

Tables des matières

Prolégomènes	p.15
Introduction	p.17
Partie I	
La réparation dans le règne animal	p.19
I- De la réparation dans le règne animal	p.21
A- De la régénération	p.23
1- Des mécanismes de la régénération	p.23
a- L'hémostase	
b- La « cicatrisation » : coiffe épidermique, inflammation	
c- L'histolyse et la constitution du blastème	
d- La morphogenèse	
2- De la constance rencontrée : un système immunitaire permissif	p.29
3- D'un nouveau mécanisme décodé : l'apoptose	p.34
B- De la cicatrisation	p.43
1- Des mécanismes de la cicatrisation	p.43
a. L'hémostase	
b. L'inflammation	
c. La phase cicatricielle ou fibrotique	
d. La phase de résolution ou immunosuppressive	
2- D'un système immunitaire essentiel	p.54
3- Du rôle de l'apoptose dans les phases de cicatrisation	p.59
Partie II	
Introduction bibliographique	p.63
I- Le système tégumentaire des mammifères	p.65
A. La peau chez les mammifères	p.65
1. L'épiderme	
2. La lame basale	
3. Le derme	
4. L'hypoderme	
5. Les annexes cutanées	
a. Le follicule pileux	
b. Les glandes sébacées	
c. Les glandes sudoripares	
d. Les ongles	
6. Les singularités de la peau murine	
B. La cicatrice cutanée chez les mammifères	p.76
II- Des brûlures et de leur cicatrisation	p.81

A. Définition, évaluation et signes de gravités des brûlures	p.82
1. La profondeur	
2. L'étendue	
3. Le siège	
B. La cicatrisation des brûlures : l'exemple de la cicatrisation hypertrophique	p.84
1. Définition, description macroscopique et histologique des cicatrices hypertrophiques	
2. Etiologie et physiopathologie de la cicatrisation hypertrophique	
3. Les traitements de la cicatrisation hypertrophique	
a. La prévention de l'hypertrophie cicatricielle	
b. Les traitements « curatifs » de l'hypertrophie cicatricielle	
III- Les cellules souches/stromales mésenchymateuses : un traitement pour la cicatrisation ?	p.97
A- Les cellules souches/stromales mésenchymateuses, définitions et propriétés biologiques	p.99
B- Les propriétés <i>immunomodulatrices</i> des CSM	p.101
C- L'activité sécrétoire des CSM	p.103
D- Le choix des ASC (CSM dérivées du tissu adipeux) pour la prise en charge de la cicatrisation	p.105
IV- Le plasma froid atmosphérique : nouveau dispositif dans la lutte contre les cicatrisations anormales ?	p.109
A- Les sources de plasma en laboratoire et en clinique	p.111
1- Le plasma DBD (Dielectric Barrier Discharge)	
2- Le plasma Jet	
B- Les deux effets des plasmas froids atmosphériques pertinents à la médecine de la réparation	p.113
1- Le pouvoir stérilisant du plasma	
2- Effets des plasmas froids sur les cellules mammifères : apoptose et autres événements	
Partie III	
Etudes expérimentales	p.119
I- Objectif	p.121
II- Le modèle de blessure : la brûlure du second degré profond dans un modèle murin	p.123
A. La souris <i>Nude</i> comme modèle animal	p.123
B. La brûlure par ébouillantement	p.125
C. Critiques du modèle <i>Nude</i>	p.128
1. Un système immunologique presque au complet	
2. Comparaison de souris <i>Nude</i> et des souris <i>C57BL/6</i> pour l'appréciation de la cicatrisation	
3. Les souris <i>Nude</i> utilisées ont été <i>ovariectomisées</i>	

III- Matériel et méthodes communs aux stratégies de médecine « régénérative » mises en œuvre lors de ces travaux de doctorat _____ p.132

- A. Réalisation de la brûlure au deuxième degré profond
- B. Histologie
- C. Obtention des cellules souches/stromales mésenchymateuses du tissu adipeux
- D. RT-qPCR sur tissus murins traités
- E. Analyses statistiques

IV- Mécanismes d'action des cellules stromales du tissu adipeux humain dans un modèle murin de cicatrisation cutanée _____ p.141

- A. Protocole de thérapie cellulaire _____ p.141
- B. Effets des ASC humaines sur la cicatrisation des brûlures profondes chez la souris *Nude* _____ p.144
- C. Devenir de cellules humaines dans le tissu-hôte murin _____ p.144
- D. Etude *in vitro* de l'interaction des hASC avec des macrophages murins de souris *Nude* _____ p.148
 - 1. Matériel & Méthodes
 - a. Obtention des macrophages
 - b. Stimulations cytokiniques et hormonales des macrophages
 - c. Co-cultures des macrophages murins avec les hASC
 - d. Phénotypage des cellules en cytométrie en flux
 - e. Evaluation de la quantité d'ARN chez les macrophages
 - f. Western-blot sur milieux conditionnés
 - g. Immunofluorescence sur culture de fibroblastes de derme
 - 2. Les résultats
 - a. Les différents types de macrophages obtenus en culture
 - b. Co-cultures entre les macrophages stimulés IFN γ /LPS et les hASC
- E. Les réponses tissulaires murines à la présence des cellules stromales mésenchymateuses du tissu adipeux humain _____ p.160
 - 1. La réponse du tissu murin en fonction de la présence de cellules souches/stromales mésenchymateuses humaines
 - 2. La réponse du tissu murin en fonction de la présence de cellules souches/stromales murines
- F. Les hASC améliorent-elles la cicatrisation de brûlures profondes chez la souris *Nude* ? _____ p.168
- G. Tentative de thérapie cellulaire avec les hASC après l'initiation de l'inflammation lésionnelle _____ p.172
 - 1. Matériel et méthodes
 - 2. Résultats
- H. Conclusions sur l'utilisation de cellules mésenchymateuses en vue d'une amélioration de la cicatrisation _____ p.174

V- Plasma froid atmosphérique pour la réparation cutanée : une nouvelle étape vers la régénération mammalienne ? _____ p.179

- A- Publication _____ p.181
- B- Le plasma froid atmosphérique et ses effets sur la cicatrisation des brûlures profondes _____ p.205

- 1- Obtention de l'apoptose par une technique commune en laboratoire de biologie
 - a- Matériel et méthodes
 - b- Résultats
- 2- Le plasma froid atmosphérique, ses effets sur les cellules souches/stromales mésenchymateuses et la cicatrisation de brûlures profondes
 - a- Effet du plasma froid atmosphérique (*steamer* guidé) sur les cellules souches/stromales mésenchymateuses du tissu adipeux
 - b- Stratégie de médecine « régénérative » basée sur l'utilisation d'un plasma froid atmosphérique dans un modèle murin de brûlure profonde

Péroraison _____ p.229

Annexe _____ p.233

De la rencontre des deux : régénération versus cicatrisation _____ p.235

- 1- Du milieu aquatique, un environnement séant à la régénération
- 2- De l'avantage cicatriciel pour la survie des animaux terrestres
- 3- De l'immunité, pivot de la réparation

Références bibliographiques _____ p.247

Summary _____ p.265

Liste des figures

Figure 1 : Régénération chez les amphibiens : une cicatrisation se met en place en 48 heures

Figure 2 : Organisation tissulaire après histolyse chez les amphibiens

Figure 3 : Devenir des cellules lors de régénération d'un membre chez l'*axolotl*

Figure 4 : Figure récapitulative des processus régénératifs et leur durée d'apparition chez les urodèles

Figure 5 : Confrontations de la complexité du système immunitaire et les aptitudes réparatrices

Figure 6 : Confrontation schématique des évènements apoptotiques et prolifératifs dans la cinétique de régénération chez plusieurs animaux

Figure 7 : Les deux phases du processus régénératifs chez la planaire

Figure 8 : Une explosion oxydative semble préalable à la régénération chez la larve du xénopé

Figure 9 : Les EAO sont retrouvées uniquement au lieu de la blessure chez l'hydre

Figure 10 : L'apoptose stimule la prolifération par l'intermédiaire de la PGE2 chez l'espèce murine

Figure 11 : Corrélation hypothétique entre EAO, apoptose et régénération

Figure 12 : La cicatrisation cutanée selon la doctrine prédominante

Figure 13 : Mise en œuvre de l'immunité de type Th2 responsable de la réaction fibrotique de la cicatrisation

Figure 14 : L'immunité de type Th2 dans la cicatrisation

Figure 15 : Les trois types de macrophages

Figure 16 : Les types de macrophages observés dans la cicatrisation

Figure 17 : Le continuum de la cicatrisation sous le regard de l'immunité

Figure 18 : La peau humaine

Figure 19 : L'épiderme et ses couches cellulaires

Figure 20 : Réseau d'ancrage de collagène sous la *lamina densa*

Figure 21 : Le follicule pileux

Figure 22 : Contribution des différentes cellules souches épidermiques à la réépithérialisation post-lésionnelle

Figure 23 : Comparaison entre les peaux murine et humaine

Figure 24 : La réparation cutanée chez l'homme selon la profondeur de la blessure

Figure 25 : Observation macroscopique de la cinétique de cicatrisation chez l'homme, le rat et la souris

Figure 26 : Histologie de peaux saines et de cicatrices cutanées chez l'homme et la souris

Figure 27 : Rapport entre les pathologies cicatricielles généralement décrites et le processus de cicatrisation

Figure 28 : Profondeur des brûlures ; la profondeur répertoriée sera celle de l'étude expérimentale

Figure 29 : La cicatrice hypertrophique ; aspects macroscopiques et histologie

Figure 30 : Etiologie et physiopathologie de la cicatrisation hypertrophique

Figure 31 : La chirurgie des cicatrices hypertrophiques : greffes et reprises chirurgicales

Figure 32 : Propriétés *immunomodulatrices* des CSM et les mécanismes associés

Figure 33 : Activité sécrétoire des CSM après stimulation par des facteurs circulants ou tissulaires secrétées en réponse à un traumatisme ou une pathologie

Figure 34 : Fréquence des CSM issus de tissus adultes

Figure 35 : Possibles mécanismes d'action thérapeutiques des ASC

Figure 36 : Les quatre états de la matière

Figure 37 : Les sources de plasmas froids atmosphériques

Figure 38 : Plasma DBD commun et plasma FR-DBD

Figure 39 : Appareillage délivrant un jet de plasma (guider streamer) froid atmosphérique

Figure 40 : Possibles mécanismes d'action thérapeutique des plasmas froids pour la prise en charge de cicatrisations excessives

Figure 41 : La souris *Nude*

Figure 42 : Réalisation de la brûlure

Figure 43 : La brûlure du second degré profond chez la souris *Nude*

Figure 44 : Comparaison macroscopique de la cicatrisation de brûlure profonde chez la *C57BL/6* et la *Nude*

Figure 45 : Protocole d'inclusion en paraffine

Figure 46 : Schéma récapitulatif de l'obtention des ASC humaines

Figure 47 : Protocole d'extraction d'ARN des tissus murins supplémentés avec les hASC

Figure 48 : Protocole d'extraction d'ARN des tissus murins traités par plasma froid

Figure 49 : Protocole antérieur d'injection

Figure 50 : Nouveau protocole d'injection

Figure 51 : Thérapie cellulaire basée sur l'utilisation des ASC humaines dans un modèle murin de brûlure

Figure 52 : La population de cellules mésenchymateuses humaines décline avec le temps

Figure 53 : Hypothèse des modes d'action des hASC dans la cicatrisation de la brûlure profonde chez la souris

Figure 54 : Biologie et obtention des macrophages rencontrées lors de la cicatrisation

Figure 55 : Protocole des co-cultures hASC et macrophages murins

Figure 56 : Discriminations cellulaires lors des co-cultures par contact

Figure 57 : Photographies de co-cultures par contact des hASC et des macrophages

Figure 58 : Les hASC modifient le phénotype membranaire des macrophages murins mais augmentent les sécrétions pro-inflammatoires

Figure 59 : Quantité d'ARN de facteurs protéiques impliqués dans la cicatrisation, relevée dans les tissus murins selon une cinétique temporelle

Figure 60 : Quantités relatives d'ARN messagers tissulaires au jour 3 après brûlure et injection

Figure 61 : Les hASC n'améliorent pas la cicatrisation des brûlures dans un modèle murin

Figure 62 : Les hASC n'améliorent macroscopiquement pas la cicatrisation quelle que soit l'architecture de la blessure et quel que l'expérimentateur diligenté

Figure 63 : Les hASC ne possèdent pas macroscopiquement d'effets bénéfiques sur la cicatrisation des brûlures du second degré profond

Figure 64 : Induction de morts cellulaires chez les ASC avec la *staurosporine*

Figure 65 : Le plasma froid induit principalement l'apoptose des cellules mésenchymateuses

Figure 66 : Mise en place du protocole définitif du traitement des brûlures par plasma froid

Figure 67 : Les souris traitées par plasma présentent une excellente cicatrisation voire une régénération apparente

Figure 68 : Les peaux traitées plasma recouvrent l'hypoderme et possèdent une architecture similaire à la peau saine

Figure 69 : Quantité d'ARN de Nanog dans les tissus traités Plasma, ASC ou *NaCl* à 72 heures

Figure 70 : Effets du plasma froid pressentis suite à l'étude menée dans cette thèse

Figure 71 : Aspect de la cicatrice lorsqu'elle est présente

Figure 72 : Hypothèses de travail sur le long terme, considérant qu'une régénération soit caractérisée

Figure 66 supplémentaire : Souris traitées Plasma avec coupes histologiques correspondantes

Figure 67 supplémentaire : Ensemble des animaux traités et contrôles sacrifiés à 21 jours après brûlures ou 18 jours après traitement

Figure 73 : Figure récapitulative des stratégies thérapeutiques décrites dans ce manuscrit

Figure 74 : Cinétique développementale du Xénope à ses capacités régénératrice et cicatricielle

Figure 75 : Image tirée du film WALL-E, film d'animation Disney-Pixar

Liste des figures de la publication

Figure 1 : Characterization of the mouse skin burn model.

Figure 2 : Plasma procedure and device to treat scald burn.

Figure 3 : Time course of burn skin recovery after a single CAP treatment.

Figure 4 : Modification of protein and cell marker expressions following CAP treatment in skin tissue.

Figure 5 : Immune cells identification in skin tissue 5 hours after CAP treatment.

Figure 6 : Differential cell sensitivity to CAP exposure.

Table 1 : Primers for RT-qPCR

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ASC : Adipose-derived stem cell

CD : Cluster of differentiation

CEA : Coiffe épidermique apicale

CHU : Centre hospitalier universitaire

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

CSM : Cellule souche mésenchymateuse

DLA : Dermolipectomie

EAO : Espèces actives de l'oxygène

EGF : Epidermal growth factor

ES : Embryonic stem cell

ESM : Ecart standard à la moyenne

FGF-2 : Fibroblast growth factor 2

FOX3P : Forkhead box P3

GFP : Green fluorescent protein

hASC : human Adipose-derived stem cell

HLA : Human leucocyte antigen

IFN γ : Interféron gamma

IL : Interleukine

iNOS : inducible Nitric oxide synthase

iPS : Induced-pluripotent stem cell

ISCT: International Society of Cellular Therapy

JNK : c-Jun N-terminal kinases

LPS : Lipopolysaccharide

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MMP8 : Matrix metalloproteinase 8

NADPH oxydase : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase

PGE2 : Prostaglandine E2

PCR : Polymerase chain reaction

PDGF : Platelet-derived growth factor

POSTN : Périostine

RAG : Recombination-activating gene

RELM α : Resistin-like molecule alpha

RT-qPCR : Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

SCID : Severe combined immunodeficiency

SINE : Short interspersed element

α -SMA : Smooth muscle actin alpha

SVF : Stroma vascular fraction

TCR : T cell receptor

TGF- β 1 : Transforming growth factor beta 1

TNF- α : Tumor necrosis factor

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

UCLA : University of California, Los Angeles

VEGF : Vascular endothelial growth factor

Prolégomènes

Comme le titre l'indique, cette thèse développera des approches de médecine « régénérative ». Pour ma part, lorsqu'on emploie le qualificatif « régénératif » en lieu et place de « régénérateur », on stipule que pour parvenir à une régénération chez les mammifères, la voie à privilégier est d'utiliser une approche de médecine de la réparation qui stimule de manière intrinsèque les capacités régénératrices de l'individu.

L'organisme mammifère et *a fortiori* l'organisme humain au-devant d'un traumatisme conséquent recherche de manière inexorable à cicatriser ; en somme, pour réparer la perte de substance subite, des mécanismes se mettent en branle pour constituer une chape fibreuse se substituant au tissu originel. La mécanique de cicatrisation est ainsi faite que l'apport de cellules de remplacement, quelle que soit le moment choisi pour les adjoindre, reste peu suivi d'effets en ceci que amenées trop tôt, les cellules seront détruites par une inflammation post-lésionnelle et que amenées trop tard, elles ne trouveront les substrats nutritifs nécessaires pour leur survie.

Cependant, il existe dans le règne animal des animaux doués de régénération ; lorsqu'un tissu est détruit ou lorsqu'un membre est sectionné, des mécanismes cellulaires et tissulaires proposent le remplacement parfait des parties manquantes. Certains de ces animaux sont d'un point de vue biologique relativement complexe ; bien que les mammifères cicatrisent, on peut se demander s'ils n'ont pas gardé des réminiscences, certes inhibées par le processus cicatriciel, d'une telle mécanique régénératrice. En définitive, les questions posées sont : qu'adviendrait-il si nous inhibions la réaction cicatricielle ? Une régénération se substituerait-elle ?

