

# Etude des sous-populations de fibroblastes : une approche « développementaliste » de la physiologie et du vieillissement de la peau

Daniel Asselineau, Hervé Pigeon et Solène Mine

Sciences du Vivant, L'Oréal Recherche, 90 rue du Général Roguet, 92 583 Clichy Cedex, France

Auteur correspondant : Daniel Asselineau, [dasselineau@rd.loreal.com](mailto:dasselineau@rd.loreal.com)

Reçu le 29 Novembre 2007

**Résumé** – La peau est un organe à part entière dont le rôle dépasse largement celui de barrière entre l'intérieur et l'extérieur de l'organisme. La peau comme l'ensemble du corps humain est sujette au vieillissement. Ce dernier affecte principalement la peau dans sa profondeur au niveau du compartiment dermique qui constitue sa partie matricielle. Le derme est en effet un tissu riche en matrice extracellulaire et pauvre en cellules. Il est généralement admis que ce sont des modifications de cette matrice qui contribuent le plus au vieillissement de la peau, en affectant ses propriétés biomécaniques. Traditionnellement on aborde l'étude du vieillissement de la peau en s'intéressant aux modifications des macromolécules de la matrice extracellulaire comme par exemple le collagène. Le derme est en réalité un tissu complexe matriciel et cellulaire comprenant une partie superficielle proche de l'épiderme et une partie profonde beaucoup plus épaisse qui se distinguent en histologie. Dans notre laboratoire nous avons entrepris depuis plusieurs années déjà de nous intéresser aux fibroblastes qui sont les cellules responsables de la formation et du maintien de la structure dermique et nous avons entrepris d'isoler, de cultiver et d'étudier les fibroblastes du derme superficiel dit papillaire et du derme profond dit réticulaire. Nous avons pu montrer que les deux types de fibroblastes en culture sur plastique ont un aspect et des propriétés biologiques très différentes. De plus nous avons pu confirmer et préciser ces différences dans le contexte de la peau reconstruite. La reconstitution d'une architecture tridimensionnelle est beaucoup plus proche de la peau *in vivo* tout particulièrement après greffe sur la souris nude.

Nous posons également la question de l'apparition et du devenir de ces populations dans la peau lors de la maturation finale de la peau, c'est-à-dire, à la fin du développement et lors du vieillissement de la peau. En effet ces études pourraient se révéler très utiles pour une meilleure compréhension de la physiologie et du vieillissement de la peau et pourraient être potentiellement source d'innovation à travers de nouvelles stratégies anti-vieillessement.

**Abstract** – Fibroblast subpopulations: a developmental approach of skin physiology and ageing.

Skin is an organ whose function is far beyond a physical barrier between the inside and the outside of the body. Skin as the whole organism is subjected to ageing which concerns skin mostly in its dermal and deepest component which is also its matricial component. The dermis is a tissue rich in matricial elements and poor in cellular content and it is generally admitted that modifications occurring in the matrix are those which mostly contribute to skin ageing, by altering its biomechanical properties. Therefore it is common to address questions related to skin ageing by considering alterations in matrix molecules like collagen. Actually the dermis is a complex tissue both matricial and cellular and is divided between a superficial dermis close to epidermis and a deep dermis much thicker and histologically different. Several years ago we have undertaken investigations related to fibroblasts which are the cells responsible

for the formation and maintenance of the dermis, aiming at isolation, culture and characterization of the fibroblasts from the superficial dermis also called papillary dermis and fibroblasts from the deep dermis also called reticular dermis. We were able to show that these fibroblasts in classical culture on plastic exhibit very different morphologies associated with different secretion properties and we have confirmed and expanded such observations revealing different phenotypes by incorporating these cells in reconstructed skin which allows the reproduction of a three-dimensional architecture recalling skin *in vivo* especially after grafting onto the nude mouse. We also raise the question of how these two dermal regions appear during the formation of the dermis and the question of their fate during ageing. Progress in solving these questions would certainly appear to be very useful for a better understanding of skin physiology and ageing and would hopefully provide new strategies in anti-ageing research.

## Introduction : morphologie de la peau (histologie), importance et complexité du derme. Isolement des fibroblastes.

La peau est faite des deux tissus que sont le derme et l'épiderme en contact étroit par l'intermédiaire de la membrane basale. L'épiderme est un épithélium pluristratifié kératinisé composé principalement de kératinocytes qui se différencient de façon séquentielle de l'intérieur vers l'extérieur pour former les couches cornées anuclées et très compactes qui assurent la fonction barrière avec l'extérieur. Le derme riche en matrice extracellulaire résulte de la production de macromolécules variées (collagène, élastine, protéoglycans, glycoprotéines) produites par les principales cellules résidentes du derme que sont les fibroblastes.

