

Comportement mécanique de fibroblastes de vergetures inclus dans des lattices de collagène

par Céline Viennet¹, Jacqueline Bride¹, Anny Cohen-Letessier² & Philippe Humbert¹

¹Laboratoire d'Ingénierie et de Biologie Cutanées, UFR Médecine-Pharmacie, place Saint-Jacques, 25000 Besançon; ²Laboratoire de Dermatologie, rue d'Artois, 78008 Paris

Reçu le 29 octobre 2001

RÉSUMÉ

Les vergetures se présentent comme des stries superficielles, linéaires et fusiformes. Elles apparaissent lors de circonstances exposant la peau à des modifications hormonales et à des tensions mécaniques. Des fibroblastes provenant de vergetures de femmes ont été inclus dans des gels de collagène afin d'étudier leur comportement mécanique : capacité à rétracter les lattices libres et à produire une force isométrique dans les lattices tendus.

La rétraction des lattices libres a été évaluée en mesurant leur diamètre avec une règle graduée transparente. Un dispositif de mesure des forces isomé-

triques a été utilisé pour quantifier la force engendrée par les fibroblastes sous tension. L'expression des intégrines $\alpha 2\beta 1$ (récepteurs transmembranaires) a été analysée par cytométrie de flux.

Les lattices constitués de fibroblastes de vergetures se rétractent moins vite que les lattices témoins, mais ils atteignent un diamètre final similaire. Ils développent une force isométrique plus élevée, associée à une augmentation de l'expression des intégrines $\alpha 2\beta 1$.

Par leurs propriétés mécaniques, les fibroblastes de vergetures apparaissent donc comme une population différente des fibroblastes sains.

SUMMARY Mechanical behavior of striae distensae fibroblasts included in collagen lattices

Striae distensae are characterized by linear, smooth bands of atrophic-appearing skin. Excessive steroid activity, genetic and mechanical factors and inherited defects of connective tissues are the most frequent causes of this disease. Fibroblasts derived from women presenting striae distensae lesions were included into collagen gels to study their mechanical behavior : capacity to contract free-floating lattices and to produce isometric force in tense lattices.

To measure the retracted lattice diameter, the culture dishes were placed on a transparent metric

scale. An isometric force system was used to study quantitatively the forces developed during lattice contraction. $\alpha 2\beta 1$ integrins expression (transmembrane receptors) was evaluated by flux cytometry.

Striae distensae fibroblasts contract collagen gels slower than normal human fibroblasts but the final contraction is similar. They produce a greater isometric force which is associated with enhanced $\alpha 2\beta 1$ integrins expression.

By their mechanical properties, striae distensae fibroblasts appear as a different population from normal fibroblasts.

INTRODUCTION

Les vergetures se présentent sous forme de stries linéaires ou fusiformes. Elles évoluent du rose-rouge (vergetures récentes et évolutives) au blanc nacré (vergetures anciennes).

Les vergetures apparaissent notamment lors d'hyperfonctionnement corticosurrénalien ou lors de l'administration d'hormones corticosurréaliennes par voie générale ou locale. Elles apparaissent aussi lors de l'augmentation

rapide de volume d'un organe ou du tissu adipeux sous-cutané (grossesse, prise de poids) exposant la peau à un étirement important (Moretti *et al.*, 1976). Ces deux facteurs étiologiques sont souvent associés.

Les vergetures sont des cicatrices définitives et leur pathogénie reste mal connue (Cohen-Letessier, 1998). Pour tenter d'expliquer leur formation, et d'en prévenir l'apparition, nous disposons d'un modèle de derme équivalent *in vitro*, le lattice de collagène constitué d'un mélange de fibroblastes dans un gel de collagène. Cette culture tridimensionnelle permet d'étudier la capacité

qu'ont les fibroblastes à rétracter le gel dans lequel ils sont ensemencés pour former une structure compacte (Bell *et al.*, 1976).