Considérant ces questions pertinentes, nous entreprendrons tout au long des études expérimentales des stratégies de médecine « régénérative » qui auront pour finalité d'empêcher la constitution de la cicatrice et de stimuler, si elles existent, les capacités régénératrices endogènes. Bien qu'une thérapie cellulaire ait été utilisée, nous attendions des cellules adjointes qu'elles coordonnent des mécanismes réparateurs plutôt qu'elles ne remplacent les cellules perdues. La seconde stratégie expérimentale, pour sa part, s'inscrira entièrement dans les limites des questions posées (cf. *Supra*).

Introduction

La nature a doté chacun des organismes qu'elle a engendrés, de mécanismes vertueux capables de répondre à diverses agressions de la part du milieu qui les accueille. Quelle que soit l'origine de l'agression, ces mécanismes remplissent inexorablement leur fonction.

La réparation *lato sensu* est l'un de ces mécanismes. De la plus petite entité, l'ADN, aux tissus les plus durs, les os, une réparation se met en œuvre pour assurer la pérennité de la vie de l'être dont l'intégrité physique a été perturbée.

Au vu de son importance quant à la perpétuation de l'espèce, quelle que soit cette dernière, l'étude de la réparation trouve une place prééminente dans l'ensemble des disciplines et des paradigmes des sciences de la nature et de la vie.

Malgré le caractère passionnant de l'ensemble des réparations, nous nous bornerons à traiter, dans la première partie de cette thèse, des mécanismes observés chez les animaux complexes à l'échelle histologique, anatomique et physiologique (Partie I).

Dans un deuxième temps, une introduction bibliographique de forme conventionnelle sera posée. Elle couvrira la description macroscopique et histologique de la peau mammalienne et des cicatrices cutanées dites « saines » (Partie II, chapitre I). Par la suite, nous nous attarderons sur un cas de figure dans lequel la réparation devient frénétique. Lors de certaines brûlures, la réparation dépasse allègrement sa fonction. Le résultat est qu'au lieu de gérer acceptablement les pertes tissulaires et de restaurer un certain équilibre qui permettrait à l'organisme de surmonter l'évènement lésionnel, les processus réparateurs devient incontrôlables au point de porter atteinte au bon déroulement de la vie du brûlé (Partie II, chapitre II).

Pour finir avec l'introduction bibliographique, nous décrirons, en premier lieu, une population cellulaire, les cellules souches/stromales mésenchymateuses, qui semblerait posséder les qualités requises pour prendre en charge les cicatrisations excessives telles que celles proposées par les brûlures profondes (Partie II, chapitre III) et en second lieu, nous traiterons d'un état de la matière dont la composition et les réactions qu'il engendre seraient de manière singulière des candidates idéales pour la médecine « régénérative » (Partie II, chapitre IV).

Finalement, nous nous servirons des connaissances décrites dans les deux premières parties de cette thèse pour tenter de contrecarrer le destin cicatriciel des brûlures profondes. Un apport substantiel sera apprécié à l'aide de la science de la nature par excellence, la physique. (Partie III, études expérimentales).

Partie I

La réparation dans le règne animal

I- De la réparation dans le règne animal

Les vertébrés, les invertébrés, les arachnides, les reptiles, les mammifères, l'Homme, quelle que soit la classification de l'espèce, lorsque qu'une blessure survient, un mécanisme, vigoureux, imperturbable, même si son action pourrait revêtir un caractère attentatoire en ce qu'il concerne la vie de l'organisme, se mettra en branle : la réparation. Celle-ci aura pour conséquence de réparer puis d'effacer, avec plus ou moins de succès, un évènement lésionnel.

Toutefois, il me faut apporter une précision à ce terme de réparation. Le monde est peuplé de différentes espèces animales, chaque espèce est douée de réparation mais cette réparation revêt plusieurs formes. Quelles sont ces formes ? Peuvent-elles coexister chez un même animal ? Sont-elles différentes quant à leurs évènements biologiques? Quelles seront les conséquences sur la vie de l'animal reconstruit ?

Dans le règne animal, il existe de part et d'autre d'un continuum deux grands types de réparations : la régénération et la cicatrisation. Chaque type de réparation sera traité séparément. Nous commencerons par aborder la régénération dans son ensemble (A) puis nous étudierons les évènements cicatriciels (B). Dans un dernier paragraphe, la régénération et la cicatrisation seront mises en parallèle pour faciliter la réponse aux questions sus-posées ; il sera précieux de placer ces deux types de réparation dans une chronologie évolutive, si fragile soit-elle, pour parvenir à tendre vers l'une ou l'autre intéressée dans les cas de figure qui nous échoient (Annexe n°1).

A- De la régénération

Une pléthore d'espèces animales est douée de régénération. Aussi, malgré les différences fondamentales entre ces espèces, le mécanisme régénérant garde une constance, toute proportion gardée, quant à la procédure par laquelle il remplace la partie lésée, détruite ou manquante. C'est pourquoi je m'exprimerai sur la régénération dans un cadre général, et en soulignant les similitudes rencontrées entre les animaux régénératifs. (Pour revues : [1] [2] [3])

1- Des mécanismes de la régénération

L'exemple qui sera développé tout au long de ce chapitre, aura comme point de départ la perte d'un membre et ce, quel que soit le membre : la patte chez la salamandre ou le triton, la queue chez le lézard commun, la nageoire caudale chez le poisson-zèbre. Intentionnellement, les cas de l'hydre et de la planaire seront mis de côté, encore que quelques mots soient émis à leur sujet.

Bien que la finalité soit la même, il existe quelques différences substantielles entre les processus régénératifs rencontrés dans le règne animal. Nonobstant, une régularité semble émerger. C'est cette régularité qui sera abordée dans ce chapitre sans insister, de manière exhaustive, sur les dissemblances.

a- L'hémostase

Le premier processus aura comme conséquence de limiter les pertes de fluides, de sang principalement. L'hémostase est ce processus et il peut être défini comme l'ensemble des phénomènes qui concourent à maintenir le liquide sanguin dans les vaisseaux. Le propos n'est pas de décrire de manière exhaustive¹ l'hémostase mais de s'attarder sur la formation du caillot de fibrine et de la place centrale qu'occupe la thrombine.

Lors d'une blessure conséquente, l'hémostase primaire n'est pas suffisante pour prévenir la perte de sang et, une consolidation du clou plaquettaire est nécessaire. Deux protéines auront un rôle capital dans ce que l'on nomme l'hémostase secondaire. Ces deux entités peptidiques

¹ Pour une lecture plus détaillée sur la coagulation, le lecteur peut se référer au *Précis de physiologie médicale*, Guyton & Hall, chapitre 36, deuxième édition, 2003, Piccin.

sont le *fibrinogène*, protéine de haut poids moléculaire soluble dans le plasma sanguin, et la *prothrombine*, une alpha-globuline hépatique, précurseur de la thrombine. L'épilogue de l'hémostase primaire est ponctué par la constitution du *clou plaquettaire* qui comblera la brèche vasculaire. Cette phase de stabilisation, la coagulation, est déclenchée par l'activation de la prothrombine à l'aide du *facteur activateur de la prothrombine* et d'un cation, le Ca^{2+} . L'activation consiste en l'apparition de la *thrombine* par clivage de la prothrombine. La thrombine, ainsi clivée, entraîne la formation de *fibrine* par action protéolytique sur le fibrinogène. Après polymérisation, les filaments de fibrine adhèrent au clou plaquettaire et aux parois vasculaires constituant de ce fait, le *caillot sanguin*. Le sang est en conséquence maintenu dans le vaisseau lésé.

De manière surprenante, il a été découvert que l'un des acteurs de la coagulation, la thrombine, outre son rôle sur le fibrinogène, possédait la propriété d'induire *in vitro* la dédifférenciation des *myotubes* mais également des cellules de l'iris des urodèles [4]. L'activation de la thrombine se révéla, par conséquent, être un signal local incitant le déclenchement de la cinétique régénératrice.

Cette étonnante propriété de l'activation de la thrombine pose la question du rôle de l'hémostase. Certes, l'hémostase est le mécanisme qui concourt à maintenir le sang dans les vaisseaux. Nonobstant, l'hémostase semble renseigner l'organisme d'une agression et en particulier, de son lieu. Enfin, celle-ci, de par les expériences menées *in vitro* [4], peut être envisagée comme un élément déclencheur de la réparation.

b- La « cicatrisation » : coiffe épidermique, inflammation

L'hémostase est suivie par ce qui pourrait s'apparenter à une cicatrisation « éclair ».

La rupture anatomique de l'hôte est suivie par la restauration rapide de la barrière épidermique prévenant ainsi toute infection, fatale si elle en est, pour l'animal meurtri.

La fermeture de la blessure à l'aide d'une prolifération précipitée des cellules épithéliales est le principal mécanisme par lequel la restauration de la barrière tégumentaire se réalise [1]. Bien que ce phénomène se produise également pour la cicatrisation des mammifères, la différence, ici, est que le réépithérialisation se fait en 24 heures.

Cette mécanique proliférative constituera la *coiffe épidermique apicale* (CEA) dont la structure est semblable à celle de la *coiffe ectodermique* retrouvée lors du développement embryonnaire des membres [1] [2] [3].

La CEA est formée de cellules épidermiques ayant proliféré et migré des berges de la blessure. Cependant, celle-ci n'a pas tout à fait la même structure histologique que l'épiderme sain en ceci qu'une membrane basale² ne se met en place, de sorte que l'épithélium soit en rapport direct avec le tissu conjonctif sous-jacent [1] [2] [3]. Cette particularité sera impérieuse pour la suite de la régénération.

En parallèle de la réépithérialisation, se développe une inflammation consécutive à la blessure. Son rôle est de débarrasser la zone des pathogènes et des débris tissulaires. De manière surprenante, une grossière cicatrisation se développera subséquemment laissant une légère cicatrice apparente sous la coiffe épidermique (Figure 1).

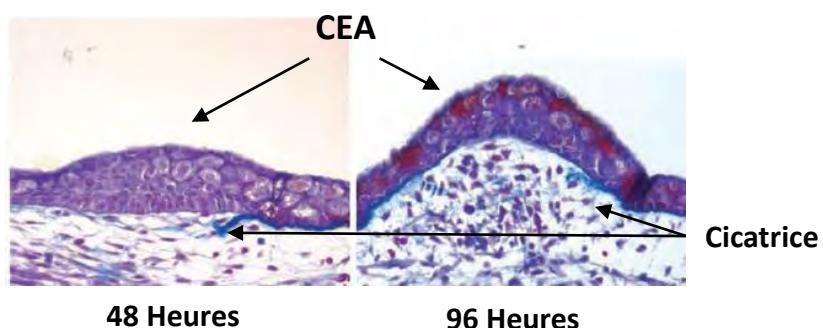


Figure 1 : Régénération chez les amphibiens : une cicatrisation se met en place en 48 heures. [1]

Ce phénomène est singulier en ce sens qu'inattendu ; la régénération commence ainsi par une cicatrisation sommaire. L'hémostase, l'inflammation et la cicatrisation durent au maximum 48 heures reflétant un mécanisme particulièrement véloce.

Dès lors que cette phase est terminée, les processus régénérateurs vont pouvoir se mettre en œuvre.

c- L'histolyse et la constitution du blastème

La régénération proprement dite commence par une intense histolyse. L'histolyse a lieu sous la coiffe épidermique et est caractérisée par une dégradation de la matrice extracellulaire et une désorganisation des tissus [5]. Une fois ce phénomène terminé, le tissu s'organise sous la forme d'un amalgame de cellules individuelles au premier rang desquelles nous observons les fibroblastes, les *chondrocytes*, les cellules de Schwann, et des cellules musculaires mononucléées (Figure 2).

² Sur coupes histologiques, le collagène de type IV n'est pas retrouvé sous la CEA.

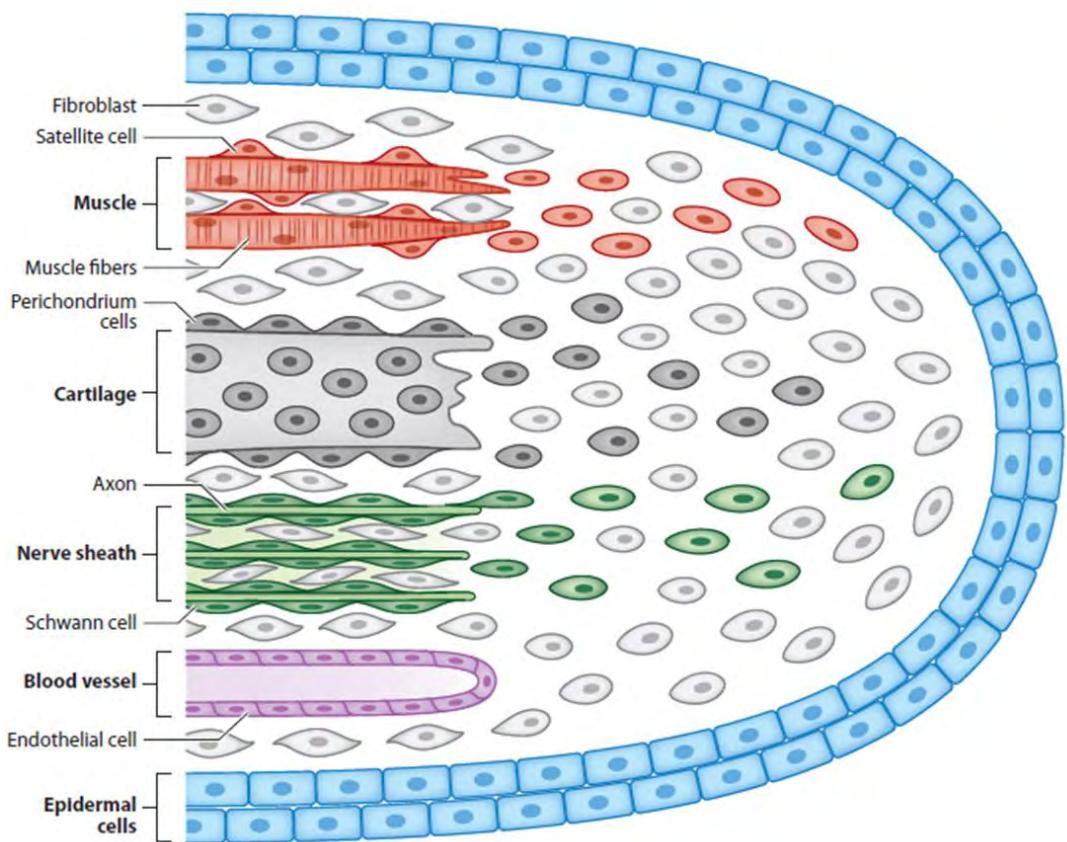


Figure 2 : Organisation tissulaire après histolyse chez les amphibiens. [5]

Les cellules ainsi libérées vont pourvoir connaître une dédifférenciation en cellules mésenchymateuses [1] [2] [3]. Les cellules dédifférencierées sont des cellules *multipotentes* qui vont se regrouper en une formation dénommée *blastème*. Le blastème peut s'apparenter au *bourgeon mésodermique* se développant aux extrémités de l'embryon lors du développement. L'hydre et la planaire, contrairement aux vertébrés doués de régénération, ne connaissent pas d'évènements de dédifférenciation et constituent leur blastème par la migration de cellules souches disséminées dans l'ensemble de leur organisme [6].

De cette masse tissulaire de caractère pseudo-embryonnaire la croissance du membre en reconstitution va pouvoir s'organiser par des mécanismes de prolifération et différenciation.

d- La morphogenèse

Les cellules ainsi redevenues immatures vont connaître des événements de différenciation et de positionnement pour reconstituer entièrement le membre. Cette phase régénératrice est gouvernée par de nombreux facteurs de croissance, également présents lors du développement embryonnaire, et par le système nerveux ; ce dernier étant particulièrement mis à propos chez les urodèles³. En revanche, les cellules mésenchymateuses du blastème ne se différencient pas de façon aléatoire. Tout se déroule comme si les cellules dédifférenciées conservaient leur identité « épigénétique » d'origine [7]. En effet, les cellules se sont dédifférenciées, ont proliféré et se redifférencient, par la suite, en leur phénotype initial (Figure 3). Les cellules semblent être non interchangeables.

