

## 3

## RECONSTRUCTION D'UNE PEAU HUMAINE VIVANTE IN VITRO : INFLUENCE DES INTERACTIONS DERMATO-ÉPIDERMiques SUR LA CROISSANCE DES FIBROBLASTES ET DES KÉRATINOCYTES.

Coulomb B., Lebreton C., Dubertret L. INSERM U312, Laboratoire de Dermatologie, Hôpital Henri Mondor 94010 Créteil.

Cette peau humaine vivante est reconstruite en deux étapes: la première permet, en associant des fibroblastes et du collagène, de reconstruire un équivalent de derme, la seconde permet de recouvrir ce "derme équivalent" d'un épiderme, et donc d'obtenir in vitro une peau composée, tout comme in vivo, de ses deux principaux tissus.

Le derme équivalent est réalisé en ensemençant  $1,2 \times 10^6$  fibroblastes (cultivés jusque là en monocouche) à l'intérieur d'une matrice de collagène de type I (2 mg/ml, extrait par l'acide acétique 1/1000 à partir de tendons de queues de rats), en présence de milieu de culture. Ce gel de 30 ml de départ va progressivement être contracté par les fibroblastes qui réorganisent les fibres de collagène. Le derme équivalent est en fait un système de culture en trois dimensions, et c'est déjà par là même un modèle original de tissu conjonctif. En effet, cultivés dans cet environnement, les fibroblastes expriment une différenciation proche de celle existant in vivo. En particulier, il retrouve une régulation de leurs divisions alors que les corps cellulaires restent bien séparés les uns des autres tout au long de la culture.

L'association de fibroblastes et de collagène, qui sont deux éléments importants pour la croissance et la différenciation épidermique, font du derme équivalent un excellent substrat pour l'épidermisation. Et en effet, en se servant comme source de kératinocytes, soit de biopsies de peau complète de 1mm de diamètre, soit de biosies d'épiderme de 2mm, nous pouvons obtenir un épiderme de culture dont la différenciation est très proche de celle existant in vivo. De plus, la croissance épidermique peut alors être évaluée de façon quantitative, par la mesure de la surface, du contenu en ADN, et de l'incorporation de thymidine de ces épidermes.

L'épidermisation de différents substrats dermiques, avant ou après organisation par les fibroblastes, comportant des fibroblastes vivants ou tués par un choc osmotique, nous a permis de démontrer que le rôle des fibroblastes n'est pas seulement de synthétiser et de dégrader la matrice extracellulaire, mais aussi de favoriser la croissance épidermique d'une part en organisant la matrice de collagène, d'autre part en sécrétant des facteurs diffusibles capables de stimuler la croissance des kératinocytes.

Mais les messages ne circulent pas seulement du derme vers l'épiderme. En effet, les kératinocytes aussi peuvent augmenter la vitesse de prolifération des fibroblastes du derme.

Le caractère modulable de cette peau humaine vivante reconstruite in vitro en fait non seulement un modèle des interactions dermo-épidermiques, mais aussi un outil pour des études de communications cellulaires in vitro, mais au niveau tissulaire.

## 4

## ACTIVATION DES RECEPTEURS DES FACTEURS DE CROISSANCE (EGF, IGF-I, IGF-II) DANS DES CULTURES CELLULAIRES : RELATION AVEC L'INDUCTION DES PROTO-ONCOGENES C-MYC ET C-FOS

Hauquel de Mouzon S.1, Kahn C.R.2,

<sup>1</sup>Centre de Recherche sur la Nutrition, 9, rue Jules Hetzel 92190 Meudon, France.

<sup>2</sup>Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

Les effets de plusieurs facteurs de croissance sur la phosphorylation des tyrosine-kinases, l'induction d'oncogènes cellulaires et la synthèse d'ADN ont été comparés dans des cellules intactes de la lignée Madin-Darby-Canine-Kidney (MDCK). Ces cellules sont quasiment dépourvues de récepteurs de l'insuline, ce qui permet l'évaluation des effets des facteurs de croissance en absence d'interactions secondaires avec les récepteurs de l'insuline. Des effets biologiques précoces tels que l'autophosphorylation des récepteurs et l'induction des proto-oncogènes c-myc et c-fos sont stimulés dans les minutes suivant la liaison de l'hormone à son récepteur alors que des effets plus tardifs tels que la synthèse d'ADN requièrent plusieurs heures. EGF augmente l'incorporation de phosphate dans les protéines pp 175 et pp 120 (correspondant au récepteur et à son peptide endogène) et stimule les taux d'ARNm de c-myc et c-fos de façon maximale (6 à 20 fois) après 15 min pour c-fos et 30 à 60 min pour c-myc. La synthèse d'ADN est doublée en 4 h. IGF-I stimule l'incorporation de phosphate dans une protéine de 97 kDa correspondant à la sous-unité B du récepteur. Cette activation est associée à une expression accrue de c-myc et c-fos (2 à 4 fois) mais la synthèse d'ADN est peu modifiée. IGF-II se lie à son propre récepteur et à celui d'IGF-I mais n'induit pas d'effet significatif sur ces différents paramètres.

Ces résultats montrent que dans les cellules MDCK, IGF-I et EGF possèdent des capacités similaires à autophosphoryler leurs récepteurs mais EGF stimule plus fortement les effets biologiques. Bien qu'une activation submaximale des récepteurs soit suffisante pour stimuler certains effets biologiques, d'autres facteurs semblent nécessaires pour obtenir une réponse complète dans des cellules intactes.