Le derme est bien connu pour son rôle mécanique et ses principaux composants macromoléculaires sont assez bien décrits surtout sur le plan biochimique. Cependant de nombreuses questions se posent encore concernant la biologie du derme. Cette situation est due en partie au fait qu'au cours des récentes décennies la biologie du kératinocyte et la connaissance de l'épiderme a largement dominé sur celle du fibroblaste et du derme. Ceci est probablement dû au succès des cultures de kératinocytes basées sur l'emploi de cellules nourricières 3T3 telles que décrites par Rheinwald et Green (1975), alors que paradoxalement le fibroblaste était pourtant déjà cultivé dans de nombreux laboratoires depuis longtemps (Hayflick & Moorhead, 1961). Encore actuellement cet historique pèse sur l'état de nos connaissances scientifiques dans le domaine. Le rôle et l'importance du derme dans la physiologie de la peau sont certainement sous-estimés y compris dans son interaction avec l'épiderme. Par exemple si l'on examine avec attention l'histologie de la peau (Fig. 1) on peut constater que le derme superficiel est très différent du derme profond.

Plusieurs laboratoires ont isolé les fibroblastes du derme superficiel et du derme profond et montré que ceux-ci se comportaient de façon très différente en culture, en particulier les fibroblastes du derme su-

perficel dit « papillaire » se divisent beaucoup plus vite que ceux du derme profond dit « réticulaire » (Harper & Grove, 1979). Néanmoins cette notion est encore assez peu répandue dans les publications et dans le monde de la dermatologie même s'il est communément admis qu'il existe une grande variabilité de fibroblastes en fonction de leur origine anatomique (peau, poumon), mais aussi suivant qu'ils proviennent d'embryons ou d'organismes adultes, en fonction des passages en culture etc. . . .

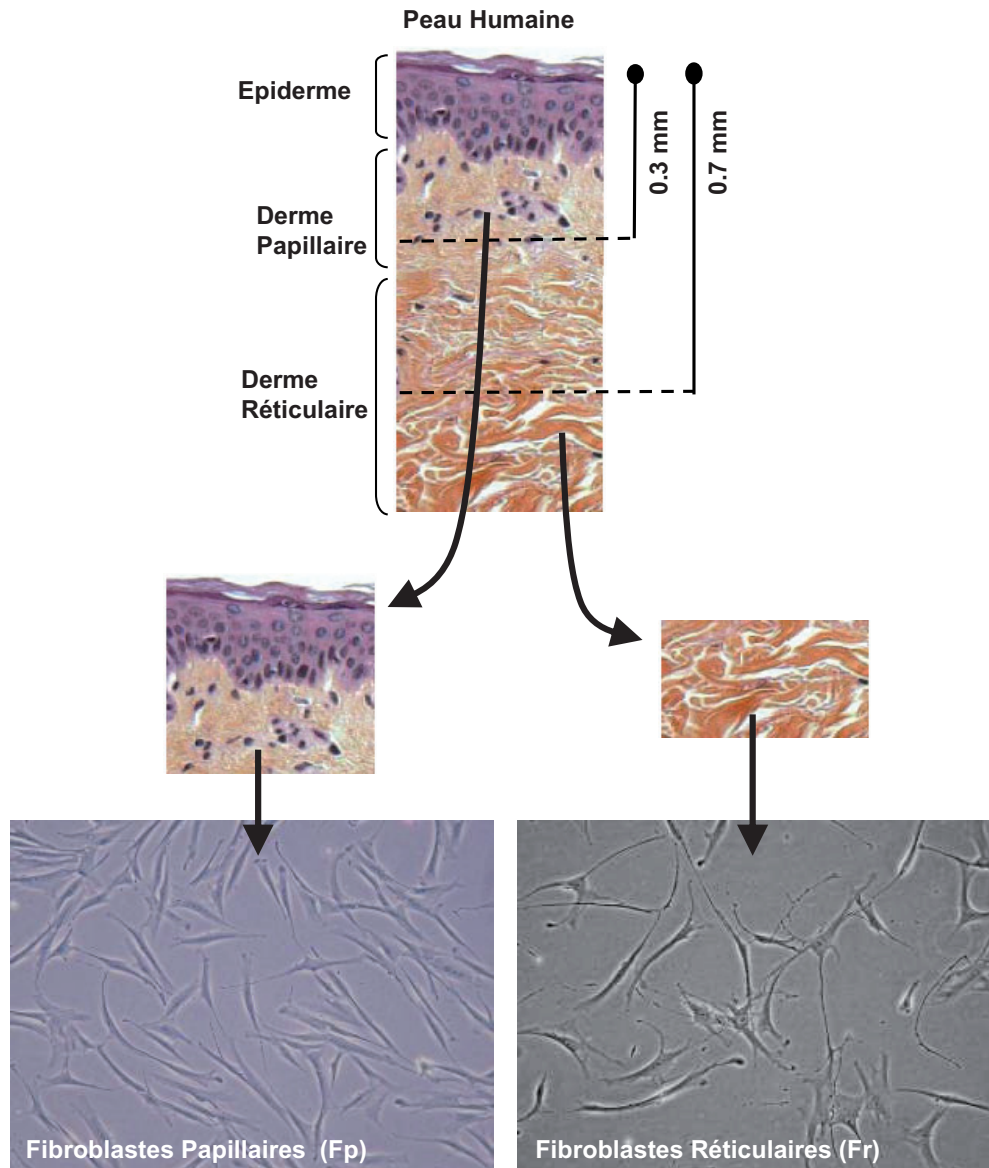
Dans notre laboratoire nous nous sommes intéressés à cette question depuis longtemps du fait de notre intérêt pour le vieillissement de la peau qui affecte surtout le derme et du fait de notre longue expérience dans la reconstruction de la peau qui nous permet d'aborder cette question de façon originale.