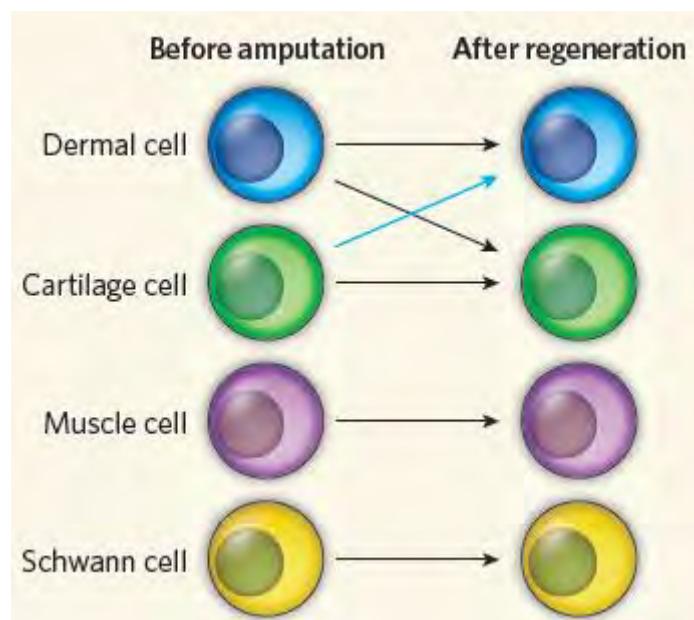


Figure 3 : Devenir des cellules lors de régénération d'un membre chez l'axolotl. [7]

Lorsque la morphogenèse est terminée, soit environ 60 jours après l'amputation, un membre identique à l'original pourra être observé.

³ L'identité proximal-distal dans la régénération du membre chez la salamandre à un système de protéine/ récepteur composé du nAG (protéine exprimée par les cellules de Schwann et les cellules de l'épiderme) et de Prod1 (récepteur exprimé à la membrane des cellules du blastème) [8].

Dans ce paragraphe, la régénération a été traitée de manière sommaire dans le but d'apporter un éclaircissement de la mécanique régénératrice et non pas de discuter de tous ses rouages.

Les principales informations que ce paragraphe soulignaient étaient que :

- La régénération commençait par une cicatrisation « éclair » ;
- la mise en place du blastème, chez les vertébrés, provenait pour majorité d'une dédifférenciation cellulaire chez les vertébrés ;
- le processus régénératrice est un processus qui s'étale sur la durée.

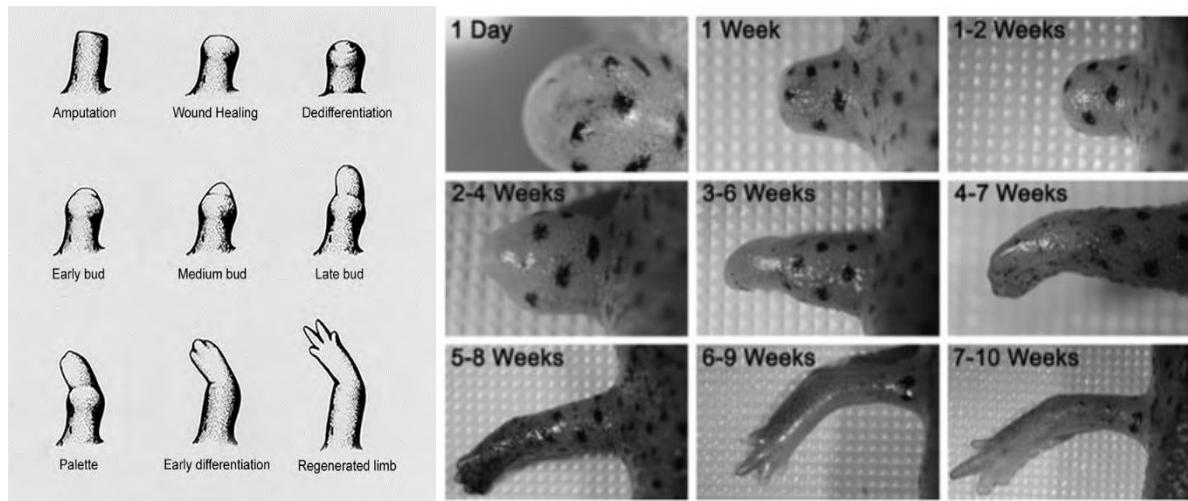


Figure 4 : Figure récapitulative des processus régénérateurs et leur durée d'apparition chez les urodèles. [9]

2- De la constance rencontrée : un système immunitaire permissif

La régénération avance sur un terrain favorable, un milieu dans lequel son potentiel n'est point réfréné. Les changements qui s'opèrent durant la mécanique régénératrice pour autant devraient affoler le système immunitaire. Il est vrai qu'une dédifférenciation, lorsqu'elle a lieu, augmentée par surcroit d'une prolifération faramineuse devraient éveiller la suspicion des cellules « patrouilleuses⁴ ». Nonobstant, ces évènements, même soutenus, passent pour le moins inaperçus au contrôle immun.

Les animaux régénératifs possèdent en commun un système immunitaire permissif à la régénération. Nous évoquerons brièvement les systèmes immunitaires de l'hydre et de la planaire qui semblent, même s'ils remplissent formidablement leur rôle premier, archaïques en comparaison à ceux d'animaux plus complexes. Par la suite, nous prendrons en exemple, pour asseoir notre propos, les changements immunitaires qui s'opèrent lors de la métamorphose des anoures. Enfin, une déviation immunitaire sera examinée dans un contexte très particulier, la régénération du cristallin chez le triton.

La première réaction immunologique reste celle consécutive à la blessure. La lésion provoque irrémédiablement une inflammation. Les signaux de danger qui en découlent et les pathogènes qui pénètrent dans le milieu intérieur provoquent l'invasion locale des cellules de l'immunité innée. Subséquemment, la zone meurtrie se verra nettoyée de ses débris ainsi que de ses agresseurs et, sera laissée saine pour permettre la réparation de se dérouler sans encombre. Ce mécanisme s'observe à chaque fois lorsque les barrières anatomiques sont rompues et quelle que soit l'espèce animale rencontrée. L'inflammation soutenue par les cellules de l'immunité innée semble être par conséquent un processus conservé au cours l'évolution du monde animal.

Par ailleurs, l'inflammation, réponse immune due à la blessure, est impérative pour initier le processus de régénération en ceci qu'elle propose à l'hôte, les signaux de l'agression. Ces signaux seront intégrés de façon à ce que l'organisme réponde par une réparation ciblée de la barrière anatomique effondrée [11].

⁴ Référence aux macrophages qui jouent, en quelque sorte, le rôle du maintien de l'ordre dans les tissus et aux monocytes patrouilleurs de la circulation sanguine [10].

Les dissemblances entre les « animaux régénératifs » et les « animaux cicatrisants » ne se rencontrent que lorsque l'inflammation a été opérée. Nous le verrons plus tard dans le manuscrit, chez les mammifères ou chez les animaux favorisant la cicatrisation, l'inflammation laisse place à un autre type d'immunité (cf. chapitre II, Partie I).

A l'inverse, les animaux qui possèdent la vertu de régénérer ne substituent pas une immunité par une autre mais connaissent un programme biologiquement différent, la formation d'un blastème. La formation du blastème semble être acceptée dans les cas régénératifs mais pourrait être réprimée par une immunité compétente ; cependant, ceci ne se produit point.

Tous les métazoaires⁵ possèdent une immunité innée. En revanche, tous ne possèdent pas le privilège de disposer d'une seconde défense plus sophistiquée, le système immunitaire adaptatif. Ce système immunitaire circonstancié semble être antinomique de la régénération. Lorsque nous confrontons les aptitudes de réparations rencontrées dans le clade métazoaire, nous nous apercevons que les animaux dépourvus ou disposant d'un système immunitaire adaptatif sommaire se réparent sans cicatrice et que les animaux possédant un système adaptatif complexe et efficient présentent inexorablement une cicatrisation pour lutter contre une agression tissulaire [12]. Ce postulat, presque axiomatique, peut se résumer par la figure 5 suivante :

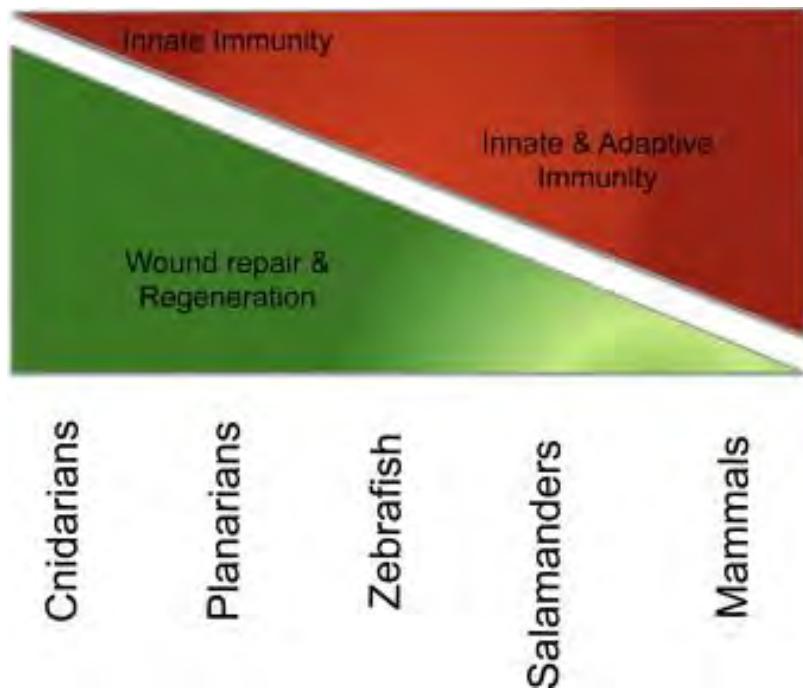


Figure 5 : Confrontations de la complexité du système immunitaire et les aptitudes réparatrices. [12]

⁵ Métazoaires désignent l'ensemble des eucaryotes multicellulaires et hétérotrophes.

La figure précédente permet d'émettre également une autre remarque. L'hydre et les planaires ne disposant pas de système immunitaire adaptatif, ne proposent pas d'événements de dédifférenciation cellulaires pour parvenir à la régénération. En effet, pour constituer le blastème régénérant, ces animaux disposent de cellules souches disséminées dans l'ensemble de leur organisme [13]. Lorsque la blessure survient, les cellules souches en question migrent à l'endroit lésionnel et constituent l'ébauche pseudo-embryonnaire de laquelle les réparations finales vont s'opérer. Leurs cellules régénératrices participatives existent en chaque instant dans l'organisme, elles n'ont donc aucunement besoin d'être acceptées par le système immunitaire lors du processus de régénération.

A l'inverse, le poisson-zèbre et les amphibiens constituent leurs blastèmes par des événements de dédifférenciation [2] [3]. En se rapportant à la figure, nous percevons qu'ils disposent d'un système adaptatif, qu'il soit simple ou plus complexe. En somme, il est légitime de penser que des tissus pseudo-embryonnaires apparus par dédifférenciation aient besoin d'une acceptation immunologique pour exister. Le secret de ces vertébrés ne réside-t-il pas dans le fait que leur système immunitaire tolère la constitution du blastème ? Plusieurs éléments peuvent nous proposer des esquisses de réponses.

D'abord, il a été montré que la régénération caudale ou que la régénération cardiaque chez le poisson-zèbre qui, toutes deux dépendant d'un blastème issu d'une dédifférenciation, sont abrogées lorsque nous inhibons pharmacologiquement les récepteurs aux glucocorticoïdes [14] [15]. Sachant que les corticoïdes sont de puissants immunosuppresseurs, alors la régénération dédifférenciation dépendante de cet être semblerait probablement fonction d'une immunosuppression ou d'une immunotolérance.

Autre argument ; chez les anoures⁶, la régénération est fonction de l'âge de l'animal. En effet, à l'état larvaire, les anoures sont doués de régénération. Malheureusement, cette fameuse aptitude s'avère grandement affectée voire même abandonnée après la métamorphose [16]. Cette perte réparatrice apparaît coïncider avec l'apparition du système immunitaire adaptatif efficient chez l'adulte.

Dans les derniers stades développementaux, la section d'un membre chez le têtard n'engendre plus la constitution d'un blastème mais d'une sorte de « pseudo-blastème » fibroblastique

⁶ Amphibiens sans queues.

dans lequel une réaction fibrotique se met finalement en place [17]. Ce phénomène laisse suggérer qu'une mécanique empêche la survenue du blastème.

En vue de clarifier le rôle de l'acquisition d'une immunité compétente dans la perte du pouvoir régénératif, les auteurs se sont appuyés sur les phénomènes du rejet de greffe. Il a été observé deux situations assez remarquables. La première est qu'une peau greffée en allogénique est bien plus rapidement rejetée chez le xénope adulte que chez le têtard [17]. En conséquence, il semblerait que les anoures adultes disposent d'une immunité acquise plus compétente que celle des larves. Ensuite, lorsqu'une peau du têtard, cryo-conservée, est greffée sur le même organisme dans son état adulte, celle-ci est activement rejetée. Ceci peut être expliqué par le fait que les cellules immunes larvaires des anoures n'expriment pas le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I tandis que les cellules adultes, oui [18]. Finalement, l'absence d'antigène du soi, impliqué dans le phénomène de rejet, est donc retrouvée chez les têtards, qui sont des animaux doués de régénération. En d'autres mots, il en ressortirait que, un système immunitaire adaptatif, responsable des événements de rejet tissulaire, reste contraire à la régénération en ceci que les greffes sont relativement tolérées par les têtards, pourvus de régénération, et rejetées chez l'adulte, qui se répare par cicatrisation.

De surcroît, nous savons que les urodèles régénèrent de manière plus efficace que leurs confrères, les anoures. De manière intéressante, les urodèles présentent une immunodéficience par rapport aux anoures. Bien que ces deux classes d'amphibiens possèdent un système immunitaire adaptatif, les premiers présentent des difficultés à rejeter un greffon [19]. Cette différence est expliquée par le fait que les anoures possèdent un système adaptatif assez similaire aux mammifères tandis que les urodèles ne présentent qu'une immunité humorale très modeste i.e. ne produisant que des immunoglobulines de la classe des IgM [20].

Toutes ces indications mises bout à bout enlèvent la forte présomption que le système immunitaire revête un caractère permissif à la régénération. En effet, les anoures adultes, seuls amphibiens qui ne régénèrent pas, sont ceux qui disposent du système immunitaire adaptatif le plus compétent.

Pour approfondir, nous pouvons citer un exemple de régénération dans laquelle le système immunitaire est participatif de la régénération. Il est décrit que le triton, batracien fœtal urodélien, possède la particularité de régénérer très efficacement son cristallin. Cependant, cette régénération s'avère particulière en ceci qu'elle fait intervenir activement un type de cellule immunitaire dans le processus régénérant. En effet, nous savons depuis 1971 que

lorsqu'on ôte le cristallin d'un tel urodèle, les cellules épithéliales pigmentées de l'iris rentrent dans le cycle cellulaire, perdent leur pigmentation et se différencient en un nouveau cristallin [2].

En revanche, l'œil du batracien présente la particularité de posséder en sa chambre antérieure un environnement immunosupresseur caractérisé par la facilité à générer des lymphocytes immunorégulateurs. L'immunosuppression de l'œil semble être sélective et favorise l'élimination des lymphocytes T soutenant l'inflammation, tout en épargnant les lymphocytes cytotoxiques [21]. Ces particularités apparaissent être attenantes à des cellules présentatrices d'antigènes immatures. Les CPA de l'iris ne peuvent présenter la molécule *co-stimulatrice* CD40 à leur surface et il en résulte que les lymphocytes T stimulés par de tels CPA deviennent des lymphocytes T régulateurs, cellules en première ligne dans les phénomènes d'immunosuppression et d'immunotolérance⁷ [21] [22].

Lorsque l'expérimentateur perce le cristallin d'un triton, le cristallin endommagé est lysé et phagocyté puis un nouveau cristallin est ourdi par les tissus de l'iris. De manière intéressante, lorsque nous récupérons des cellules dendritiques observées durant cette mécanique et que nous les transplantons dans un œil sain, alors le cristallin sain est déplacé, lysé et remplacé par les cellules de l'iris. Si nous faisons l'expérience avec des cellules dendritiques isolées d'un environnement oculaire non agressé, l'évènement de destruction-régénération du cristallin ne se réalise point [22]. Cela signifie indubitablement que les cellules de l'immunité, en l'occurrence dans cet exemple les cellules dendritiques, participent activement à la régénération. Encore, à travers cet exemple, plane l'ombre d'une immunosuppression capable, de laisser des tissus croître ou de changer d'identité et donc, d'accepter la régénération.

Considérant l'ensemble de ces données, l'allégation que la régénération se développe en milieu favorable semble être fondée. Les animaux pour qui la dédifférenciation n'est pas un évènement régénératrice ne possèdent pas de système immunitaire adaptatif et par conséquence, des cellules pseudo-embryonnaires peuvent prospérer dans l'organisme sans être inquiétées pour leur survie. Par contre, les chordés pour qui la dédifférenciation régénératrice est nécessaire, semblent être tributaires d'une immunosuppression locale pour parvenir à la fameuse régénération. Qui sait sans système immunitaire adaptatif, ces derniers garderaient des pools de cellules embryonnaires pluripotentes en leur sein.

⁷ La différence entre l'immunosuppression et l'immunotolérance est que la première peut être qualifiée de générale et que la seconde est plus circonstanciée et dirigée.

Finalement, une question qui se pose : L'apparition d'une immunotolérance locale au niveau de la blessure chez les mammifères permettrait-elle la mise en place d'une régénération ?

3- D'un nouveau mécanisme décodé : l'apoptose

Prométhée, enchainé aux roches du Caucase, voyait chaque nuit, son foie régénérer de ses blessures... De sorte que son supplice soit éternel. Ceci est un mythe âgé de deux millénaires. De manière inexplicable et indicable, le mythe se révéla une réalité en ceci que le tissu hépatique humain est, effectivement, toute proportion gardée, doué de régénération.

