nouvelles cibles potentielles en cosmétique et en dermatologie. Si nous identifions des altérations potentielles en adaptant nos approches expérimentales, dont l'analyse des sous-populations cellulaires, nous serons peut-être en mesure de déterminer si COHE peut améliorer la cicatrisation d'une peau âgée. Une étude sur les fonctions kératinocytaires en fonction de l'âge du donneur pourrait être également envisagée pour compléter notre étude comparative entre peau jeune et peau mature ainsi que l'étude des plantes médicinales de la MTC.

**En conclusion,** si nos données actuelles ne mettent pas en évidence de différences majeures entre fibroblastes jeunes et âgés dans leurs propriétés fonctionnelles, elles décrivent des effets bénéfiques sur la cicatrisation d'une plante médicinale de la MTC : la racine d'*Ophiopogon japonicus*. Cet extrait devrait ainsi favoriser la réparation des inflammations cutanées bénignes et la guérison des plaies superficielles.

Nous poursuivons en analysant les effets biologiques de plusieurs autres produits de la MTC. Nous avons identifié d'autres produits capables de favoriser la réparation cutanée, tels qu'un extrait de *Dendrobium candidum* et un autre de *Selaginella*. D'autres produits ayant des propriétés anti-inflammatoires ont été mis en évidence, dont un extrait de *Dictyophora indusiata*, et différents polysaccharides issus de plantes (ex : Mannan, Saccharide isomérate et Fucose). Des travaux seront menés avec ces extraits pour déterminer s'ils sont utilisables en pratique cosmétique, voire dermatologique, comme ce sera le cas pour COHE dans un avenir proche.



## 6. Références bibliographiques

- Abraham, J., and Mathew, S. (2019). Merkel Cells: A Collective Review of Current Concepts. *Int J Appl Basic Med Res* 9, 9–13.
- Balin, A. (2002). Effects of Establishing Cell Cultures and Cell Culture Conditions on the Proliferative Life Span of Human Fibroblasts Isolated from Different Tissues and Donors of Different Ages. *Experimental Cell Research* 274, 275–287.
- Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., and Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology* 30, 257–262.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2008). PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 16, 585–601.
- Bekeschus, S., Schmidt, A., Napp, M., Kramer, A., Kerner, W., von Woedtke, T., Wende, K., Hasse, S., and Masur, K. (2017). Distinct cytokine and chemokine patterns in chronic diabetic ulcers and acute wounds. *Experimental Dermatology* 26, 145–147.
- Boraldi, F., Bini, L., Liberatori, S., Armini, A., Pallini, V., Tiozzo, R., Pasquali-Ronchetti, I., and Quaglino, D. (2003). Proteome analysis of dermal fibroblasts cultured in vitro from human healthy subjects of different ages. *Proteomics* 3, 917–929.
- Boraldi, F., Annovi, G., Tiozzo, R., Sommer, P., and Quaglino, D. (2010). Comparison of ex vivo and in vitro human fibroblast ageing models. *Mechanisms of Ageing and Development* 131, 625–635.
- Boury-Jamot, M., Sougrat, R., Tailhardat, M., Varlet, B.L., Bonté, F., Dumas, M., and Verbavatz, J.-M. (2006). Expression and function of aquaporins in human skin: Is aquaporin-3 just a glycerol transporter? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758, 1034–1042.
- Bowler, P.G., Duerden, B.I., and Armstrong, D.G. (2001). Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 244–269.
- Bragulla, H.H., and Homberger, D.G. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy* 214, 516–559.
- Breitkreutz, D., Koxholt, I., Thiemann, K., and Nischt, R. (2013). Skin Basement Membrane: The Foundation of Epidermal Integrity—BM Functions and Diverse Roles of Bridging Molecules Nidogen and Perlecan. *BioMed Research International* 2013, 1–16.
- Brun, C., Jean-Louis, F., Oddos, T., Bagot, M., Bensussan, A., and Michel, L. (2016). Phenotypic and functional changes in dermal primary fibroblasts isolated from intrinsically aged human skin. *Experimental Dermatology* 25, 113–119.
- Cañedo-Dorantes, L., and Cañedo-Ayala, M. (2019). Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *International Journal of Inflammation* 2019, 1–15.