La figure 1 montre l'aspect histologique de la peau. Il est possible d'isoler (voir Fig. 1), cultiver et amplifier les fibroblastes du derme superficiel et les fibroblastes du derme profond. Des peaux reconstruites *in vitro* comportant l'un ou l'autre de ces deux types de fibroblastes peuvent être réalisées. Le système peut être encore amélioré en utilisant les deux sous-populations de fibroblastes dans des peaux reconstruites à étages comportant deux compartiments dermiques. Ces modèles *in vitro* peuvent également être utilisés dans un contexte *in vivo* après greffe sur souris nude.

## Fibroblastes papillaires et réticulaires en culture sur plastique : morphologie, courbes de croissance et marqueurs.

Quand on cultive les fibroblastes sur plastique (Fig. 1) on constate effectivement que la densité des fibroblastes papillaires est plus importante que celle des fibroblastes réticulaires pour un même temps de culture à condition de les avoir isolés à partir d'un prélèvement de peau d'une personne jeune.

Grâce à ces cultures il est possible de réaliser des études comparatives entre des souches de fibroblastes provenant du même donneur et de mettre en évidence des différences en particulier en réalisant des dosages



**Fig. 1.** Histologie de la peau humaine normale adulte. Isolement et culture des fibroblastes du derme superficiel (< 0,3  $\mu\text{m}$ ) et du derme profond (> 0,7  $\mu\text{m}$ ) appelés respectivement fibroblastes papillaires (Fp) et fibroblastes réticulaires (Fr).

protéiques dans le milieu de culture et de comparer les résultats pour un couple donné de fibroblastes.

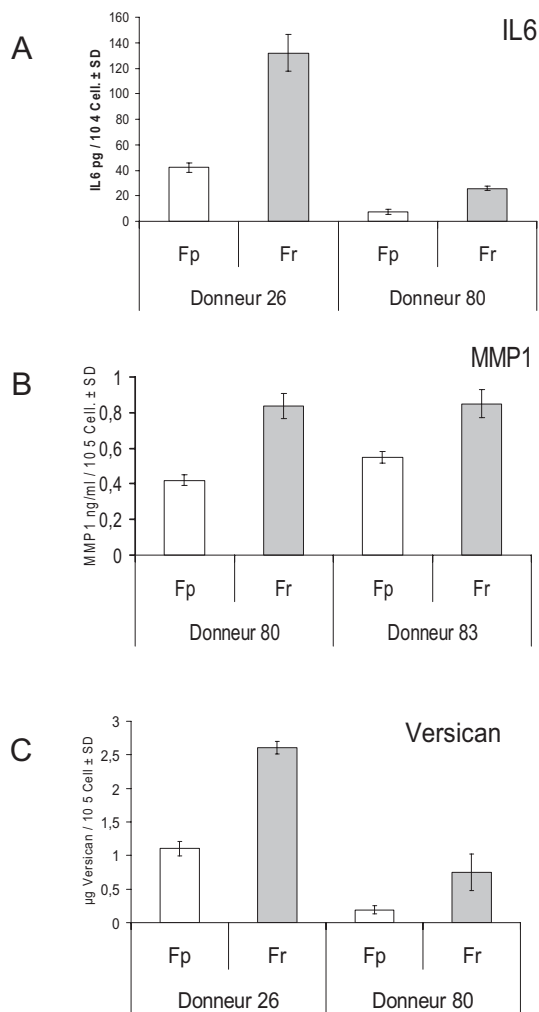
La figure 2 montre des dosages de l'interleukine 6 (IL-6) et de la collagénase 1 (MMP-1) réalisés par Elisa à partir du milieu de culture, ainsi que le dosage d'un protéoglycan (versican) par Dot Blot.