Aujourd'hui, un autre mythe prend une signification, somme toute, singulière : le mythe du Phoenix. L'oiseau mythologique avait la particularité de renaitre de ses cendres à chaque cycle solaire (...) Autrement dit, la mort amenait à la résurrection. Bien que fantasque et allégorique, cette aptitude mythique semble être, à l'instar de la régénération hépatique, une qualité biologique.

La régénération semble fort dépendante de la mort cellulaire et plus précisément, de la mort cellulaire programmée.

Il a été montré chez l'hydre, chez la planaire mais également chez le poisson-zèbre que des événements d'apoptose sont observés pendant la mécanique régénératrice [23]. Bien que ce phénomène semble à première vue évident puisque la blessure est, en elle-même, initiatrice de mort cellulaire, ces événements ne sont pas consécutifs à la lésion mais semblent être plutôt participatifs de la régénération.

L'hydre, dont la régénération est furtive⁸, connaît une vague massive de mort cellulaire dans l'heure qui suit la résection de son extrémité apicale. Les cellules entrées en apoptose, essaient transitoirement la protéine *Wnt3* dans son entourage et par consécution, entraînent l'activation de la voie de signalisation de la β -caténine chez les cellules épithéliales à proximité [24]. Ce phénomène permet l'émergence d'une zone de prolifération qui participe directement à la régénération [24]. Deux circonstances laissent suggérer que cette mort cellulaire apoptotique est inhérente au processus régénératrice. La première est que l'inhibition de cette vague de mort réprime la régénération. La seconde circonstance est que l'induction d'une apoptose massive sans résection est accompagnée par l'apparition d'une formation ectopique [23]. Bien que l'apoptose ne soit pas suffisante à elle seule pour mettre en œuvre un

⁸ Moins de trois jours [21].

programme régénératrice complet chez l'hydre, l'ensemble de ces descriptions suggère l'idée que l'apoptose fait partie d'une des mécaniques participatives de la régénération.

Un autre élément vient appuyer l'hypothèse selon laquelle l'apoptose semble moteur pour la régénération. La planaire est capable de répondre à une section complète par l'apparition de deux planaires. Il a été démontré que cette section était suivie au niveau des sites mutilés de processus prolifératifs soutenant la régénération [23]. En approfondissant la description des événements, il fut observé l'apparition de deux phases apoptotiques [25]. La première phase semble liée à la blessure en elle-même et reste circonscrite à la zone lésionnelle ; toutefois, elle demeure accompagnée d'une activité mitotique conséquente dans l'ensemble de l'organisme. Par contre, la seconde phase mérite une attention toute particulière. Survenant à distance temporelle de la blessure⁹, son apparition semble non accidentelle ; d'autant plus que l'ampleur du phénomène ne laisse planer aucun doute quant à une manifestation contrôlée. En outre, ce second événement est suivi d'une modulation de l'activité mitotique des néoblastes recrutés [25]. La régénération des planaires peut se décomposer en deux temps i.e. une réponse proliférative systémique des néoblastes environ 6 heures après la section et une réponse proliférative et différenciatrice locale de ces mêmes précurseurs. En intégrant ces connaissances, nous nous apercevons qu'il peut exister une relation de cause à effet entre les deux séquences d'apoptose et les deux phases régénératrices en ceci qu'elles semblent correspondre dans une échelle temporelle (*cf.* figure 6 et figure 7). En effet, la première vague apoptotique s'observe dans les 4 heures après la section et la prolifération générale *néoblastique* apparaît subséquemment ; la seconde vague s'apprécie à partir de 48 heures après la lésion et la prolifération locale des néoblastes également. Tout concourt à penser que les vagues apoptotiques observées participent des événements prolifératifs.

Un dernier animal connaît ces séquences de morts cellulaires, le poisson-zèbre. Lors de la régénération de la queue de l'animal, à l'instar de la planaire, apparaissent deux vagues de mort cellulaire. La première semble être conditionnée par la blessure¹⁰ et correspond temporellement à l'ébauche de cicatrisation indispensable pour fermer rapidement la lésion. En revanche, une vague secondaire d'apoptose prend naissance du moignon cicatriciel préalablement formé et frappe préférentiellement les cellules de l'épiderme. Cette seconde

⁹ Aux alentours des deux jours après blessure.

¹⁰ Les morts cellulaires sont autant apoptotique que nécrotique.

« explosion »¹¹ apoptotique lorsqu'elle est inhibée empêche la constitution du blastème régénératrice. Il apparaît là encore que l'évènement semble constituer un élément moteur de la régénération. D'ailleurs, il est nécessaire de remarquer que les évènements mortels épargnent soigneusement les néoblastes chez la planaire et les cellules mésenchymateuses douées de dédifférenciation chez le poisson-zèbre qui vont être les briques et le ciment des processus régénératrices, de sorte que l'édifice préexistant ait besoin d'être détruit pour mieux se reconstruire par la suite.

Devant ces récentes et surprenantes découvertes, une dénomination idoine a été admise : la *mort cellulaire régénératrice*. Ceci semble être l'acceptation que l'apoptose est un élément moteur voire déclencheur de ces formidables régénérations.

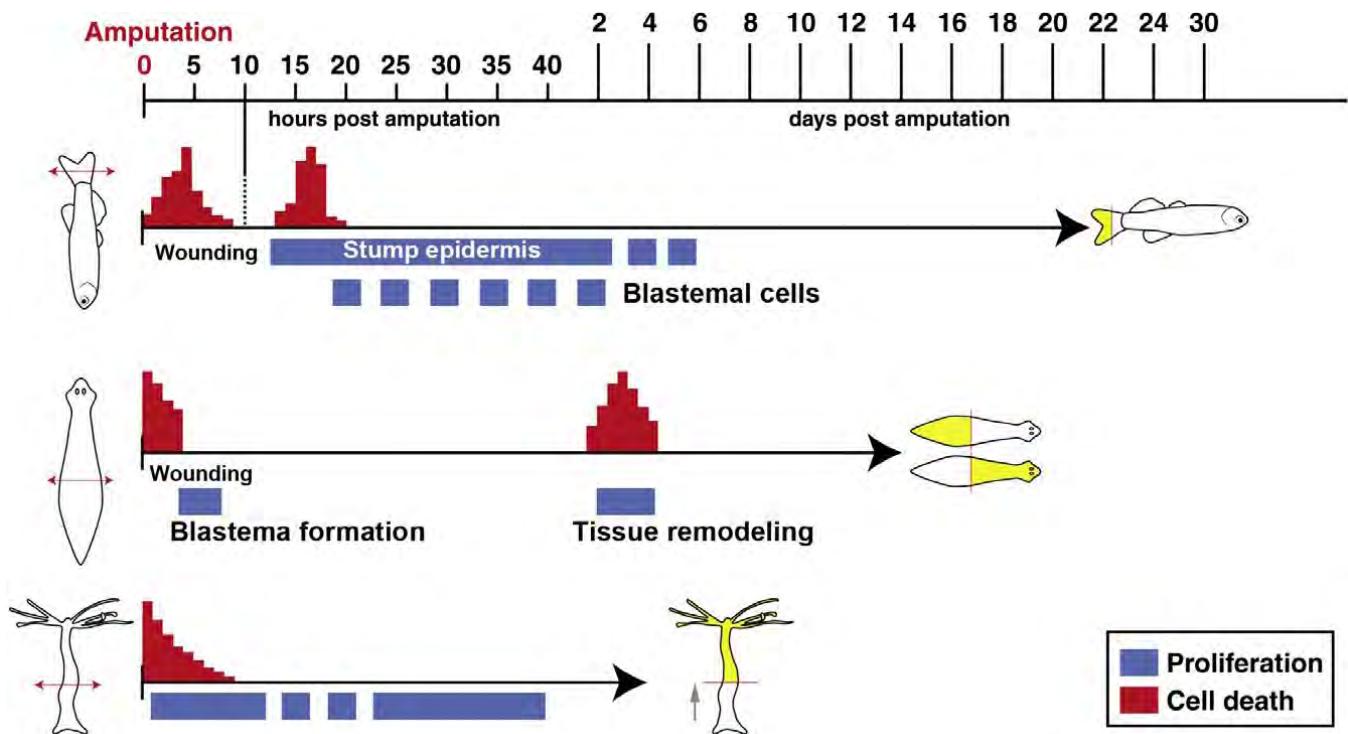


Figure 6 : Confrontation schématique des évènements apoptotiques et prolifératifs dans la cinétique de régénération chez plusieurs animaux. [23]

Il est impérieux de remarquer que les vagues apoptotiques sont concomitantes avec les processus prolifératifs et/ou avec la formation du blastème véritable marqueur de la régénération.

¹¹ Les auteurs dénomment ces séquences de *burst* ; ceci en raison de l'ampleur du phénomène.

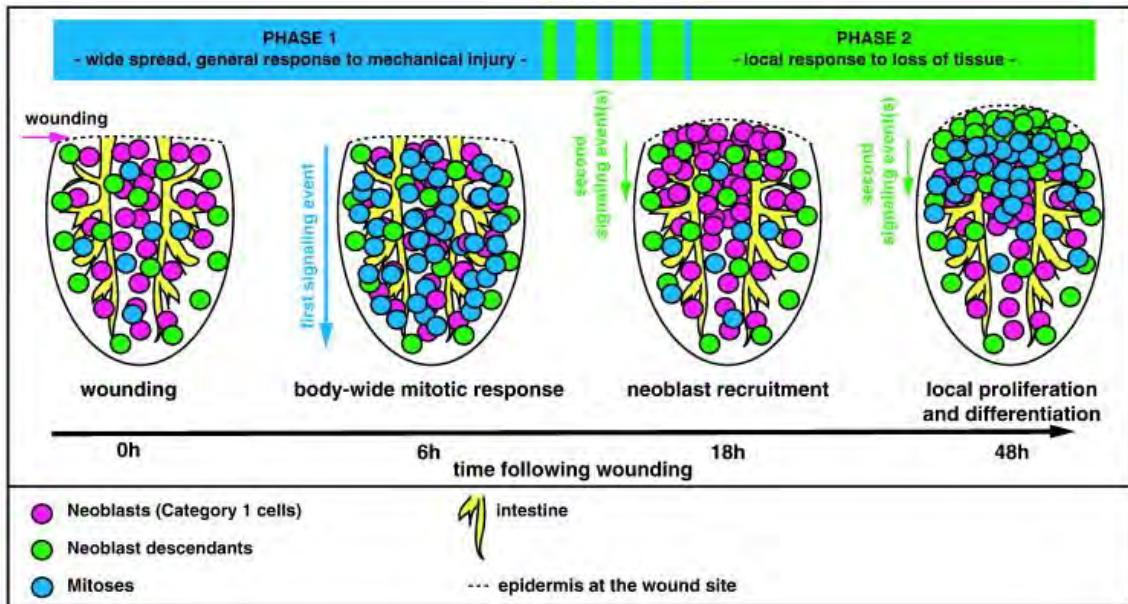


Figure 7 : Les deux phases du processus régénératrice chez la planaire. [26]

Une première réponse à la section est une division générale des néoblastes, cellules souches de la planaire. La seconde réponse est la prolifération locale des néoblastes ayant été recrutés.

De manière intéressante, la division des néoblastes semble concordée avec les vagues d'apoptose décrites dans la figure 1.

Les auteurs semblent unanimes sur le fait que ces « explosions » sont strictement régulées dans le temps et l'espace [23]. Cependant, une régulation entraîne de manière invincible un élément déclencheur, un bouton « marche » en quelque sorte.

Vu l'ampleur de l'évènement, vu la célérité du phénomène, le rôle des *Espèces Actives de l'Oxygène*, capables d'induire l'apoptose [27], a été envisagé.

Chez le poisson-zèbre, il a été montré que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) issu des oxydases apparaît finement régulé dans le temps et l'espace après une amputation de queue [28] et devrait *in fine* jouer un rôle de senseur de l'évènement traumatique ; en effet, les EAO sont des espèces chimiques capables de renseigner l'environnement cellulaire. L'équipe du Pr. Sophie Vriz a donc essayé de confronter les vagues apoptotiques avec la survenue des EAO. Cette équipe a pu montrer qu'un *burst* oxydatif régulé dans l'espace a lieu à la lisière de la seconde vague apoptotique [29] ; sans toutefois avoir pu fermement lier les deux évènements. Néanmoins, il est tentant de les associer selon une relation de cause à effet puisque les EAO sont capables de déclencher l'apoptose [27].

De surcroît, indépendamment de cela, les *xénopes* qui sont réputés pour régénérer leur queue, semblent également adopter une signalisation oxydative pour amorcer la mécanique régénératrice. Un screening d'expression génique a permis de mettre en évidence une

augmentation de l'expression de la machinerie cellulaire responsable de la synthèse des EAO et ce, suite à la résection de la queue. Pour vérifier que cet évènement était bien suivi par l'apparition d'EAO, les auteurs ont utilisé une technique de senseur fluorescent de l' H_2O_2 ¹². Le rapporteur utilisé fut *transduit* dans l'embryon pour qu'il s'exprime de manière ubiquitaire dans l'organisme en développement. L'expérience a montré l'apparition d'une explosion quantitative d' H_2O_2 à partir de 6 heures après section caudale fut suivie d'une régénération de l'extrémité caudale de la bête (Figure 8). De manière plus significative, lorsque l'apparition de l' H_2O_2 est bloquée pharmacologiquement, la queue du poisson après section ne peut que former un moignon [30]. Au vu des résultats, il est hautement probable que l' H_2O_2 , du moins la survenue massive de cette espèce chimique, soit un élément mécanique de la régénération ; d'autant plus qu'il a été observé que cette apparition est antérieure à l'arrivée des cellules inflammatoires, ce qui signifierait que le phénomène soit indépendant de la détersion de la plaie donc de l'inflammation [30].

Par contre, cette étude n'a pas approfondi la question de la *mort cellulaire régénératrice* ; les auteurs se sont arrêtés à démontrer l'implication d'explosion oxydative dans la régénération du xénope sans aller rechercher une mort cellulaire consécutive.

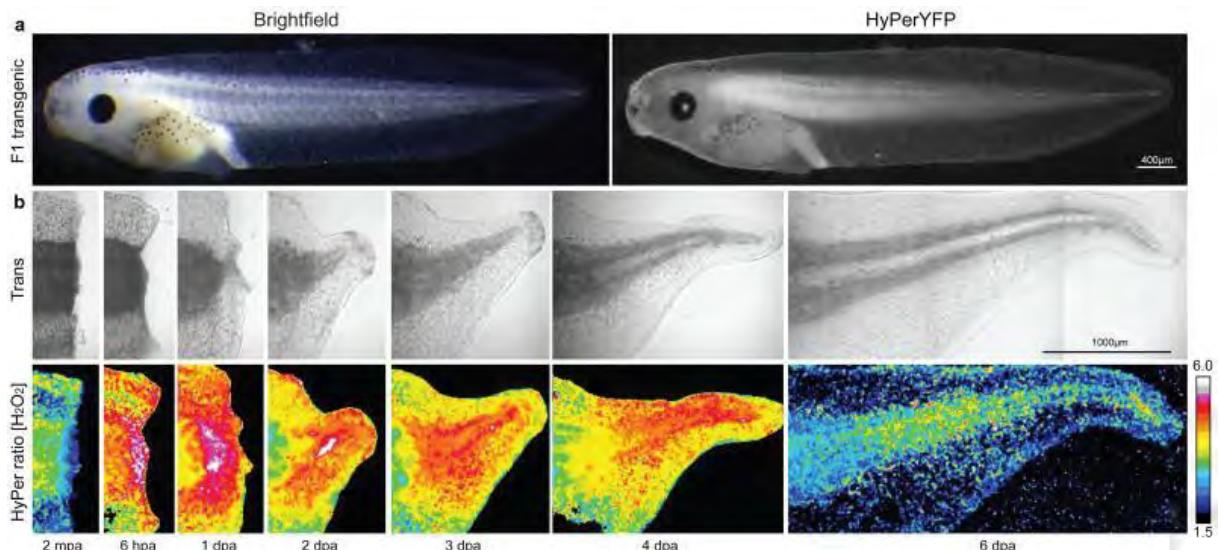


Figure 8 : Une explosion oxydative semble préalable à la régénération chez la larve du xénope. [30]

¹² La technique dénommée de *HyPer* utilise un senseur bactérien *OxyR*, sensible à l' H_2O_2 , fusionné à la *YFP*. Lorsque l'*OxyR* est, en quelque sorte oxydé, un changement « conformationnel » se crée entraînant une augmentation de l'émission de la *YFP* vers des longueurs d'onde de 500nm.