Le but de ce travail était de reconstituer un équivalent dermique *in vitro* à l'aide de fibroblastes issus de vergetures afin d'étudier leur comportement mécanique au sein de la matrice, comparativement à des lattices constitués de fibroblastes sains. Par comportement mécanique, nous entendons la capacité de rétraction des lattices, la quantification de la force isométrique développée au sein des lattices et l'expression des intégrines $\alpha 2\beta 1$ (récepteurs transmembranaires impliqués dans la transmission des signaux mécaniques entre la matrice et le cytosquelette de microfilaments contractiles (Wang *et al.*, 1993)).

MATERIEL ET METHODES

Cellules

Des prélèvements cutanés de vergetures récentes, de vergetures anciennes et de peau saine avoisinante (punch-biopsie 2-3 mm de diamètre) ont été réalisés chez des femmes âgées de 20 à 40 ans. Les explants des zones prélevées ont été mis en culture dans le milieu de Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) complétement avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 1 % de gentamicine (10 mg/ml) à 37° C. Les premiers fibroblastes commencent à migrer hors de l'explant après une semaine de culture. A confluence, ils sont trypsinés (trypsine-EDTA) et réensemencés dans les mêmes conditions de culture. Les fibroblastes ont été utilisés entre le 3^e et le 10^e repiquage.

LATTICES DE COLLAGÈNE

La reconstitution des dermes équivalents a été réalisée à partir d'une technique dérivée de celle décrite par Bell (Bell *et al.*, 1976). Elle consiste à mélanger 6 volumes de DMEM 1.76X (gentamicine, NaOH 0.1N et NaHCO₃), 3 volumes de collagène type I de queue de rat (2 mg/ml) et un volume de suspension cellulaire (8·10⁵ cellules/ml). En quelques minutes à 37° C, un gel se constitue. Les changements de milieu de culture ont été effectués tous les 2 jours.

CINÉTIQUE DE RÉTRACTION

Les fibroblastes sains et ceux issus de vergetures ont été cultivés dans un gel de collagène à rétraction libre coulé dans une boîte de Petri de 50 mm de diamètre. Le taux de rétraction a été déterminé par la mesure des diamètres des lattices (règle transparente) durant 7 jours de culture.

MESURE DE LA TENSION ISOMÉTRIQUE

Un prototype spécialement conçu dans notre laboratoire a permis la mesure des forces isométriques développées au sein des lattices (Asserin, 1996). Deux lames

plongent dans une chambre de culture rectangulaire. L'une est fixe, l'autre flexible et équipée de jauges de contrainte montées en pont de Wheatstone. Pour empêcher la rétraction des lattices, 2 morceaux de Velcro® ont été collés sur les lames. Le lattice se développe entre les 2 lames pour aboutir à une forme en « diabolito », forme rectangulaire légèrement rétrécie au centre. La flexion d'une lame entraîne une modification de la valeur d'équilibre du pont et permet après étalonnage de déterminer la force exercée correspondante (mN).

EXPRESSION DES INTÉGRINES $\alpha 2\beta 1$

Les fibroblastes sains et ceux issus de vergetures ont été cultivés dans un gel de collagène dont la rétraction est empêchée par un anneau de nylon déposé au fond d'une boîte de culture de 50 mm de diamètre. Après 5 jours de culture, les fibroblastes ont été isolés du gel de collagène par un traitement à la collagénase de type I (100 U/ml), à 37° C, pendant 30 minutes. Ils ont été ensuite incubés pendant une nuit à 37° C avec des anticorps monoclonaux (AcM) anti-chaîne $\beta 1$ (dilution 1/50, mAb K20, Immunotech) et anti-chaîne $\alpha 2$ (dilution 1/30, mAb Gi9, Immunotech). Deux lavages dans le mélange DMEM + 20 mM EDTA + 5 % SVF ont été effectués avant de révéler ces AcM par des Ac couplés au FITC (fluorothiocyanate, dilution 1/50) pendant une heure à 37° C. Après 3 lavages, les fibroblastes ont été fixés dans PBS + 1 % formaldéhyde + 1 % SVF + 0,2 % azide de sodium, puis stockés à 4° C. Les cellules ont été analysées à l'aide d'un cytofluorimètre FACS-can Becton Dickinson (Centre de cytométrie de flux, INSERM U 80, Hôpital Édouard Herriot, Lyon).

STATISTIQUES

L'analyse statistique a été effectuée par le test de Student, avec un seuil de significativité à $p < 0,05$.