Ces résultats (confortés par d'autres résultats comparables non montrés ici) suggèrent que les fibroblastes réticulaires ont tendance à produire plus de facteurs diffusibles et de composants de la matrice extracellulaire que les fibroblastes papillaires.

### Fibroblastes papillaires et réticulaires cultivés sur plastique : influence des milieux conditionnés.

Ces cultures permettent aussi de réaliser des expériences croisées consistant à ajouter le milieu de cultures des uns aux autres et vice versa pour étudier les interactions entre les deux types cellulaires.

De telles expériences (voir Fig. 3) ont permis de mettre en évidence des effets antagonistes d'un type de fibroblaste sur l'autre. Ainsi les fibroblastes papillaires ont tendance à stimuler indirectement la croissance



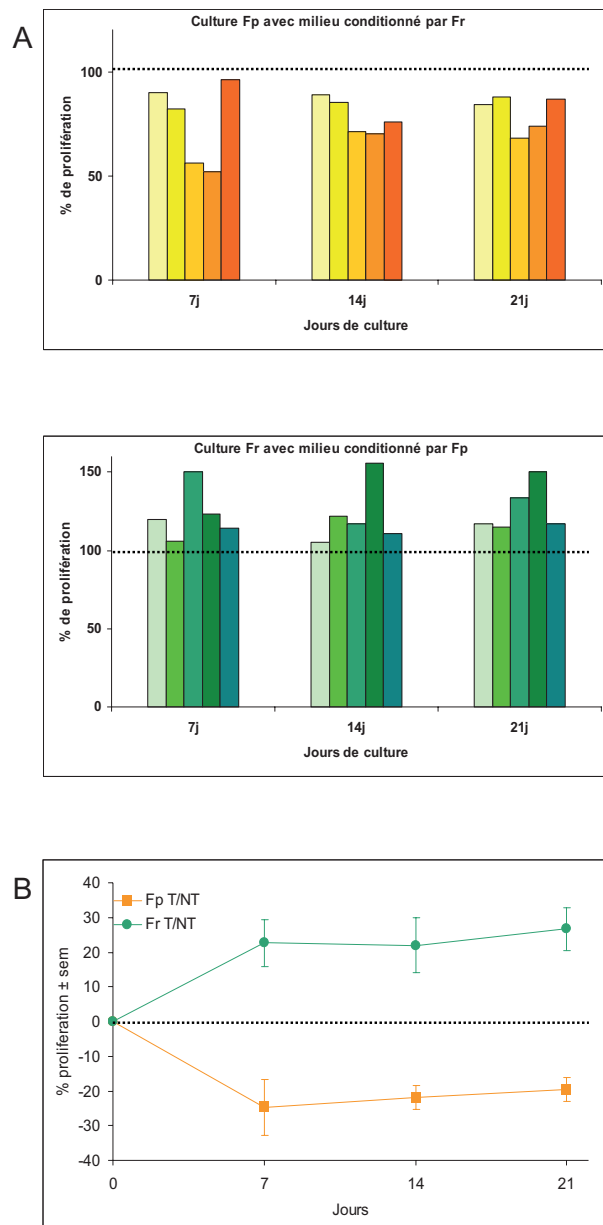
**Fig. 2.** Dosages par Elisa de l'interleukine 6 (IL-6), de la collagénase I (MMP-1) (respectivement A,B) et par Dot Blot du Versican (C) dans les milieux de culture de fibroblastes papillaires (Fp) et réticulaires (Fr) provenant de deux donneurs différents. Noter que les fibroblastes réticulaires sécrètent davantage ces molécules que les fibroblastes papillaires correspondants.

des fibroblastes réticulaires tandis que les fibroblastes réticulaires ont tendance à inhiber indirectement la croissance des fibroblastes papillaires.