Pour renforcer, l'hypothèse que les EAO jouent un rôle moteur dans la régénération, nous pouvons nous rapporter à l'image suivante dans laquelle nous pouvons apprécier l'apparition strictement contrôlée d'EAO chez l'hydre après résection de l'extrémité apicale :

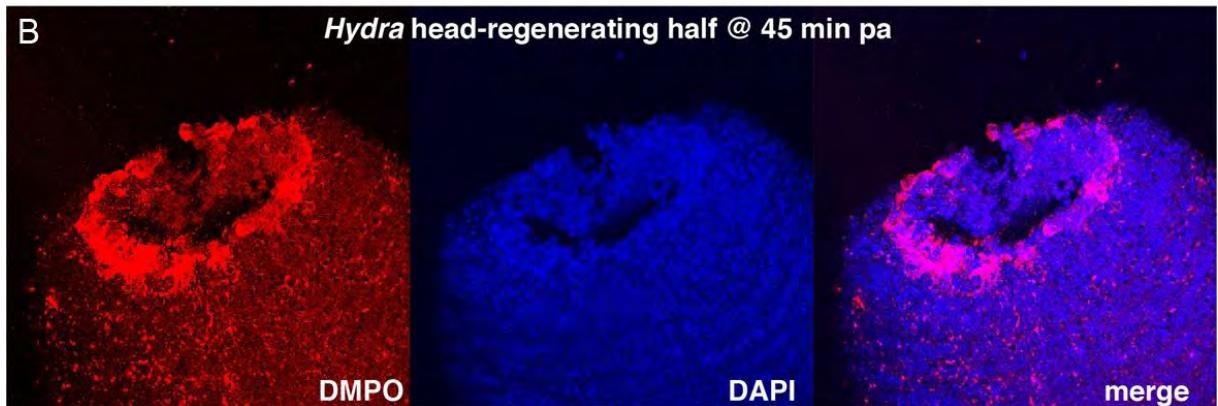


Figure 9 : Les EAO sont retrouvées uniquement au lieu de la blessure chez l'hydre. [23]

Le DMPO permet de visualiser indirectement les radicaux oxygénés.

Lorsque nous récapitulons toutes les observations recueillies jusqu'à présent, il apparaît avec force que la régénération dépend de phénomènes massifs de morts cellulaires programmées. En outre, ces phénomènes semblent être commandés par des explosions oxydatives.

De manière intéressante, ces morts cellulaires suivies de prolifération s'observent chez les mammifères mais également, chez l'Homme.

Nous savons que le renouvellement tissulaire fait appel à l'apoptose pour se débarrasser des cellules épuisées. En effet, une cellule sénescante entre en apoptose et sera remplacée par une cellule nouvelle issue de la cellule souche du tissu en question. Aussi, il est indispensable de remarquer que les cellules sénescantes entrent bien en apoptose et ne meurent absolument pas de nécrose. Si tel était le cas, ceci entraînerait une inflammation qui conduirait à une cicatrisation. En fait, les corps apoptotiques issus de la mort de cellules seront captés par les macrophages environnants qui répondront par l'établissement d'un environnement anti-inflammatoire, si ce n'est immunosupresseur [31]. De fait, les cellules souches peuvent proliférer, se différencier et enfin, remplacer les cellules manquantes sans être inquiétées par l'activité protectrice du système immunitaire.

Récemment, une équipe sino-américaine a découvert un phénomène qu'elle dénomma le *Phoenix Rising Pathway*. Dans cette étude, il fut montré que les cellules mésenchymateuses

proliféraient subséquemment après des phénomènes d'apoptose¹³. La prolifération est, en fait, stimulée par la sécrétion de la *prostaglandine E2* (Figure 10). Ici, la cascade signalétique de l'apoptose concourt directement à la sécrétion d'une entité proliférative [32].

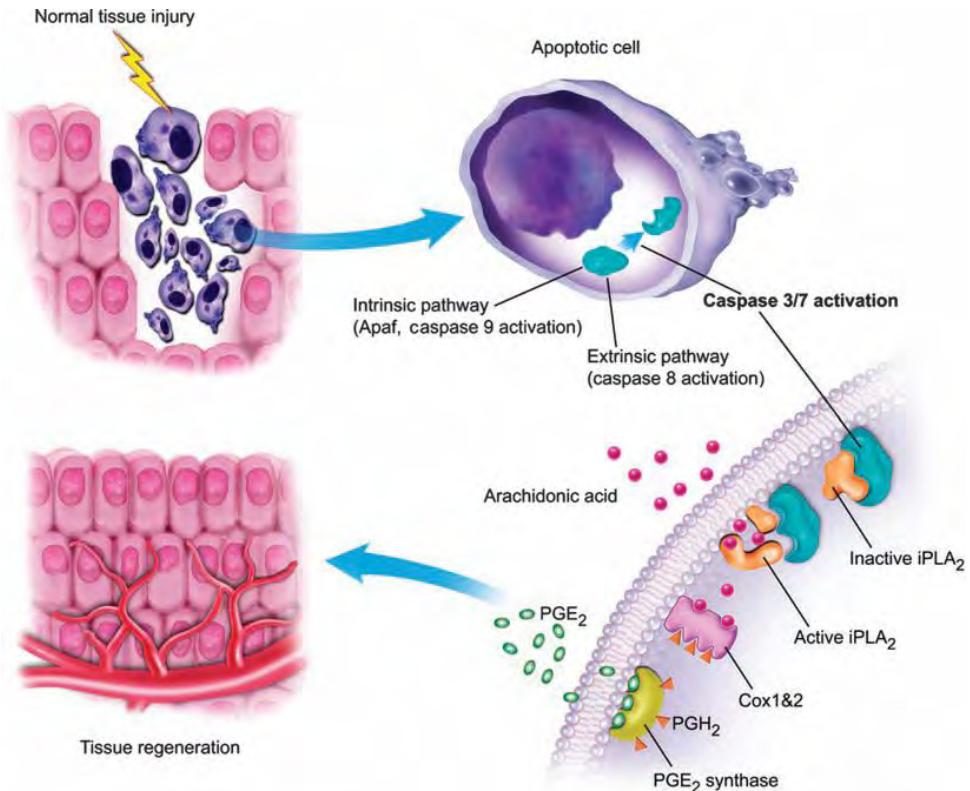


Figure 10 : L'apoptose stimule la prolifération par l'intermédiaire de la PGE₂ chez l'espèce murine. [32]

Toutes ces manipulations et leurs conclusions ne sont pas sans rappeler un phénomène rapporté par des radiologues ; phénomène dénommé *altruistic cell death*. En effet, lors de l'irradiation de mélanomes, il a été remarqué que par évènements consécutifs les cellules adjacentes de la tumeur rentraient en prolifération [33]. Chez l'Homme également, l'apoptose semble suivie de prolifération.

L'apoptose est un prérequis pour la régénération chez les animaux régénératifs. L'apoptose propose une prolifération chez les mammifères. Tout porte à croire que l'organisme pour se réparer suit le mythe du Phoenix. Outre ses vertus *homéostasiques*, morphogéniques,

¹³ La nature des cellules supportant l'apoptose reste non expliquée.

développementaux et immunitaires, l'apoptose semble également détenir un rôle éminent dans la régénération.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que la régénération semble se développer dans un environnement immunotolérant. Nous découvrons à présent que le lieu de la régénération connaît des « explosions » apoptotiques. Pourrait-il avoir un lien entre les deux phénomènes ? En effet, nous avons vu qu'une des conséquences de l'apoptose est la sécrétion de PGE₂. De manière intéressante, cette entité est la seule de la famille des prostaglandines qui peut, selon les circonstances, détenir des propriétés immunsuppressives [34]. En outre, lorsque les macrophages captent les corps apoptotiques, ils adoptent un phénotype régulateur capable de recruter des lymphocytes T régulateurs [35]. Les lymphocytes T régulateurs sont les cellules effectrices de l'immunsuppression et/ou de l'immunotolérance.

Finalement, il n'est donc pas insensé de penser que l'apoptose induit une immunotolérance – si nécessaire – locale qui permet l'acceptation de la dédifférenciation et de la prolifération cellulaire, mécanismes par lesquels les animaux peuvent régénérer.

Intégrons cette hypothèse dans un schéma (Figure 11) :

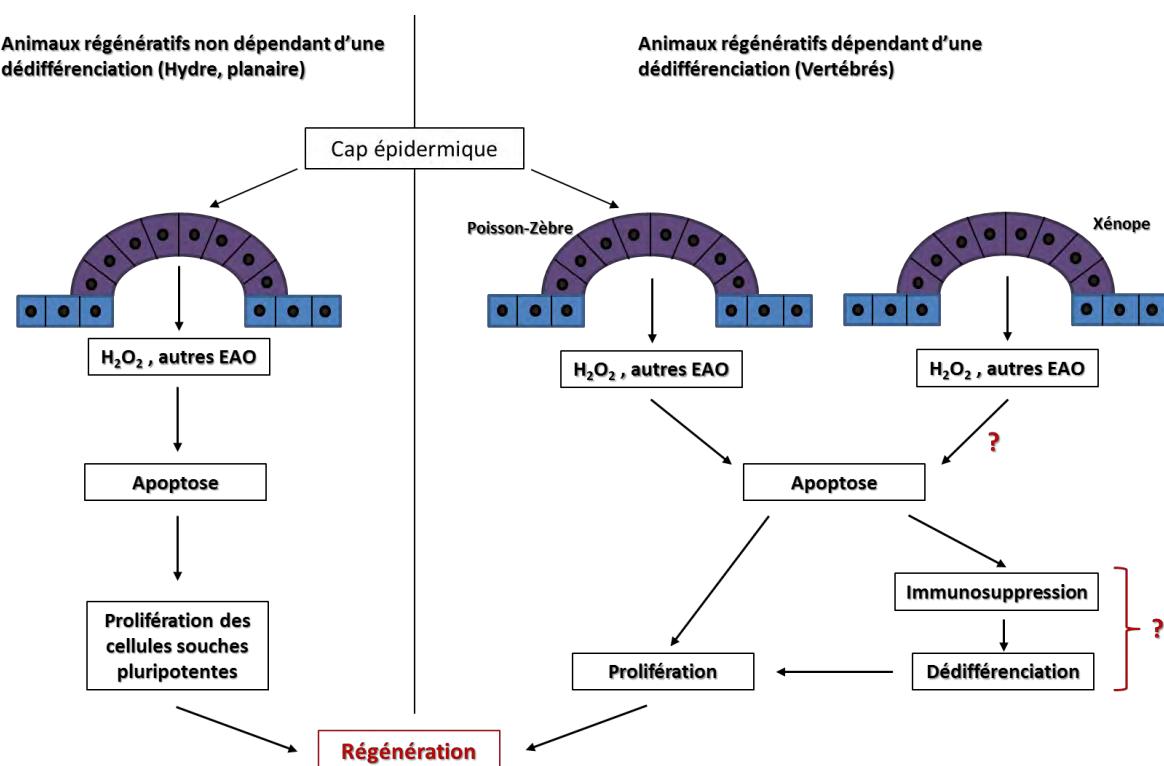


Figure 11 : Corrélation hypothétique entre EAO, apoptose et régénération.

La mise en commun des particularités biologiques du processus de régénération semble rappeler fortement la morphogenèse développementale.

En effet, l'apoptose conditionne, lors de la morphogenèse, l'architecture tissulaire des membres en développement¹⁴ [36]. En quelque sorte, l'apoptose guide la forme finale et renseigne sur les zones à modeler. Ce constat pourrait être transposé sur la régénération. Une apoptose régulée dans l'espace peut renseigner sur le lieu qui doit être suppléé et les différentes vagues conditionneraient un remodelage du membre ou du tissu en formation.

Cependant, à l'inverse de la morphogenèse développementale, la régénération se produit dans un milieu surveillé par un système immunitaire relativement compétent. Une prolifération massive et une différenciation tardive pourraient être considérées comme attentatoires à l'intégrité de l'organisme par les cellules immunes. L'apoptose, par les signaux qu'elle envoie et plus précisément, par l'efférocytose subséquente, conditionnerait un environnement immunosuppresseur/immunotolérant capable d'accepter une prolifération massive et des événements de différenciation façonnant le phénotype cellulaire. Cette immunosuppression pourrait rappeler l'environnement stérile placentaire dans lequel se développe l'embryon puis le fœtus.

Quelles seraient les conséquences si nous pouvons provoquer tous ces mécanismes chez les mammifères ?

Assisterons-nous à une régénération ?

La seconde stratégie de médecine « régénérative » mise en place lors de ce travail de doctorat – qui vous sera présentée dans l'étude expérimentale de ce présent manuscrit (Partie II, V) – avait comme ligne directrice, la question sus-posée.

¹⁴ Nous pouvons émettre la même idée des réseaux neuronaux ou d'autres tissus.

B- De la cicatrisation

Bien que moins fantasmée que son éminente sœur régénératrice, la cicatrisation a néanmoins joué un rôle capital dans l'histoire de l'évolution.

Sa rapidité d'exécution, son efficacité pour restaurer une barrière étanche entre le milieu extérieur, par définition hostile, et le milieu intérieur, dont la qualité stérile maintient scrupuleusement l'équilibre physiologique, font de la cicatrisation un formidable outil pour l'adaptation des espèces à leur environnement.

Malheureusement, l'efficacité se fait souvent au détriment de la qualité en ceci que la cicatrice est en l'espèce non vivante au sens physiologique du terme, c'est-à-dire que le tissu ou l'organe frappé du sceau cicatriciel perd le plus souvent une partie de sa fonction. L'inviolabilité de l'organisme serait-elle plus impérieuse que son fonctionnement ?

1- Des mécanismes de la cicatrisation

Dans ce paragraphe, les mécanismes décrits seront empruntés à la mécanique de la cicatrisation de la peau. Toutefois, ces processus seront aisément transposables à la majorité des cicatrisations tissulaires à l'exception du tissu hépatique qui, dans certaines proportions, régénère.

Le but de ce chapitre n'est aucunement de décrire le rôle de chaque cytokine, de chaque facteur protéique, fussent-ils de croissance, ou de chaque type cellulaire qui entrent en jeu dans les phases cicatricielles ; de nombreuses revues ont été rédigées pour qui souhaite approfondir le rôle spécifique d'une entité biologique donnée dans la cicatrisation [37] [38] [39] [40] [41].

Il s'agit en l'espèce de donner une vue d'ensemble du processus cicatriciel et de le replacer dans une cinétique temporelle afin de percevoir les mécanismes qui seraient judicieux d'influencer pour améliorer le devenir cicatriciel ou d'orienter la cicatrisation vers une mécanique régénératrice. En outre, le processus de cicatrisation sera abordé le plus souvent sous un angle immunologique ; le système immunitaire, nous le verrons dans les pages suivantes, détient effectivement une place prépondérante dans la cicatrisation. En définitive, le paragraphe sera une vue, somme toute, personnelle du phénomène puisque certains éléments regroupés dans la description à venir seront tirés de scientifiques issus de différents domaines dans le souci de résigner la physiologie de la cicatrisation dans une globalité biologique.

Le phénomène cicatririel chez les mammifères peut se décomposer en quatre phases dynamiques qui se chevauchent dans le temps (Figure 12) :

- L'hémostase ;
- L'inflammation de l'immunité de type Th1 ;
- La formation d'un nouveau tissu ;
- La phase de remodelage matriciel.

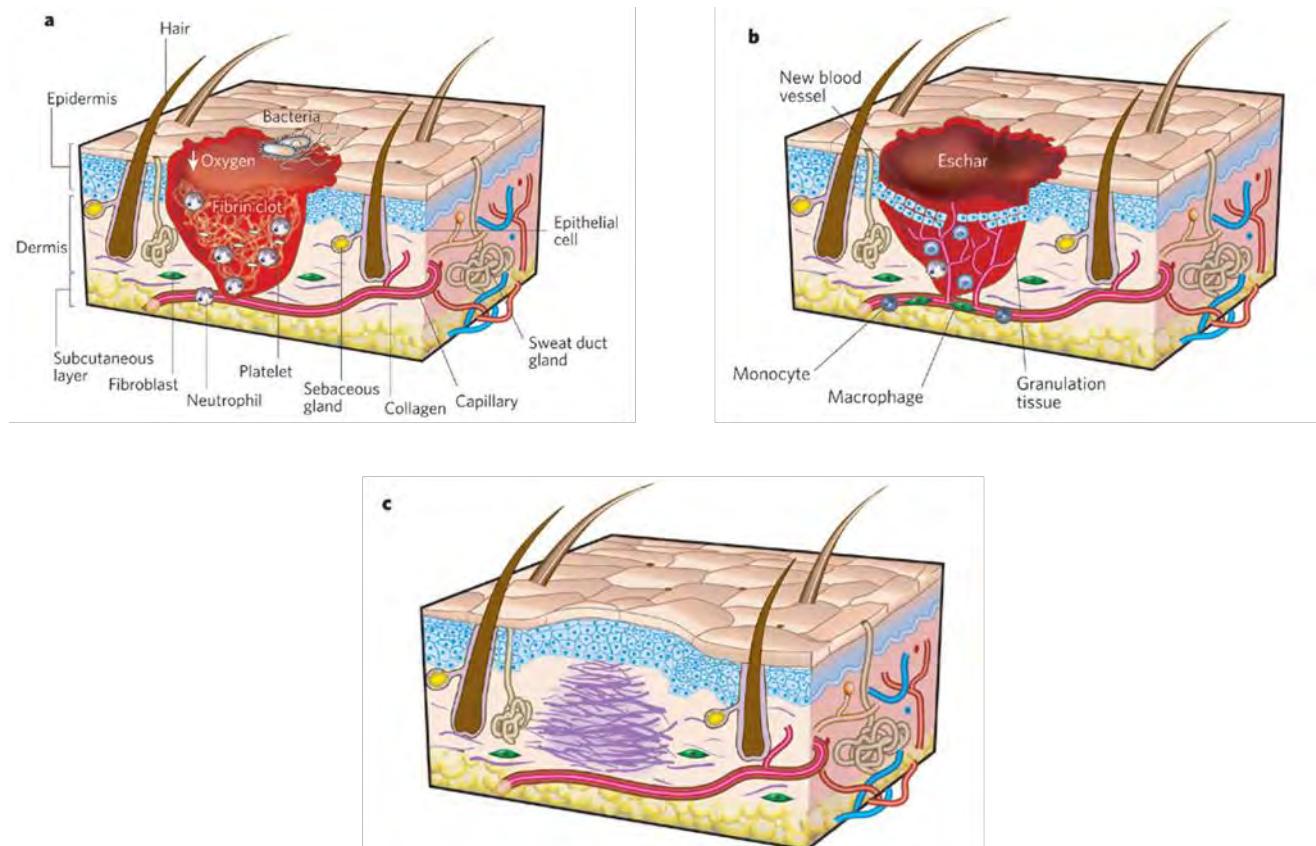


Figure 12 : La cicatrisation cutanée selon la doctrine prédominante. [41]

a, Inflammation. Après la formation du caillot de fibrine, les cellules de l'immunité innée débarrassent la blessure des tissus détruits et limitent l'entrée de pathogènes. **b, Tissu de granulation.** Un nouveau tissu se constitue 48 heures après la lésion. Les processus de *réépithérialisation* et d'angiogenèse s'initient sous l'impulsion des facteurs *cytokiniques* et protéiques en présence. Les fibroblastes stimulés par les macrophages contractent la blessure et sécrètent la matrice extracellulaire. **c, Remodelage tissulaire.** Lors de cette phase, tous les processus mis en place auparavant cessent. Les fibroblastes et les macrophages entrent en apoptose laissant une masse acellulaire composée majoritairement de collagène de type I.