Chak, K.-F., Hsiao, C.-Y., and Chen, T.-Y. (2013). A Study of the Effect of Shiunko, a Traditional Chinese Herbal Medicine, on Fibroblasts and Its Implication on Wound Healing Processes. *Advances in Wound Care* 2, 448–455.

Chen, M.-H., Chen, X.-J., Wang, M., Lin, L.-G., and Wang, Y.-T. (2016). *Ophiopogon japonicus*—A phytochemical, ethnomedicinal and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology* 181, 193–213.

Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., and Tymińska, A. (2013). Skin melanocytes: biology and development. *Pdia* 1, 30–41.

Cristofalo, V.J., Allen, R.G., Pignolo, R.J., Martin, B.G., and Beck, J.C. (1998). Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: A reevaluation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 10614–10619.

Dat, A.D., Poon, F., Pham, K.B., and Doust, J. (2012). Aloe vera for treating acute and chronic wounds. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

Doebel, T., Voisin, B., and Nagao, K. (2017). Langerhans Cells – The Macrophage in Dendritic Cell Clothing. *Trends in Immunology* 38, 817–828.

Ellis, S., Lin, E.J., and Tartar, D. (2018). Immunology of Wound Healing. *Current Dermatology Reports* 7, 350–358.

Geras, A.J. (1990). *Dermatology : a medical artist's interpretation* (Sandiz Medical Publications, Sandoz Pharma Ltd).

Gómez Chabala, L., Cuartas, C., and López, M. (2017). Release Behavior and Antibacterial Activity of Chitosan/Alginate Blends with Aloe vera and Silver Nanoparticles. *Marine Drugs* 15, 328.

Gonzales, K.A.U., and Fuchs, E. (2017). Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche. *Developmental Cell* 43, 387–401.

Greaves, N.S., Ashcroft, K.J., Baguneid, M., and Bayat, A. (2013). Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *Journal of Dermatological Science* 72, 206–217.

Guerrero-Juarez, C.F., and Plikus, M.V. (2018). Emerging nonmetabolic functions of skin fat. *Nat Rev Endocrinol* 14, 163–173.

Hashemi, S.A., Madani, S.A., and Abediankenari, S. (2015). The Review on Properties of Aloe Vera in Healing of Cutaneous Wounds. *BioMed Research International* 2015, 1–6.

Haydont, V., Bernard, B.A., and Fortunel, N.O. (2019a). Age-related evolutions of the dermis: Clinical signs, fibroblast and extracellular matrix dynamics. *Mechanisms of Ageing and Development* 177, 150–156.

Haydont, V., Neiveyans, V., Fortunel, N.O., and Asselineau, D. (2019b). Transcriptome profiling of human papillary and reticular fibroblasts from adult interfollicular dermis

- pinpoints the 'tissue skeleton' gene network as a component of skin chrono-ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 179, 60–77.
- Hayflick, L. (1979). The Cell Biology of Aging. *Journal of Investigative Dermatology* 73, 8–14.
- Kaisho, T., and Akira, S. (2006). Toll-like receptor function and signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117, 979–987.
- Koga, A.Y., Pereira, A.V., Lipinski, L.C., and Oliveira, M.R. (2018). Evaluation of wound healing effect of alginate films containing Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) gel. *J Biomater Appl* 32, 1212–1221.
- Korosec, A., Frech, S., Gesslbauer, B., Vierhapper, M., Radtke, C., Petzelbauer, P., and Lichtenberger, B.M. (2019). Lineage Identity and Location within the Dermis Determine the Function of Papillary and Reticular Fibroblasts in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology* 139, 342–351.
- Krieg, T., and Aumailley, M. (2011). The extracellular matrix of the dermis: flexible structures with dynamic functions: Extracellular matrix of the dermis. *Experimental Dermatology* 20, 689–695.
- Kusmardi, K., Hallim, N.B.M., Tedjo, A., Ibrahim, A., and Salinah S, S. (2019). Comparison between the Effect of Precipitate and Supernatant Aloe vera Gel on Experimental Cutaneous Wound Healing Using Optical Coherence Tomography. *PJ* 11, 405–412.
- Landén, N.X., Li, D., and Ståhle, M. (2016). Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73, 3861–3885.
- Lau, K., Paus, R., Tiede, S., Day, P., and Bayat, A. (2009). Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Experimental Dermatology* 18, 921–933.
- Lazarus, G.S. (1994). Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Archives of Dermatology* 130, 489–493.
- Leaper, D.J. (2006). Traumatic and surgical wounds. *BMJ* 332, 532–535.
- Lechner, J., and von Baehr, V. (2015). Chemokine RANTES/CCL5 as an unknown link between wound healing in the jawbone and systemic disease: is prediction and tailored treatments in the horizon? *EPMA Journal* 6, 10.
- Lee, D.H., Oh, J.-H., and Chung, J.H. (2016). Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. *Journal of Dermatological Science* 83, 174–181.
- Li, J., Chen, J., and Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology* 25, 9–18.
- Liippo, J., Toriseva, M., and Kähäri, V.-M. (2010). Natural killer cells in wound healing. In *Natural Killer Cells*, (Elsevier), pp. 519–525.