RÉSULTATS

CAPACITÉ DE RÉTRACTION

La rétraction des lattices de collagène commence immédiatement après la formation du gel. Après un jour de culture, aucune différence significative n'est observée entre la rétraction des lattices fabriqués à partir de fibroblastes sains (LFS) et ceux fabriqués à partir de fibroblastes de vergetures jeunes (LFVj) (Fig. 1). À l'inverse, la rétraction des lattices fabriqués à partir de fibroblastes de vergetures anciennes (LFVa) est significativement diminuée par rapport à celle des LFS ($p < 0,05$) durant les 4^{es} jours de culture. À 8 jours de culture, les différences s'atténuent puisque la rétraction atteint 81 % pour les LFS et 79 % pour les LFSVa.

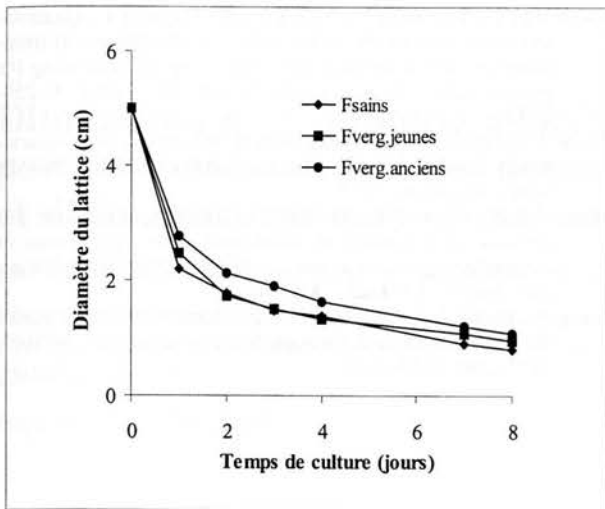


FIG. 1. – Cinétiques de rétraction des fibroblastes sains et de vergetures (n = 10).

QUANTIFICATION DE LA FORCE ISOMÉTRIQUE

La force isométrique développée par les 3 types de lattices augmente rapidement entre 1 h et 8 h pour atteindre respectivement pour les LFS, LFVa et LFVj 90 %, 72 % et 85 % de sa valeur maximale (Fig. 2). En accord avec les observations d'autres auteurs (Eastwood *et al.*, 1994), la force se stabilise après 24 h de culture, atteignant pour les LFVa et LFVj 38mN et pour les LFS 24mN.

EXPRESSION DES INTÉGRINES $\alpha 2\beta 1$

Cette analyse a été réalisée sur des lattices tendus en disque car, lors de précédents travaux (Roche, 1997), nous avons observé une surexpression des intégrines $\alpha 2\beta 1$ dans ce type de lattice par rapport aux lattices rétractés. Le tableau 1 montre une surexpression des sous-unités $\alpha 2$ et $\beta 1$ dans les fibroblastes de vergetures.

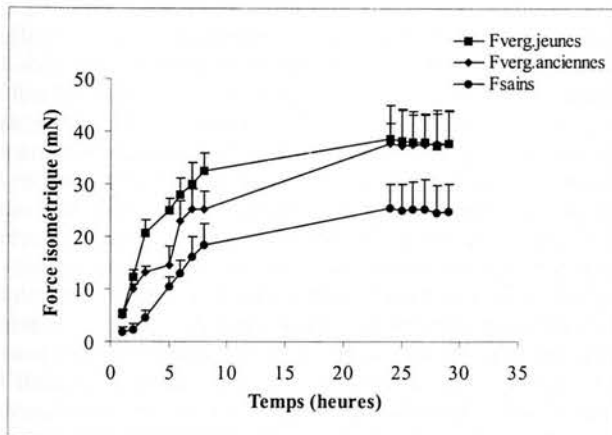


Fig.2. – Force isométrique (mN) développée par les fibroblastes sains et de vergetures (n = 4).

Tableau 1. – Expression des intégrines $\alpha 2\beta 1$ par les fibroblastes sains et de vergetures (n = 3).