Le schéma récapitulatif précédent reste le modèle prédominant proposé à l'étude et à l'enseignement universitaire. Tenant très peu compte de l'immunité, il laisse sous silence certains mécanismes qui, bien décodés, seraient, ce me semble, d'une aide inestimable dans la

mise en place de thérapeutiques efficaces pour la prise en charge des blessures, des pathologies cicatricielles et fibrotiques.

Afin de restaurer toute la place que l'immunité mérite, la description de la cicatrisation qui va suivre, sera réalisée à l'aide d'un nouveau schème. La cicatrisation sera décrite, comme l'usage le souhaite, selon quatre phases. En revanche, il sera proposé uniquement des phases immunologiques :

- L'hémostase (a) ;
- L'inflammation de l'immunité de type Th1 (b) ;
- La phase cicatricielle ou fibrotique, phase d'immunité de type Th2 (c) ;
- La phase de résolution, phase immunosuppressive (d).

Chaque phase a une importance primordiale car la précédente conditionne le bon déroulement de la phase suivante en ceci qu'une altération de la précédente retentit soit favorablement ou négativement sur la suivante. La dynamique cicatricielle est un phénomène particulièrement instable dont le fonctionnement doit être finement régulé.

Considérant que la régénération commence par une étape cicatricielle furtive, les premières étapes mécanistiques peuvent être estimées comme communes entre les deux processus réparateurs. A cet égard, l'hémostase sera survolée tandis que les autres étapes seront aisément décrites d'un point de vue singulier mais toujours dans un souci de globalité.

a. L'hémostase

Une blessure, à l'exception de légères égratignures, entraînera une brèche vasculaire. En retour, l'organisme endommagé déclenchera les mécanismes de coagulation ayant comme finalité, la constitution du caillot de fibrine. Le caillot, de manière singulière, servira d'échafaud pour guider l'arrivée des leucocytes et la migration des cellules épithéliales en prolifération ; en effet, la composition particulière du caillot, faite en l'occurrence de fibronectine et thrombospondine, permettra l'adhérence ainsi que la mobilité nécessaire aux cellules immunes pour remplir leur rôle sur la zone lésée [41]. De surcroît, le caillot constituera un véritable piège pour un ensemble de facteurs de croissance libérés sur le site lésionnel. Outre le maintien du liquide sanguin dans les vaisseaux, l'hémostase, à la lumière des descriptions précédentes, concourt à l'initiation de la cicatrisation en attirant et en guidant

les cellules immunes et également, en favorisant la migration des cellules épithéliales. L'hémostase est ainsi véritablement le point d'initiation de la cicatrisation ; de surcroît, le caillot de fibrine sera l'ébauche du tissu de granulation, tissu de régénération qui guidera l'agencement de la cicatrice. Sans phénomènes hémostatiques, il serait très probable que la cicatrisation ne se fasse point ou du moins, soit grandement altérée.

b. L'inflammation

L'inflammation – allègrement décrite en littérature – conditionne la cicatrisation dans son ensemble. Stoppée trop précocement, l'organisme sera livré en pâture aux pathogènes extérieurs. Exagérée, l'organisme répondra par une cicatrisation abondante attentatoire, s'il en est, à la poursuite de la vie. Prolongée indéfiniment, la blessure ne guérira, si je puis dire, jamais.

L'inflammation a pour rôle d'éliminer de la zone meurtrie les pathogènes qui auraient pu la coloniser et, concourt à l'ablution locale des débris cellulaires et tissulaires, produits de l'agression.

Ce rôle d'éliminateur est dévolu aux leucocytes de l'immunité innée, en particulier, les neutrophiles et les macrophages.

Les modifications tissulaires locales pourvoyeuses de chimio-attractants, les facteurs sécrétés par les tissus en souffrance ainsi que par les plaquettes permettent, dans un premier temps, le recrutement des polynucléaires neutrophiles. Armés de leurs NADPH oxydases, les neutrophiles vont véritablement épurer la zone à l'aide d'espèces actives de l'oxygène. Ces EAO sont des entités biochimiques responsables, pour partie, de la détersio et de l'asepsie de la blessure. Cette étape réalisée, poussés par les cytokines et facteurs pro-inflammatoires, les macrophages résidents ainsi que les macrophages issus de monocytes circulants¹⁵ vont phagocytter les débris cellulaires, tissulaires ainsi que, étape éminemment cruciale pour les évènements à venir, les neutrophiles qui auront péri sous leurs actions létales.

Il est lieu de remarquer que la mort cellulaire des neutrophiles ayant accompli leur tâche est particulière. En effet, ces leucocytes sont emportés par l'apoptose, mort programmée, qui influence substantiellement la réponse immunitaire. Les macrophages phagocytant les corps

¹⁵ A noter que de nombreuses interrogations perdurent quant à l'origine des macrophages retrouvés sur un site inflammatoire.

apoptotiques par des phénomènes d'efférocytose changent quasi-instantanément de phénotype [42].

Lors de l'inflammation proprement dite, les macrophages résidents ou les monocytes différenciés vont adopter un phénotype dit de type 1. Ledit phénotype est caractérisé par des macrophages capables de sécrétions d'espèces actives et pourvoyeurs de cytokines pro-inflammatoires. Ils permettent en partie de finir la détersión initiée par les polynucléaires, de recruter d'autres partenaires leucocytaires mais également d'entretenir, si nécessaire, l'état inflammatoire. En revanche, lorsque survient les phénomènes d'efférocytose, le macrophage ayant ingurgité les corps apoptotiques dérivent vers un phénotype de type 2a, ou pour être plus précis et au plus près des récentes découvertes en la matière, de type cicatrisant [43]. Ce type *macrophagique* cicatrisant, comme sa dénomination l'indique, va projeter la mécanique de cicatrisation, à présent bien avancée, vers la phase suivante de réparation.

Bien que l'efférocytose soit nécessaire, elle ne semble pas suffisante pour orienter définitivement le phénotype du macrophage. En effet, un macrophage de type 1 n'est pas un « phagocyte » parfaitement compétent et une aide tissulaire est essentielle pour sa conversion vers une cellule immune cicatrisante. Cela étant, cette conversion phénotypique permet de proposer le macrophage comme chef d'orchestre de la phase suivante, la phase cicatricielle.

Bien que non mentionnés, les lymphocytes sont présents au niveau de la plaie. En premier lieu, sont retrouvés les lymphocytes, que nous pourrions qualifier de résidents tels que les *lymphocytes T $\gamma\delta$* et les *Natural killer* [44]. Outre leur rôle cytotoxique, ils peuvent servir de senseurs de l'intégrité tissulaire et en retour, sécréter les cytokines pro-inflammatoires entretenant l'inflammation et recrutant les neutrophiles et les monocytes « dormants » de la circulation.

Les autres lymphocytes qui sont susceptibles d'être rencontrés sur le lieu inflammatoire sont les lymphocytes T. Leur apparition reste cependant plus tardive que les autres types cellulaires. Leur action devient pertinente lorsque des pathogènes ont pénétré la zone et que l'action détergente des neutrophiles et macrophages est insuffisante. Ils auront alors pour rôle de détruire les cellules infectées. Leur présence en nombre resterait cependant de mauvais pronostic pour les processus cicatriciels à venir puisque elle signifierait une inflammation relativement prolongée.

Après avoir rappelé la composante cellulaire de l'inflammation de type Th1, attardons nous un instant sur un des effets, encore trop souvent passé sous silence, des cytokines pro-

inflammatoires. Nous savons que ces peptides, différents des hormones en ceci que leur action reste principalement locale, sont capables d'activer les cellules immunitaires vers un phénotype inflammatoire, de recruter les leucocytes de la circulation sanguine et de maintenir l'état inflammatoire de la zone lorsque ceci est nécessaire. En outre, leur présence concorde avec des phénomènes prolifératifs ; en particulier, l'*interleukine 6* et le *tumor necrosis factor- α* . De manière singulière, ces deux cytokines semblent indispensables dans la réparation des tissus hépatiques et musculaires. Dans les tissus hépatiques par exemple, le TNF α stimule la sécrétion d'IL-6 par les cellules de *Küppfer* [45]. L'effet subséquent de l'*interleukine 6* est une prolifération des hépatocytes, effet qui sera suppléé par l'action de facteurs de croissance sécrétés conséquemment après l'initiation inflammatoire. Ce phénomène initiateur peut être aisément transposé dans l'ensemble des phénomènes cicatrisants [46]. De manière surprenante, dans des modèles de souris invalidées pour le gène de l'*interleukine 6*, ayant subi une perforation cutanée, la prolifération des kératinocytes est fortement altérée et retardée, entraînant une cicatrisation qui s'étale dans le temps [47]. Plus étonnant encore, l'absence d'IL-6 altère la formation du tissu de granulation, tissu servant de trame pour la colonisation de la zone par les fibroblastes et la sécrétion de matrice extracellulaire constitutive de la cicatrice [40].

Tous ces résultats semblent suggérer que l'inflammation de type Th1 par l'intermédiaire des cytokines inflammatoires détient le rôle initiateur de la prolifération des cellules parenchymateuses – cellules assurant la fonction de l'organe ou du tissu en question – ainsi que des mécanismes de la mise en place du tissu de granulation. En revanche, la sécrétion doit être finement régulée dans le temps puisqu'une inflammation prolongée débouche sur un dépôt de matrice *collagénique* abondant [48].

L'inflammation est souvent traitée de façon à mettre en avant ces propriétés détergente et destructive. Malheureusement, cela reviendrait à mettre sous scellé sa propension à enclencher une prolifération cellulaire ; de surcroît, les vestiges de son passage ne restent pas sans effet en ceci que les débris qu'elle engendre, permettent de communiquer aux cellules environnantes, macrophages en tête, que celle-ci est terminée et donc par conséquent, que les dégâts se doivent d'être réparer.

c. La phase cicatricielle ou fibrotique

L'inflammation a été traitée, pour partie, de manière conventionnelle. Toutefois, la description précédente a pointé l'action proliférative, souvent éludée, des cytokines pro-inflammatoires. Cette action, nous le verrons plus tard, sera mise à profit dans l'élaboration d'une médecine « régénérative ».

La troisième phase de cicatrisation, qui va vous être proposée, sera traitée de manière inhabituelle. Il ne s'agira pas de décrire, de manière linéaire, la constitution du tissu de granulation et la constitution de la cicatrice mais de comprendre le rôle du système immunitaire dans la cicatrisation. Arrivé à l'orée de l'inflammation, de nombreux changements vont s'opérer ; ces changements, nous le décrirons, seront impulsés par le système immunitaire.

Il est communément reconnu qu'après la détersión de la lésion, nous assistons à la formation d'un nouveau tissu sous l'impulsion de facteurs de croissance, en particulier, sous l'impulsion du VEGF, du FGF2 et du PDGF [41]. Conséquemment, l'organisme déclenchera les mécanismes biologiques responsables du dépôt matriciel constitutif de la cicatrice. Seulement, cette théorie reste quelque peu imparfaite car elle n'explique pas comment les acteurs tissulaires perçoivent les signaux déclenchant le dépôt de matrice. En effet, il est souvent décrit que le *Transforming Growth Factor bêta 1*, sécrété par des macrophages de type 2, participe à l'activation des fibroblastes en *myofibroblastes*, acteurs pourvoyeurs de collagène I [49]. En revanche, elle laisse sous silence la cause de l'apparition des macrophages de type 2 et du TGF- β 1, cytokine anti-inflammatoire¹⁶ et pro-fibrosante.

La compréhension de cette apparition nous est inopinément venue d'équipes spécialistes des pathologies immunitaires. Il a été démontré que l'immunité responsable de la réparation est l'immunité de type Th2 [50]. Nous allons donc voir dans ce paragraphe comment l'immunité de type Th2 peut intervenir dans la formation de la cicatrice.

Suite à l'inflammation, une brèche « aseptisée » est observée. Celle-ci, comme précitée, verra la formation d'un tissu de granulation apparaître en son centre. Le tissu de granulation peut être assimilé à un véritable tissu de régénération en ce sens qu'il est composé par la réépithérialisation de la blessure, par la présence de vaisseaux fraîchement formés, d'une

¹⁶ Anti-inflammation de type Th1

matrice extracellulaire jeune dont les composants rappellent la matrice extracellulaire observée chez le fœtus et enfin, par la réappropriation de la zone par les fibroblastes [51]. Si l'acte cicatriciel s'en tenait à cette apparition et qu'il ne connaissait qu'un léger réarrangement, on assisterait vraisemblablement à un linéament de régénération. Malheureusement, un tissu en souffrance, pour ainsi dire épuré, va déclencher une réponse épithéliale. Les cellules épithéliales ainsi activées vont sécréter des signaux peptiques tels que l'IL-25, l'IL-33, principalement des cytokines, qui vont orienter la réponse immunitaire vers un versant Th2 (Figure 13). En effet, les épithéliums vont stimuler de multiples composantes de l'immunité innée qui, en retour, vont répandre dans le milieu intérieur, deux cytokines immanentes à l'immunité de type Th2, l'*interleukine 4* et l'*interleukine 13*. Sous l'action de l'IL-4, les macrophages vont commencer leur conversion phénotypique¹⁷ et présenter les récepteurs *scavengers* caractéristiques de leur pouvoir phagocytaire. Le processus d'efférocytose va pouvoir débuter.

L'ingestion des corps apoptotiques par les macrophages sensibilisés aux cytokines de type Th2, va finaliser leur mutation phénotypique vers le profil cicatrisant. Cet état macrophagique est, en autre, caractérisé par une sécrétion accrue de *Transforming Growth Factor beta 1*. Le TGF- β 1 est connu, dans le processus de cicatrisation, pour son action activatrice sur les fibroblastes. Les fibroblastes ainsi stimulés, se convertiront en *myofibroblastes*, cellules mésenchymateuses contractiles et grandes pourvoyeuses de matrice extracellulaire. Leur rôle sera en premier lieu, de rapprocher les berges de la plaie – phénomène connu sous le terme de *contraction* – pour faciliter la fermeture de la brèche par les kératinocytes. En second lieu, les myofibroblastes vont sécréter des quantités abondantes de matrice extracellulaire, en particulier de collagène I. Cette mécanique est le processus de cicatrisation *stricto sensu* soit, précisément, une contraction de la blessure et un dépôt de matrice constitutif de la cicatrice.

Cette étape de la cicatrisation sus-décrise est bel et bien un phénomène immunologique. Par opposition à la phase inflammatoire gouvernée par des cytokines de type Th1, la phase subséquente est une « inflammation » de type Th2 en ceci que la réponse mise en place est similaire à celle observée lors de l'invasion de l'organisme par des corps étrangers de grande taille incapables de pénétrer les cellules [52]. Lors de l'infection de l'hôte par un parasite, la réponse inflammatoire est rapidement éteinte car jugée par l'organisme, inopérante. En lieu et place de l'inflammation, on retrouve l'activation d'une immunité de type Th2 par les

¹⁷ L'origine des macrophages reste toujours incertaine.

interleukines 4 et 13. Le parasite ayant pénétré les tissus va être, au lieu d'être détruit, asphyxié par la constitution d'un granulome. Ce granulome n'est rien d'autre qu'une sorte de « cocon » fibrotique dont le but est d'enfermer le parasite et par conséquent, le priver des nutriments nécessaires à sa survie. La menace devient finalement caduque.