- Lin, J.Y., and Fisher, D.E. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445, 843–850.
- Losquadro, W.D. (2017). Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America* 25, 283–289.
- Maenthaisong, R., Chaiyakunapruk, N., Niruntraporn, S., and Kongkaew, C. (2007). The efficacy of aloe vera used for burn wound healing: A systematic review. *Burns* 33, 713–718.
- Matsui, T., and Amagai, M. (2015). Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *International Immunology* 27, 269–280.
- Mine, S., Fortunel, N.O., Pigeon, H., and Asselineau, D. (2008). Aging Alters Functionally Human Dermal Papillary Fibroblasts but Not Reticular Fibroblasts: A New View of Skin Morphogenesis and Aging. *PLoS ONE* 3, e4066.
- Morton, L.M., and Phillips, T.J. (2016). Wound healing and treating wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology* 74, 589–605.
- Oliverio, J., Gero, E., Whitacre, K.L., and Rankin, J. (2016). Wound Care Algorithm: Diagnosis and Treatment. *Advances in Skin & Wound Care* 29, 65–72.
- Pereira, R.F., Carvalho, A., Gil, M.H., Mendes, A., and Bártolo, P.J. (2013). Influence of Aloe vera on water absorption and enzymatic in vitro degradation of alginate hydrogel films. *Carbohydrate Polymers* 98, 311–320.
- Reed, M.J., Vernon, R.B., Abrass, I.B., and Sage, E.H. (1994). TGF- $\beta$ 1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors. *J. Cell. Physiol.* 158, 169–179.
- Reed, M.J., Ferrara, N.S., and Vernon, R.B. (2001). Impaired migration, integrin function, and actin cytoskeletal organization in dermal fibroblasts from a subset of aged human donors. *Mechanisms of Ageing and Development* 122, 1203–1220.
- Reinke, J.M., and Sorg, H. (2012). Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research* 49, 35–43.
- Rubio-Elizalde, I., Bernáldez-Sarabia, J., Moreno-Ulloa, A., Vilanova, C., Juárez, P., Licea-Navarro, A., and Castro-Ceseña, A.B. (2019). Scaffolds based on alginate-PEG methyl ether methacrylate-Moringa oleifera-Aloe vera for wound healing applications. *Carbohydrate Polymers* 206, 455–467.
- Sandrine Ellero-Simatos (2013). L'hypoderme.
- Schneider, E.L. (1979). Aging and Cultured Human Skin in Fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* 73, 15–18.
- Shedoeva, A., Leavesley, D., Upton, Z., and Fan, C. (2019). Wound Healing and the Use of Medicinal Plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2019, 1–30.