Sous-unité	Fsains	Fverg
$\alpha 2$	25,4 ± 1,02	116,2 ± 15,7
$\beta 1$	14,6 ± 1,9	70,8 ± 3,5

DISCUSSION

Ces résultats mettent en évidence un comportement mécanique des fibroblastes *in vitro* différent selon l'origine des cellules et selon la qualité mécanique de la matrice extracellulaire.

Par leurs propriétés mécaniques, les fibroblastes de vergetures apparaissent comme une population différente des fibroblastes sains. Ceci est en conformité avec l'idée d'hétérogénéité fibroblastique (Sappino *et al.*, 1990).

Dans une matrice relaxée, dans le cas des lattices à rétraction libre, l'activité contractile des fibroblastes de vergetures anciennes est significativement inférieure à celle des fibroblastes sains au début de la rétraction du gel. Dans une matrice stressée, dans le cas des lattices tendus, la force de tension des fibroblastes de vergetures caractérisée par la mesure de la force isométrique, est significativement supérieure à celle développée par les fibroblastes sains.

Les mécanismes impliqués dans la contraction des lattices librement rétractés et dans la production de la force isométrique dans les lattices tendus sont différents (Grinell, 1994). La contraction des lattices libres résulte de la réorganisation des fibres de collagène par l'activité migratoire des fibroblastes dont les prolongements cytoplasmiques s'accrochent aux fibres pour les tirer (Nishiyama *et al.*, 1982). La contraction des fibroblastes dans les lattices tendus résulte de l'activité contractile du cytosquelette de filaments d'actine qui se développent en fibres de stress caractéristiques des myofibroblastes (Lucarz-Bietry *et al.*, 1995). L'augmentation de la force isométrique des fibroblastes de vergetures est corrélée avec la surexpression des intégrines $\alpha 2\beta 1$, molécules d'adhésion entre le collagène de type I et le cytosquelette intracellulaire. Ces résultats indiquent que les fibroblastes de vergetures auraient une activité migratoire réduite et une activité contractile augmentée. Ils réagiraient différemment des fibroblastes sains aux variations de tension de la peau.

BIBLIOGRAPHIE

- Adam J.-E., Craig C., Striae and their relation to topical steroid therapy. *Canad. Med. Ass. J.*, 1965, 9, 289-291.
- Asserin J., Étude par test d'extension des propriétés mécaniques de la peau humaine *in vivo* et d'un derme équivalent *in vitro*. Th : Sci Vie Santé, Besançon, 1996.
- Bell E., Ivarsson B., Merrill C., Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of

- different proliferative potential *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. ScUSA*, 1976, 76, 1274-1278.
- Cohen-Letessier A., Cutaneous striae : a disorder of fibroblasts? Aetiologic theories. *Nouv Dermatol*, 1998, 17, 431-435.
- Eastwood M., Mc Growther D.-A., Brown R.-A., A culture force monitor for measurement of contraction forces generated in human dermal fibroblast culture : Evidence for cell-matrix mechanical signalling. *Biochem. Biophys. Acta*, 1994, 1201, 186-192.
- Grinnell F., Fibroblasts, myofibroblasts and wound contraction. *J. Cell. Biol.*, 1994, 124, 401-404.
- Lucarz-Bietry A., Chapuis J.-F., Agache P., Humbert P., A histological and ultrastructural comparative study of retracted and tense collagen lattice. *Eur. J. Dermatol.*, 1995, 5, 524-530.
- Moretti G., Rebora A., Guarrera M., Striae distensae : how and why they are found. *Moretti G, Rebora A, eds. Striae Distensae*, Milan, Brocades, 1976, 9.
- Nishiyama T., Tominaga N., Nakajima K., Hayashi T., Quantitative evaluation of the factors affecting the process of fibroblasts-mediated collagen gel contraction by separating the process into 3 phases. *Collagen. Rel. Res.*, 1982, 8, 259-273.
- Roche I, Relation entre le comportement mécanique et la structuration des lattices de collagène autotendus. Th : Sci Vie Santé, Besançon, 1997.
- Sappino A.-P., Schürch W., Gabbiani G., Biology of disease : differentiation repertoire of fibroblastic cells : expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab. Invest.*, 1990, 63, 144-161.
- Wang N., Butler J.-P., Ingber D.-E., Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 1993, 260, 1124-1127.