Par analogie, ce même phénomène s'apprécie durant la cicatrisation. En effet, l'inflammation participe à la désinfection de la plaie ; en revanche, lorsque son action contrevient à la fermeture de la plaie, l'immunité de type Th2 substitue la phase inflammatoire pour combler la brèche jusqu'à obstruction complète. Dès que la brèche est remplie de matrice, il convient de conjurer le dépôt matriciel sous peine d'évoluer vers une fibrose, qui serait néfaste pour le fonctionnement du tissu ou de l'organe en question. Le rôle de la dernière phase de la cicatrisation sera donc, au vu des mécanismes précédents, l'extinction des signaux immunologiques courant à la formation de la cicatrice.

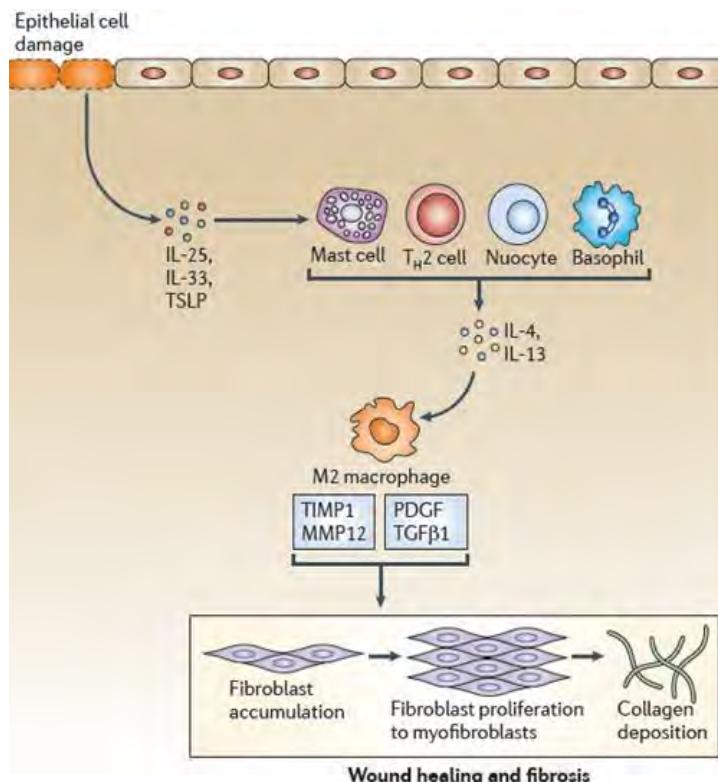


Figure 13 : Mise en œuvre de l'immunité de type Th2 responsable de la réaction fibrotique de la cicatrisation. (d'après Wynn TA, [42])

A présent que nous avons en tête que le dépôt de matrice est lié à une action immunologique, il est possible d'imaginer qu'une immunosuppression pourrait aisément stopper la réaction de cicatrisation. Cependant, les immunosupresseurs que nous possédons en pharmacopée ne se sont révélés que très partiellement efficaces [53]. L'immunosuppression est-elle suffisante ?

Existe-t-il un phénomène biologique mieux adapté pour supprimer l'immunité sur un lieu et dans un temps donnés ?

d. La phase de résolution ou immunosuppressive

Les myofibroblastes contractiles ayant terminé leur sécrétion de composante fibreuse entrent, pour partie, en apoptose [54]. L'évènement apoptotique se produit en présence de macrophages de type 2 qui détiennent la caractéristique de présenter des récepteurs *scavengers* à leur surface. Par l'intermédiaire de ces récepteurs éboueurs, les macrophages vont pouvoir capter les corps apoptotiques en formation et les phagocytter. Toutefois, le signal phagocytaire n'est pas suffisant pour induire, ce qui devrait être, une conversion phénotypique ; d'autant plus que, nous l'avons vu, le signal apoptotique propose un phénotype de type cicatrisant chez le macrophage. Cependant, ici, l'intégration apoptotique se produit non plus dans un environnement en dégradation – comme cela avait pu être le cas lors de l'inflammation – mais lors de la reconstitution d'une matrice extracellulaire. A l'instar des hormones, des cytokines et autres entités libres, les composants de la matrice sont de prodigieux messagers cellulaires, capables de renseigner sur les tensions exercées dans les tissus [55].

Cadre n°1 : A titre d'exemple de l'importance de la signalisation matricielle en cicatrisation, nous pouvons citer les travaux de l'équipe du Pr. Longaker de Stanford dans lesquels le Pr. Gurtner démontre que les tensions exercées lors des blessures sont capables d'orienter le devenir cicatriciel ; l'application d'un stress de tension à l'opposé de la tension physiologique observée lors de la cicatrisation, semble induire une amélioration de la cicatrisation considérant l'observation d'une surface cicatricielle réduite, d'une moindre expression d'alpha SMA et d'une plus grande densité vasculaire. [56]

Il est pertinent de penser que la constitution d'une matrice complète avec l'apparition de *protéoglycannes* de haut poids moléculaire et un réseau de collagène consolidé, puisse renseigner la composante immunitaire. En particulier, la fonction de l'acide hyaluronique reste à éclaircir. Il a été montré, lors de l'inflammation, que la présence d'acide hyaluronique de faible poids moléculaire stimulait la production de cytokines inflammatoires, à l'instar du LPS, par liaison aux *Toll Like Receptors* ou au *cluster of differentiation 44* [55]. Si le morcellement de ce *protéoglycanne* est susceptible de signaler aux cellules un environnement en souffrance alors son opposée, la réunification, doit en être capable également.

On peut penser que, outre une signalisation à l’interleukine 10, acteur démontré de la conversion phénotypique vers un macrophage régulateur, une ingestion de corps apoptotiques concomitantes avec la signalisation d’une matrice extracellulaire complète puisse convertir les macrophages vers un phénotype régulateur immunosupresseur. L’immunosuppression supportée par ces macrophages pourrait alors stopper l’immunité de type Th2 de la phase cicatricielle ; ainsi, la constitution de la cicatrice serait terminée. Ce scénario serait hautement probable en ce sens que la phagocytose des corps apoptotiques est décrite comme influençant une permutation phénotypique et que la signalisation induite par la matrice extracellulaire est connue [57] [55]. De surcroît, l’état de la matrice est la seule pertinente pour renseigner sur l’état d’avancement de la cicatrisation. Nonobstant, ce mécanisme n’a encore jamais été démontré fermement. Des études expérimentales tentant d’explorer le rôle de la matrice seraient nécessaires.

La précédente hypothèse n’étant pas admise, le mécanisme généralement décrit en fin de cicatrisation est une phase dite de remodelage. Le remodelage est un processus de très long terme qui, par le jeu de *métalloprotéases* et de leurs inhibiteurs, réorganise la matrice extracellulaire abondamment déposée lors du processus antérieur. Cette mécanique, pouvant durer des années, ne permettrait cependant pas d’expliquer comment la réaction de cicatrisation pourrait être arrêtée. Qui plus est, le remodelage s’apparente étrangement au renouvellement tissulaire. En effet, chaque tissu est sujet à un renouvellement tissulaire. Ledit renouvellement permet de maintenir l’homéostasie en remplaçant les cellules et une matrice vieillissantes, ce qui permet à l’organe ou aux tissus de continuer à fonctionner normalement. Lors du renouvellement tissulaire, deux entités biologiques jouent un rôle déterminant : les cellules « souches » adultes et les fibroblastes. Les cellules « souches » adultes sont des cellules de la même origine que les cellules qu’elles doivent suppléer ; douées d’*autorenouvellement*, elles restent quiescentes dans leur « niche » respective lorsque les signaux *ad hoc* ne les ont pas stimulées [58] [59]. Toutefois, lorsque des signaux cellulaires de « souffrance » viennent les stimuler, les cellules « souches » vont proliférer, se différencier et remplacer les cellules à suppléer.

La cellule conjonctive, par excellence, le fibroblaste joue un rôle également déterminant. Les fibroblastes plus ou moins immatures, remplaceront les fibroblastes sénescents et sécreront une matrice jeune qui rendra la souplesse, l’élasticité ou la dureté du tissu renouvelé [60]. Il est important de remarquer que ce qui semble différencier le remodelage du renouvellement est l’intensité du phénomène, intensité qui s’essouffle avec le temps. Pour mesurer les propos,

nous pouvons apprécier ce qui se passe lorsque nous nous coupons profondément. D'abord, l'entaille va cicatriser par les quatre phases précédemment décrites en deux semaines tout au plus. Ensuite, la cicatrice formée va provoquer des démangeaisons. A quoi sont dues ces démangeaisons ? Il est d'usage d'assimiler ces démangeaisons à une inflammation, marquant le début du remodelage matriciel. En revanche, il serait inadapté de la confondre avec la phase inflammatoire consécutive au traumatisme initial en ceci que les proportions des cytokines ne sont point les mêmes et que le déclenchement de l'inflammation du remodelage est fonction de l'activité des *métalloprotéases*. Nonobstant, le remodelage reste un renouvellement tissulaire quelque peu « boosté ». De cette intense activité de renouvellement pourrait découler une inflammation à bas bruit.

L'épilogue cicatririel est l'étape la moins documentée dans la littérature scientifique. En effet, il est régulièrement décrit comme un remodelage tissulaire qui tombe à point nommé après un dépôt de matrice extracellulaire. En revanche, l'arrêt de la réaction fibrotique reste non expliqué à ce jour. Un regard attentif sur la composante immunitaire et en particulier, sur les macrophages, dont la présence est attestée à chaque phase de cicatrisation, devrait être posé. D'une clarification physiologique naîtrait sûrement de nouvelles thérapeutiques pour la prise en charge des pathologies fibrotiques.

2- D'un système immunitaire essentiel

Apprécier la cicatrisation uniquement en considérant la deuxième phase comme un processus histologique, avec en préliminaire une action anti-inflammatoire, n'est pas satisfaisant. Une réflexion attentive sur le sujet permet de discerner quelques incohérences mais surtout, nous empêche de comprendre divers aspects de la physiopathologie de cicatrices hypertrophiques.

L'hémostase et la phase inflammatoire semblent faire consensus dans le milieu scientifique. En l'occurrence, la phase inflammatoire est une immunité de type Th1 ayant comme objet, la prévention d'une infection et l'assainissement de la zone meurtrie. En revanche, les travaux réalisés sur les processus régénérateurs hépatiques ou musculaires nous ont appris l'importance des cytokines inflammatoires sur les processus prolifératifs. A présent, l'inflammation de type Th1, de par la présence de cytokines, est admise comme initiateur de la mise en place du tissu de granulation avec son lot de phénomènes que nous pourrions qualifier de régénérateurs : prolifération épithéliale, angiogenèse et dépôt matriciel d'une qualité proche d'un derme sain. Non pas que les facteurs de croissance tels que le VEGF,

l'EGF ou le PDGF ne jouent pas de rôle important mais il s'avère que l'inhibition de cytokines pro-inflammatoires tarde ou empêche la constitution du tissu de granulation [47]. Ceci est un premier argument du rôle fondamental que joue l'immunité dans la cicatrisation.

La phase cicatricielle est souvent perçue uniquement comme une phase de reconstruction simple ayant une propriété anti-inflammatoire. Au premier regard, cette théorie peut paraître séduisante. Cependant, elle omet de prendre en compte tout un pan de l'immunité, l'immunité de type Th2. L'immunité Th2 est, de manière raccourcie, celle qui lutte contre les pathogènes extracellulaires. D'éminents experts de parasitologies voire d'allergologies se sont essayés à intégrer la signification de l'immunité de type Th2 dans la cicatrisation [52].

Le blocage de la voie de signalisation d'IL-4 entraîna le retard voire le défaut de cicatrisation [61]. Autrement dit, cette immunité de type Th2 responsable de la défense de l'hôte contre les pathogènes extracellulaires entre en jeu dans la cicatrisation. Cette pensée s'avère pertinente car la défense contre un pathogène extracellulaire peut se résumer par la constitution d'un granulome dont la composition rappelle celle de la cicatrice. En effet, l'inflammation de type Th1 étant inefficace pour détruire l'agresseur, une « inflammation » de type Th2 prend rapidement le relais pour emprisonner le parasite dans un « cocon » inexpugnable le privant de ce fait, de mouvements. La forteresse fibreuse, non seulement, bloque tout mouvement mais empêche le parasite de se nourrir, ce qui entraîne son trépas.

A présent, intégrons ce phénomène dans un processus de cicatrisation. L'inflammation a entraîné la détersion de la blessure et l'impulsion de la prolifération cellulaire pour refermer la zone. Reste que la zone non reconstruite émet des signaux en faveur d'une reconstruction. De manière intéressante, ces signaux émis par les structures histologiques en souffrance initient la survenue de cytokines pro-Th2, IL-4 et IL-13 en tête (Figure 14 c). La présence de ces peptides, en premier lieu, empêche tout retour en arrière car elle reste antinomique de l'inflammation de type Th1 (Figure 14 a). En second lieu, ces cytokines déclenchent une immunité de type Th2. Les signaux épithéliaux et endothéliaux sont intégrés au niveau des cellules immunitaires en présence au premier rang desquelles les *macrophages* [62] et les lymphocytes. La perception de ces signaux leur permet en réponse de sécréter principalement, de l'IL-4 et de l'IL-13. La première cytokine va modifier, en autre, le phénotype des monocytes et des macrophages en présence. En retour, les macrophages ainsi stimulés vont émettre du TGF- β 1. Le TGF- β 1 est le principal activateur des *myofibroblastes*, qui, rappelons-le, sont les cellules responsables de la constitution de la cicatrice. La seconde cytokine, l'IL-13, amplifie la sécrétion de TGF- β 1 et concourt à son activation (Figure 14 b).

Ainsi, de par sa fonction biologique, l'IL-13 est susceptible de devenir un biomarqueur de fibrose au même titre que le TGF- β 1 et le *Connective Tissue Growth Factor* [63].

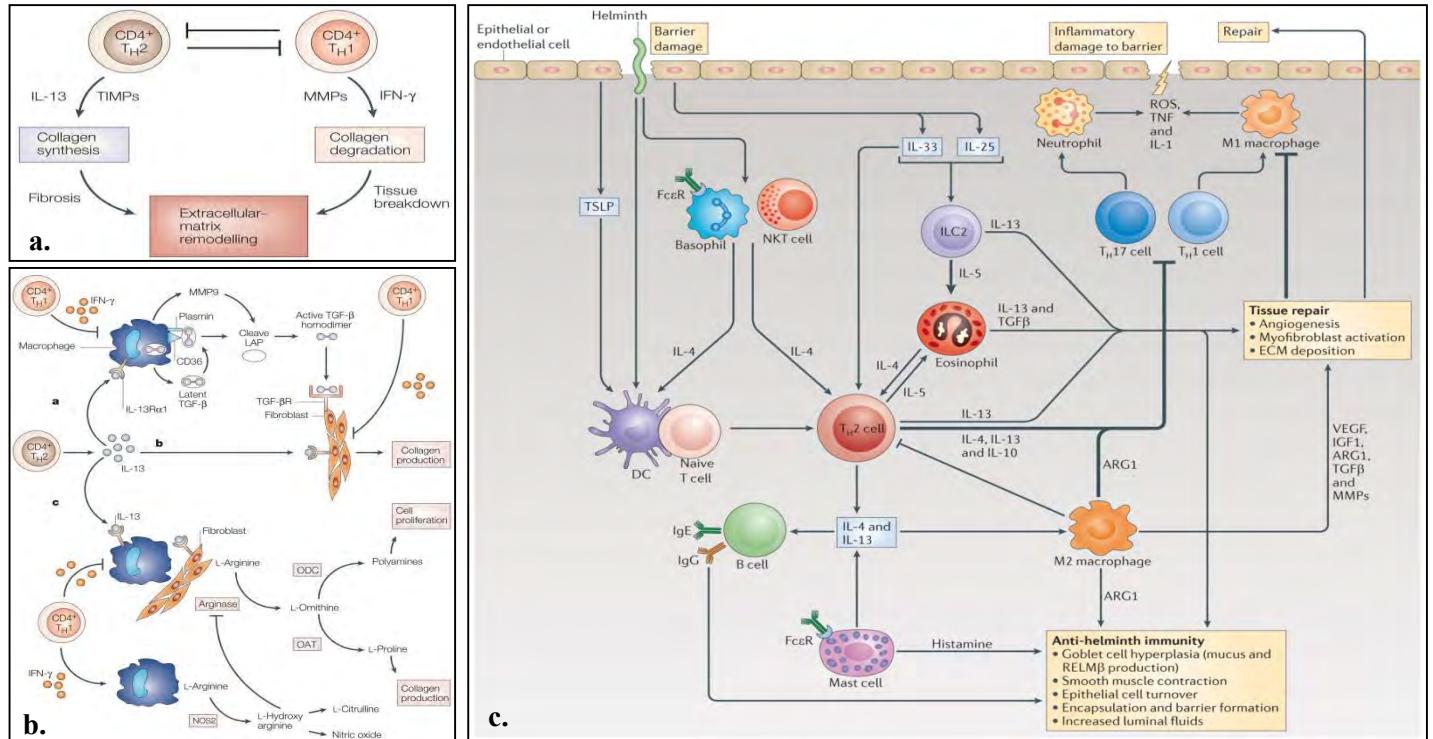


Figure 14 : L'immunité de type Th2 dans la cicatrisation. [D'après Wynn T.A]

a. L'antagonisme des immunités Th1 et Th2 **b.** Rôle de l'IL-13 dans la réaction fibrotique. **c.** L'immunité Th2 dans la cicatrisation et la défense antiparasitaire.