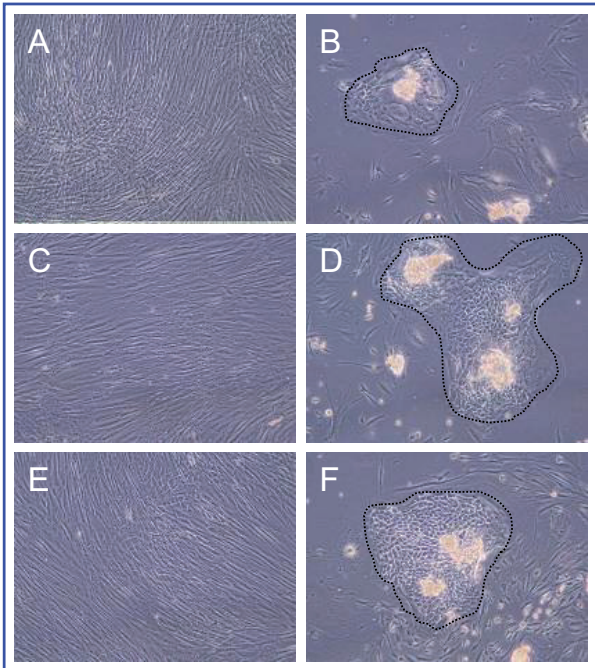
### Fibroblastes papillaires et réticulaires co-cultivés avec les kératinocytes épidermiques.

De même nous avons entrepris d'étudier l'influence de l'un ou l'autre de ces types de fibroblastes sur la croissance des kératinocytes.

Pour ce faire (Fig. 4) du milieu de culture pré-conditionné par l'un ou l'autre des deux types de



**Fig. 3.** Effet des milieux conditionnés par les fibroblastes papillaires (Fp) ou réticulaires (Fr) provenant de 5 donneurs différents sur leur prolifération respective. Les fibroblastes papillaires sont cultivés avec du milieu frais additionné en proportion égale de milieu conditionné par les fibroblastes réticulaires, les fibroblastes réticulaires avec du milieu frais additionné en proportion égale de milieu conditionné par les fibroblastes papillaires. Noter que la présence de milieu conditionné influe sur la prolifération des fibroblastes : prolifération diminuée pour les fibroblastes papillaires et augmentation pour les fibroblastes réticulaires (A). La réduction de la prolifération des fibroblastes papillaires est de l'ordre de 20% tandis que l'augmentation de la prolifération observée avec les fibroblastes réticulaires est du même ordre de grandeur (B). T : traités, NT : non traités.



**Fig. 4.** Influence des milieux conditionnés par les fibroblastes papillaires et réticulaires sur les kératinocytes cultivés en monocouche. Le milieu conditionné par les fibroblastes papillaires (A) influe peu sur la prolifération des kératinocytes et la taille des colonies (B) tandis que le milieu conditionné par les fibroblastes réticulaires (C) ou le milieu conditionné provenant d'une culture de fibroblastes papillaires et réticulaires (E) améliore notablement la prolifération des kératinocytes et la taille des colonies (D,F). Les fibroblastes visibles sur l'image proviennent de fibroblastes contaminants amenés avec les kératinocytes.

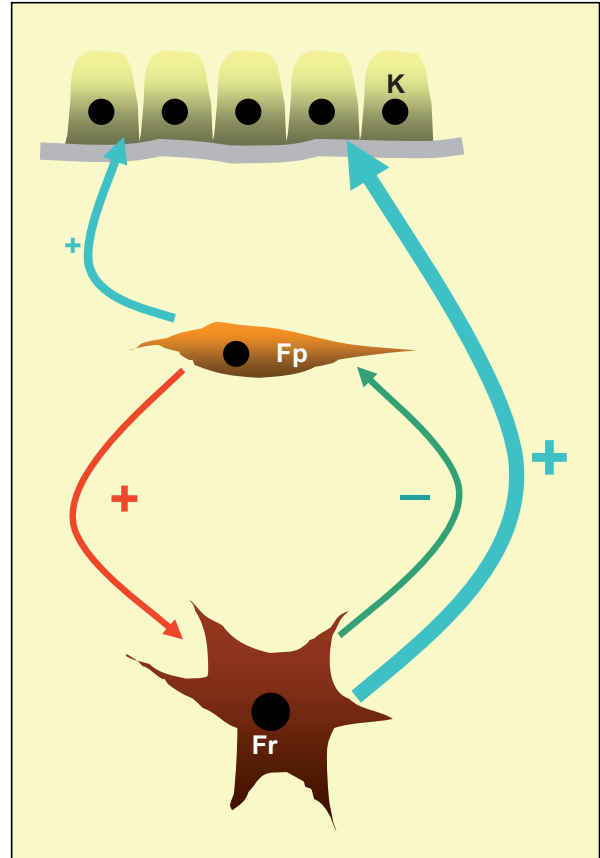
fibroblastes a été ajouté au milieu de culture des kératinocytes.

Les résultats montrent clairement que les colonies de kératinocytes formées en présence de milieu conditionné par les fibroblastes réticulaires sont plus développées que celles formées en présence de milieu conditionné par les fibroblastes papillaires.