- Shin, J.-W., Kwon, S.-H., Choi, J.-Y., Na, J.-I., Huh, C.-H., Choi, H.-R., and Park, K.-C. (2019). Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. *IJMS* 20, 2126.
- Sinno, H., and Prakash, S. (2013). Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review. *Plastic Surgery International* 2013, 1–7.
- Solé-Boldo, L., Raddatz, G., Schütz, S., Mallm, J.-P., Rippe, K., Lonsdorf, A.S., Rodríguez-Paredes, M., and Lyko, F. (2019). Single-cell transcriptomes of the aging human skin reveal loss of fibroblast priming (Cell Biology).
- Sorrell, J.M. (2004). Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *Journal of Cell Science* 117, 667–675.
- Strbo, N., Yin, N., and Stojadinovic, O. (2014). Innate and Adaptive Immune Responses in Wound Epithelialization. *Advances in Wound Care* 3, 492–501.
- Stunova, A., and Vistejnova, L. (2018). Dermal fibroblasts—A heterogeneous population with regulatory function in wound healing. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 39, 137–150.
- Takeo, M., Lee, W., and Ito, M. (2015). Wound Healing and Skin Regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820.
- Tanaka, M., Misawa, E., Yamauchi, K., Abe, F., and Ishizaki, C. (2015). Effects of plant sterols derived from Aloe vera gel on human dermal fibroblasts in vitro and on skin condition in Japanese women. *CCID* 95.
- Teplicki, E., Ma, Q., E. Castillo, Zarei, M., P. Hustad, A., Chen, J., and Li, J. (2018). The Effects of Aloe vera on Wound Healing in Cell Proliferation, Migration, and Viability. *Wounds Research* 30(9) 263-268.
- Varani, J., Dame, M.K., Rittie, L., Fligel, S.E.G., Kang, S., Fisher, G.J., and Voorhees, J.J. (2006). Decreased Collagen Production in Chronologically Aged Skin. *The American Journal of Pathology* 168, 1861–1868.
- Visse, R., and Nagase, H. (2003). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circulation Research* 92, 827–839.
- Wahedi, H.M., Jeong, M., Chae, J.K., Do, S.G., Yoon, H., and Kim, S.Y. (2017). Aloesin from Aloe vera accelerates skin wound healing by modulating MAPK/Rho and Smad signaling pathways in vitro and in vivo. *Phytomedicine* 28, 19–26.
- Waldera Lupa, D.M., Kalfalah, F., Safferling, K., Boukamp, P., Poschmann, G., Volpi, E., Götz-Rösch, C., Bernerd, F., Haag, L., Huebenthal, U., et al. (2015). Characterization of Skin Aging–Associated Secreted Proteins (SAASP) Produced by Dermal Fibroblasts Isolated from Intrinsically Aged Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology* 135, 1954–1968.

Weihermann, A.C., Lorencini, M., Brohem, C.A., and de Carvalho, C.M. (2017). Elastin structure and its involvement in skin photoageing. *Int J Cosmet Sci* 39, 241–247.

Werner, S., and Grose, R. (2003). Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiological Reviews* 83, 835–870.

Yi, S., Ding, F., Gong, L., and Gu, X. (2017). Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *CSCR* 12, 233–246.

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES  
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Modulation pharmacologique de la cicatrisation cutanée

Sandy Peltier

16/07/2020

Dans le domaine de la recherche dermatologique et cosmétique, l'utilisation de produits d'origine naturelle telle que celle des plantes médicinales gagne de plus en plus d'intérêt. Cette étude a pour but d'évaluer l'effet d'une herbe utilisée en médecine traditionnelle chinoise, à savoir un extrait de racine d'*Ophiopogon japonicus*, sur la cicatrisation cutanée.

Nous avons étudié l'effet de cet extrait sur les deux types cellulaires majoritairement présents dans la peau : les fibroblastes et les kératinocytes. Nous avons tout d'abord déterminé les doses non toxiques utilisables sur les cellules d'intérêt puis nous avons observé son effet sur les principales fonctions de ces cellules impliquées dans le phénomène de la cicatrisation cutanée. Les fonctions évaluées pour les fibroblastes en présence de l'extrait incluent la production de cytokines inflammatoires et angiogéniques, la prolifération, la migration, la contraction d'une matrice de collagène et la synthèse de composants de la matrice extracellulaire. Concernant les kératinocytes, nous avons évalué leur capacité à produire des cytokines inflammatoires, à proliférer et migrer en présence de l'extrait.

Les résultats obtenus *in vitro* ont démontré que l'extrait d'*Ophiopogon japonicus* permet d'améliorer sensiblement deux des trois phases impliquées dans le processus de cicatrisation : inflammation et réparation.

Avec l'âge, le processus de cicatrisation est souvent altéré en raison de défauts fonctionnels et structurels de la peau. L'identification plus précise des altérations des fonctions spécifiques des fibroblastes de peaux âgées devrait permettre d'améliorer les soins des plaies cutanées dans la population vieillissante. Nos travaux suggèrent la présence de sous-populations fibroblastiques présentant des caractéristiques fonctionnelles qui peuvent être altérées avec l'âge. La caractérisation plus précise de ces sous-populations devrait permettre à terme de mieux traiter les défauts de cicatrisation liée à l'âge.

**Mots clés :** Peau – cicatrisation – fibroblaste – kératinocyte - *Ophiopogon japonicus* – vieillissement