Il est intéressant de rapprocher ces observations du phénomène de cicatrisation. En effet, *in vivo*, une blessure a de grandes chances d'emporter avec elle à la fois l'épiderme et le derme superficiel. Il est donc tentant d'imaginer que la nature a prévu que ce soit les fibroblastes du derme le plus profond qui soient les plus actifs pour favoriser la prolifération des kératinocytes de l'épiderme et par la suite la fermeture de la blessure.

### Schéma de synthèse.

L'ensemble de ces résultats est résumé dans un schéma (voir Fig. 5) qui permet de proposer une interprétation

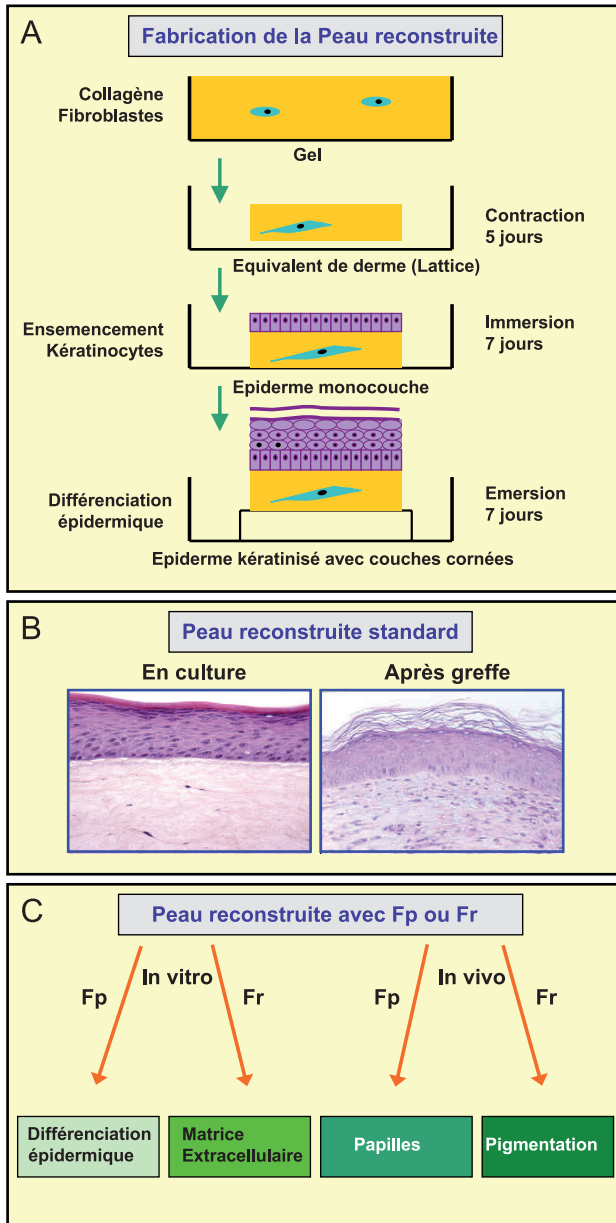


**Fig. 5.** Schéma hypothétique des interactions entre les trois types cellulaires, kératinocytes (K), fibroblastes papillaires (Fp) et fibroblastes réticulaires (Fr) : influence respective des fibroblastes entre eux (Fp versus Fr) sur leur prolifération, influence des fibroblastes Fp ou Fr sur la prolifération des kératinocytes.

plus fine que précédemment (Maas-Szabowski *et al.*, 2000) des interactions dermo-épidermiques. En effet notre approche prend en compte les interactions cellulaires complexes qui se produisent entre les deux sous-populations de fibroblastes du derme et les kératinocytes de l'épiderme.

### Reconstruction de la peau et réalisation de peaux reconstruites contenant des fibroblastes papillaires ou réticulaires : étude *in vitro* et greffe sur la souris nude.

En complément de ces études il était intéressant de se rapprocher davantage de la réalité en reproduisant *in vitro* la structure tridimensionnelle de la peau par une approche dite « organotypique » consistant à reconstruire la peau à partir de cellules en culture. Le



**Fig. 6.** Représentation schématique de la reconstruction de la peau *in vitro* (A). Résultat histologique de la peau reconstruite obtenue *in vitro* et *in vivo* après greffe sur la souris nude (B) et représentation schématique des résultats obtenus (C).

modèle de peau reconstruite que nous utilisons est un modèle complet qui comporte à la fois un épiderme pluristratifié et différencié formé par les kératinocytes et un derme vivant contenant des fibroblastes (Asselineau *et al.*, 1985, 1987)

L'utilisation d'un tel modèle nous a permis de confirmer et d'étudier plus en détail les différences observées entre les deux types cellulaires. En parti-

culier nous avons pu constater que les fibroblastes papillaires ont tendance à favoriser la différenciation épidermique tandis que les fibroblastes réticulaires favorisent les synthèses matricielles. Il est possible de greffer ces peaux reconstruites sur souris nude (Demarchez *et al.*, 1992). Un résultat important que nous avons pu mettre en évidence *in vivo* est que les fibroblastes papillaires favorisent la formation de papilles (Asselineau *et al.*, en préparation). Par ailleurs il semblerait que les fibroblastes réticulaires favorisent la pigmentation des greffons.

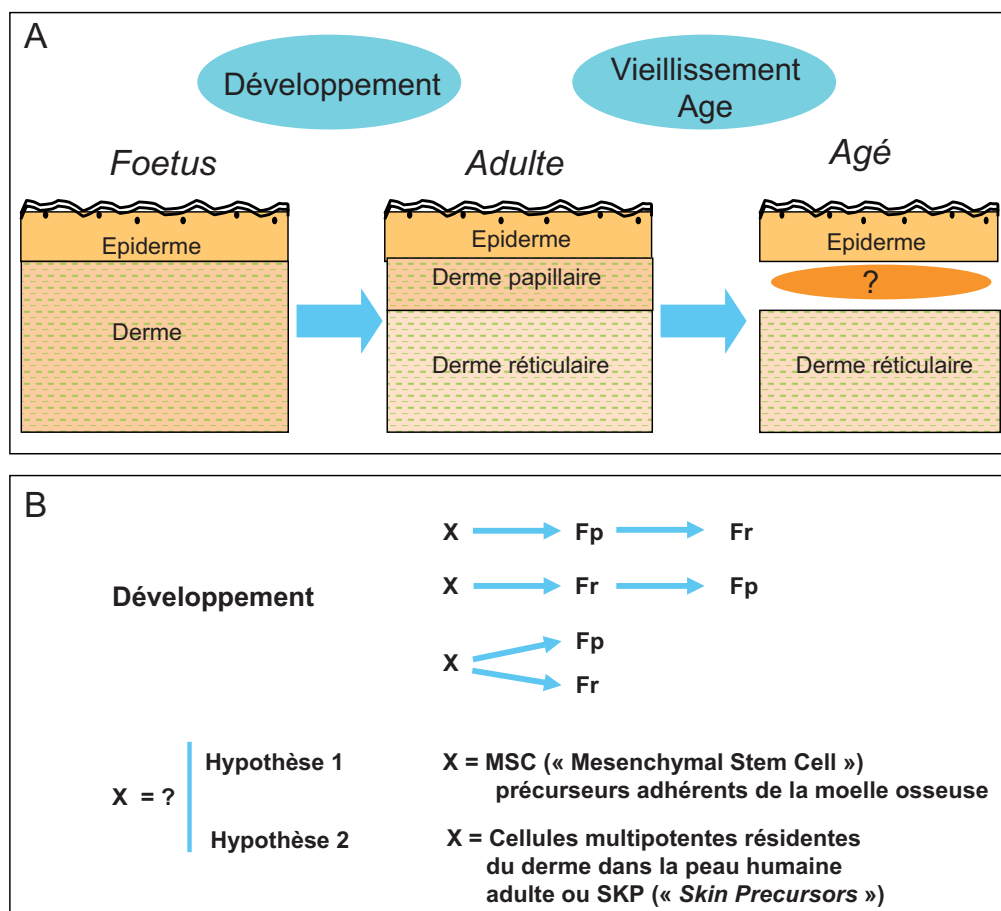
Ces résultats schématisés dans la Figure 6 suggèrent que les fibroblastes papillaires et réticulaires ont des fonctions différentes et complémentaires et exercent des rôles spécifiques dans la peau.

## Développement et vieillissement : faits et perspectives.

La réalisation d'une collection de couples de fibroblastes papillaires et réticulaires isolés à partir de donneurs d'âge variés nous a permis de nous poser la question du devenir respectif de ces populations de fibroblastes au cours du vieillissement de la peau.

Nous avons pu constater que les courbes de croissance des fibroblastes papillaires et réticulaires tendent à se confondre dès lors que les couples proviennent de donneurs âgés. D'autres analyses fonctionnelles ont révélées que des modifications des propriétés biologiques des fibroblastes dermiques avec l'âge concernent principalement les fibroblastes papillaires. De plus, nous n'avons pas observé de formation de papilles dans les peaux reconstruites greffées réalisées avec des fibroblastes papillaires issus de donneurs âgés contrairement à celles réalisées avec des fibroblastes papillaires issus de donneurs jeunes. Ce résultat est très important car il est connu que la disparition des papilles est une des caractéristiques du vieillissement de la peau *in vivo*. Ces résultats et observations suggèrent que des changements cellulaires importants pourraient affecter préférentiellement le derme papillaire (Mine *et al.*, en préparation).

Nous nous posons aussi la question de l'origine de ces cellules et de la formation d'un derme complexe au cours du développement. Pour approcher cette question des expériences comparatives de génomique fonctionnelles sont actuellement envisagées pour comparer ces différentes populations de fibroblastes entre elles et avec des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) (Caplan, 1994) ou des précurseurs multipotentiels résidant dans le derme (SKPs) (Fernandes *et al.*, 2004; Toma *et al.*, 2005; Criger *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007). L'étude de leur degré de proximité avec les cellules souches pourraient nous renseigner sur leur filiation.



**Fig. 7.** Représentation schématique de la formation de la peau avec un derme comprenant les deux compartiments papillaires et réticulaires et représentation hypothétique du vieillissement correspondant (A). Hypothèses concernant la nature et l'origine des précurseurs des fibroblastes papillaires et réticulaires de la peau humaine adulte (B).

Il peut aussi se révéler intéressant en complément de réaliser des peaux reconstruites avec les MSCs (ou les SKPs) et de les greffer sur la souris nude. Des expériences préliminaires allant dans ce sens ont déjà été réalisées par d'autres (Huh *et al.*, 2007) mais les résultats obtenus uniquement *in vitro* ne concernent que la partie épidermique.

Nous avons résumé ces hypothèses de façon schématique dans la Figure 7.

## Conclusions.

L'ensemble de ces travaux et notamment la réalisation de modèles de peau tridimensionnels plus proche de la peau *in vivo* visent à une meilleure compréhension du derme dans sa complexité. Ces études devraient permettre à terme de contribuer à apporter une vision globale cellulaire et tissulaire plus précise de la physiologie, du développement et du vieillissement de la peau.

Nous espérons également que ces recherches nous amèneront à formuler de nouveaux concepts qui nous permettront de proposer de nouvelles stratégies pour identifier de nouvelles molécules anti-vieillessement.

## Références

- Asselineau D., Bernard B.A., & Darmon M., Three-dimensional culture of human keratinocytes on a dermal equivalent : A model system to study epidermal morphogenesis and differentiation *in vitro*. *In Models in Dermatology*, Eds Lowe, N. J. and Maibach, H. I.1987, 1-7.
- Asselineau D., Bernhard B., Bailly C., & Darmon M., Epidermal morphogenesis and induction of the 67 kD keratin polypeptide by culture of human keratinocytes at the liquid-air interface. *Experimental Cell Research*, 1985, 159, 536-539.
- Caplan A.I., The mesengenic process. *Clinics in Plastic Surgery*, 1994, 21, 429-435.

- Chen F.G., Zhang W.J., Bi D., Liu W., Wei X., Chen F.F., Zhu L., Cui L., & Cao Y., Clonal analysis of nestin vimentin+ multipotent fibroblasts isolated from human dermis. *J Cell Sci*, 2007, 120, 2875-2883.
- Crigler L., Kazhanie A., Yoon T.J., Zakhari J., Anders J., Taylor B., & Virador V.M., Isolation of a mesenchymal cell population from murine dermis that contains progenitors of multiple cell lineages. *FASEB Journal*, 2007, 21, 2050-2063.
- Demarchez M., Hartmann D.J., Regnier M., & Asselineau D., The role of fibroblasts in dermal vascularization and remodeling of reconstructed human skin after transplantation onto the nude mouse. *Transplantation*, 1992, 54, 317-326.
- Fernandes K.J.L., McKenzie I.A., Mill P., Smith K.M., Akhavan M., Barnabe-Heider F., Biernaskie J., Junek A., Kobayashi N.R., Toma J.G., Kaplan D.R., Labosky P.A., Rafuse V., Hui C.C., & Miller F.D., A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nature Cell Biology*, 2004, 6, 1082-1093.
- Harper R.A. & Grove G., Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis : Differences in growth potential in vitro. *Science*, 1979, 204, 526-527.
- Hayflick L. & Moorhead P.S., The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 1961, 25, 585-621.
- Huh C.H., Kim S.Y., Cho H.J., Kim D.S., Lee W.H., Kwon S.B., Na J.I., & Park K.C., Effects of mesenchymal stem cells in the reconstruction of skin equivalents. *Journal of Dermatological Science*, 2007, 46, 217-220.
- Maas-Szabowski N., Stark H.J., & Fusenig N.E., Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, 2000, 114, 1075-1084.
- Rheinwald J.G. & Green H., Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes : the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 1975, 6, 331-334.
- Toma J.G., McKenzie I.A., Bagli D., & Miller F.D., Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*, 2005, 23, 727-737.