La dernière étape de cicatrisation est toujours considérée comme une étape purement tissulaire, à savoir comme un remodelage matriciel. Il est vrai que la présence d'IL-10 est régulièrement décrite en littérature. Cette ponctualité est expliquée comme étant une sécrétion de macrophages de type 2 et ces propriétés sont décrites comme anti-inflammatoires ou immunosuppressives [64]. L'interleukine 10 présente, indubitablement, des vertus immunosuppressives [65]. Cependant, celles-ci ne sont pas sélectives et par conséquent, empêcheraient la réaction Th2 initiatrice du dépôt matriciel. En fait, si l'IL-10 était sécrétée après l'inflammation, il serait vraisemblable que la cicatrisation en resterait là. La confusion peut être expliquée à la lumière de la biologie des macrophages. Il est décrit que le macrophage peut adopter plusieurs phénotypes. Ces phénotypes sont classés selon deux types : les macrophages de type 1 et une grande classe de macrophages de type 2 [66]. Le type 1 *macrophagique* de l'immunité Th1 ne pose pas de problèmes particuliers en ce sens qu'il

n'est remis en question par aucun biologiste. Par contre, les types 2 restent appréciés à l'aune de la spécialité du scientifique qui les dépeint à un instant donné. En effet, les macrophages de type 2 subissent régulièrement une catégorisation en M2a, b et M2c. Les M2a, b ne sont pas pourvoyeurs d'IL-10 mais en revanche, les M2c, oui [66]. Le classement de l'ensemble de ces macrophages dans le type 2 semble brouiller la compréhension et en conséquence, le message des chercheurs qui s'évertue à l'employer. Le fait est que le type M2c macrophagique devrait être classé à part donc apposé aux types M1 et M2 [67].

De fait, une nouvelle catégorisation des macrophages en trois types semble se dessiner (Figure 15).

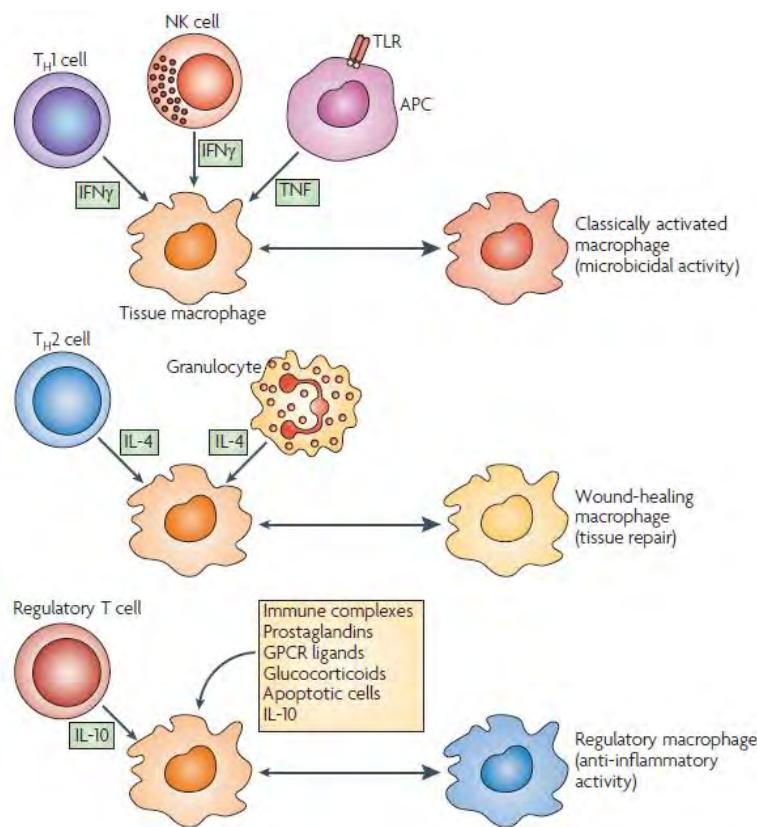


Figure 15 : Les trois types de macrophages. [31]

Les macrophages régulateurs ne sont pas des sous-types de macrophages de type 2.

Le schéma précédent fait émerger une nouvelle classe de macrophages, les macrophages régulateurs. Ceci semble être les macrophages retrouvés lors de la conclusion cicatricielle qui agissent en supprimant la réaction immunitaire Th2 par l'intermédiaire, de l'IL-10 et le recrutement de lymphocytes régulateurs. Par contre, leur apparition n'est à ce jour point

établie par des résultats expérimentaux solides dans un processus de cicatrisation et restent appréciés essentiellement *in vitro*.

Néanmoins, nous pouvons toujours nous référer aux hypothèses formulées précédemment et schématisées dans la figure 16 suivante :

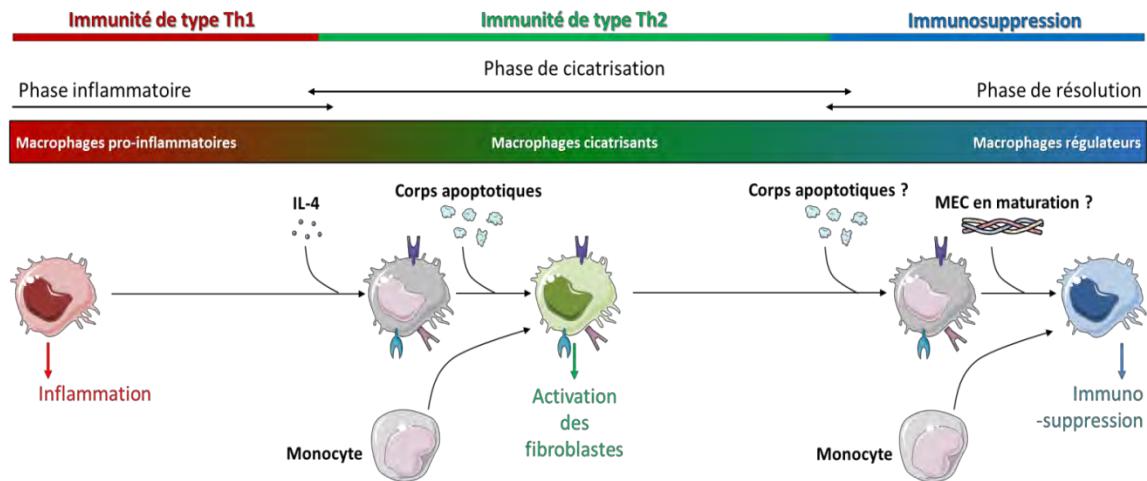


Figure 16 : Les types de macrophages observés dans la cicatrisation.

Les macrophages régulateurs ont été observés mais les signaux qui déclenchent leur survenue ne sont pas encore totalement décryptés.

Le schéma met en exergue le rôle principal des macrophages, cellules immunitaires dans chacune des phases de cicatrisation. Ce type cellulaire apparaît à chaque fois et présente une action fondamentale dans la mécanique réparatrice. De ce fait, il est donc admis comme le « maître-régulateur de la cicatrisation » [68].

A l'instar de la régénération, l'immunité joue un rôle crucial dans le processus cicatriciel. La différence est que lors de la cicatrisation, l'immunité gouverne les processus participatifs tandis que lors de la régénération, l'immunité ne fait, à une exception près, que l'accepter. Ce constat ne fait que renforcer l'idée que l'acquisition d'une immunité complexe semble l'élément qui a précipité la perte de l'aptitude régénératrice en faveur de la cicatrisation.

Considérant que l'immunité est le maître d'œuvre de la cicatrisation, elle devrait être la cible privilégiée de thérapeutiques destinées à atténuer voire « soigner » les pathologies cicatricielles.

3- Du rôle de l'apoptose dans les phases de cicatrisation

Lorsque nous observons avec attention les processus de cicatrisation, nous nous rendons compte qu'un mécanisme biologique est régulièrement identifié. Sa rythmicité semble régulière en ceci qu'il ponctue chaque phase cicatricielle. Ce mécanisme est l'apoptose. L'apoptose pourrait paraître à première vue insignifiante ; malencontreusement, cela ferait faire fi de ses particularités (*cf. chapitre I – A, paragraphe 3*). La figure récapitulative de la cicatrisation proposée en Figure 17 permet de discerner la place qu'il convient d'accorder aux phénomènes apoptotiques dans la cicatrisation. Son apparition coïncide singulièrement avec un changement de phase. Cet état de chose suggère que la mort cellulaire programmée est indispensable à ce type de réparation tissulaire. Le rôle des deux évènements apoptotiques a été documenté dans les pages précédentes, il sera donc question dans ce paragraphe de pointer leur importance.

Le premier phénomène d'apoptose concerne les polynucléaires neutrophiles. En effet, ceux-ci subissent, à l'instar des autres entités biologiques, les assauts des espèces actives de l'oxygène qu'ils délivrent. Au contraire d'un dépérissement par nécrose qui, s'il avait lieu amplifierait l'inflammation, les neutrophiles entrent en apoptose. Si leur action antiseptique est suffisante en ceci que des pathogènes n'ont pu envahir durablement la zone, leur mort marque la conclusion de l'inflammation. De manière intéressante, l'apoptose conclue effectivement l'immunité de type Th1 mais de surcroît, initie l'immunité de type Th2 eu égard son effet sur les macrophages. Effectivement, lorsque un macrophage phagocyte des corps apoptotiques, il adopte un phénotype de type 2 dont la particularité dépendra de l'environnement en présence. En l'occurrence, durant le changement de phase d'une inflammation Th1 vers une inflammation Th2, le macrophage adoptera un phénotype cicatrisant. La question est de savoir quel serait le devenir cicatriciel si nous empêchons les neutrophiles d'entrer en apoptose. Les macrophages se convertiraient-ils vers un phénotype cicatrisant ? Les myofibroblastes feraient-ils leur apparition ?

Le second phénomène d'apoptose, tout juste documenté dans la littérature, est l'apoptose *myofibroblastique* [69]. Les myofibroblastes sont des cellules « hyperactives », artisans de la cicatrice. Ils sembleraient que leur activité intense entraîne leur épuisement et conséquemment, leur mort. Ce phénomène survient dans une zone colonisée par des macrophages de type 2 parfaitement équipés pour entreprendre la « clairance » des corps

apoptotiques. A la suite de l'intégration de ces signaux de mort, les macrophages pourraient mettre en place une mécanique orchestrant l'arrêt du dépôt matriciel.

L'apoptose semble un phénomène éminemment important en biologie, en partie, de par son rôle dans les processus réparateurs. Etrangement, le mythe du Phoenix ne semble pas si fantasque qu'il n'y paraît ; à cet égard, une publication ayant attrait aux phénomènes apoptotiques reprend le mythe en son titre pour documenter un nouvel effet de l'apoptose dans les phénomènes de cicatrisation (*cf.* Chapitre I-A, paragraphe 3).

Dans ce chapitre, l'accent a été mis sur le système immunitaire. Plusieurs phénomènes ont été pointés et discutés. En premier lieu, nous avons proposé que le système immunitaire puisse gouverner les phases de la cicatrisation, de l'inflammation à la résolution. Nous avons vu par la suite, comment des processus tissulaires communiquent avec les cellules de l'immunité pouvant orienter la réponse tissulaire vers une mécanique adéquate. Aussi, je vous propose de résumer ces différentes étapes par un schéma récapitulatif suivant (page suivante) :

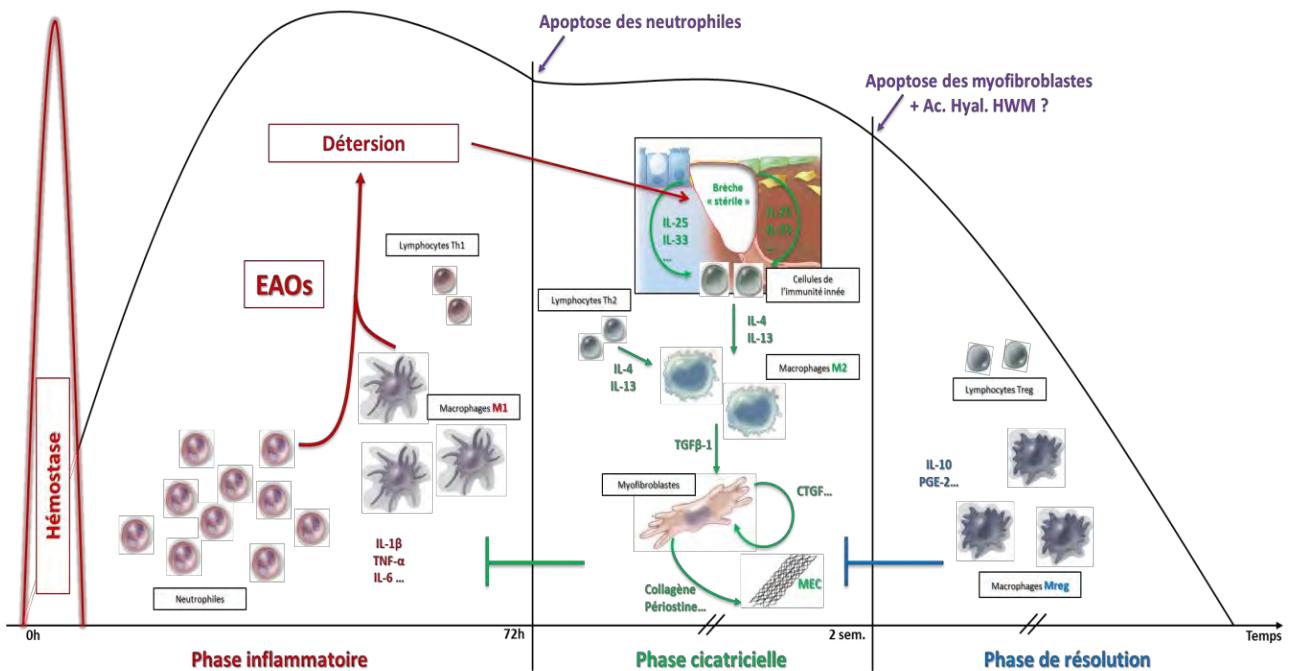


Figure 17 : Le continuum de la cicatrisation sous le regard de l'immunité.

- La phase inflammatoire :** Après l'hémostase, la zone est colonisée par des cellules inflammatoires dont le rôle est de nettoyer la plaie. Cette inflammation sera ponctuée par l'apoptose des polynucléaires neutrophiles.
- La phase cicatricielle :** La zone est à présent « désinfectée ». Des signaux tissulaires suppléent les signaux inflammatoires et provoquent le déclenchement d'une immunité de type Th2. Les Interleukines 4 et 13 agissent sur les macrophages qui, en retour, sécrètent la forme active du TGF-β1. Sous l'action du TGF-β1, les fibroblastes se différencient en *myofibroblastes*, cellules responsables de la constitution de la cicatrice.
- La phase de résolution :** La phase cicatricielle se termine par l'apoptose des *myofibroblastes*. La phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages est à l'origine d'une sécrétion d'interleukine 10 qui pourrait arrêter la réaction immunitaire précédente. La constitution d'une matrice extracellulaire joue-t-elle un rôle dans la conversion phénotypique des cellules immunitaires en présence ?

Ac. Hyal. HWM : Acide hyaluronique de haut poids moléculaire.

L'intérêt du schéma précédent est qu'il permet en un rapide coup d'œil de discerner quels mécanismes pourraient être influencés pour améliorer le mécanisme cicatriciel voire d'orienter la cicatrisation vers une régénération.

Deux mécaniques ont été plus particulièrement prises en compte dans mon travail : l'inflammation comme initiateur de la prolifération et enfin, le dépôt matriciel comme un phénomène immunitaire qui est susceptible de fait, d'être stoppé.

Partie II

Introduction bibliographique

I- Le système tégumentaire des mammifères

Le système tégumentaire est l'ensemble des tissus et des formations organiques qui constituent le revêtement externe du corps de l'homme et des animaux.

Chez les mammifères, le tégument comprend la peau et les annexes cutanées. Par sa richesse en corpuscules nerveux, le tégument est l'organe du tact.

A. La peau chez les mammifères

La peau est l'organe le plus volumineux de l'organisme mammifère. A titre d'exemple, chez l'Homme adulte, la surface cutanée atteint une superficie d'environ $1,8 \text{ m}^2$ pour un poids équivalent à 16 % du poids total corporel [70]. Selon les régions du corps, son épaisseur varie de 1,3 mm (paupière) à 4,4 mm (plante des pieds) [71].

La peau est composée de deux couches principales, d'origine embryonnaire différente : un épithélium ectodermique, l'épiderme et d'un tissu conjonctif mésodermique, le derme. Enfin, un tissu conjonctif lâche, l'hypoderme vient soutenir ces couches supérieures (Figure 18) [71].

Organe protecteur par excellence, la peau dispose en outre de nombreuses fonctions physiologiques. Elle isole l'organisme des attaques du milieu extérieur. Elle participe de la thermorégulation et limite la déshydratation. Elle est également un organe sensoriel (toucher, chaleur, pression, douleur), épurateur (sudation) et métabolique (initiation de la synthèse de vitamine D) [73].

Les descriptions à venir s'appuieront sur l'exemple de la peau humaine. Toutefois, en fin de chapitre, quelques singularités de la peau murine seront discutées.

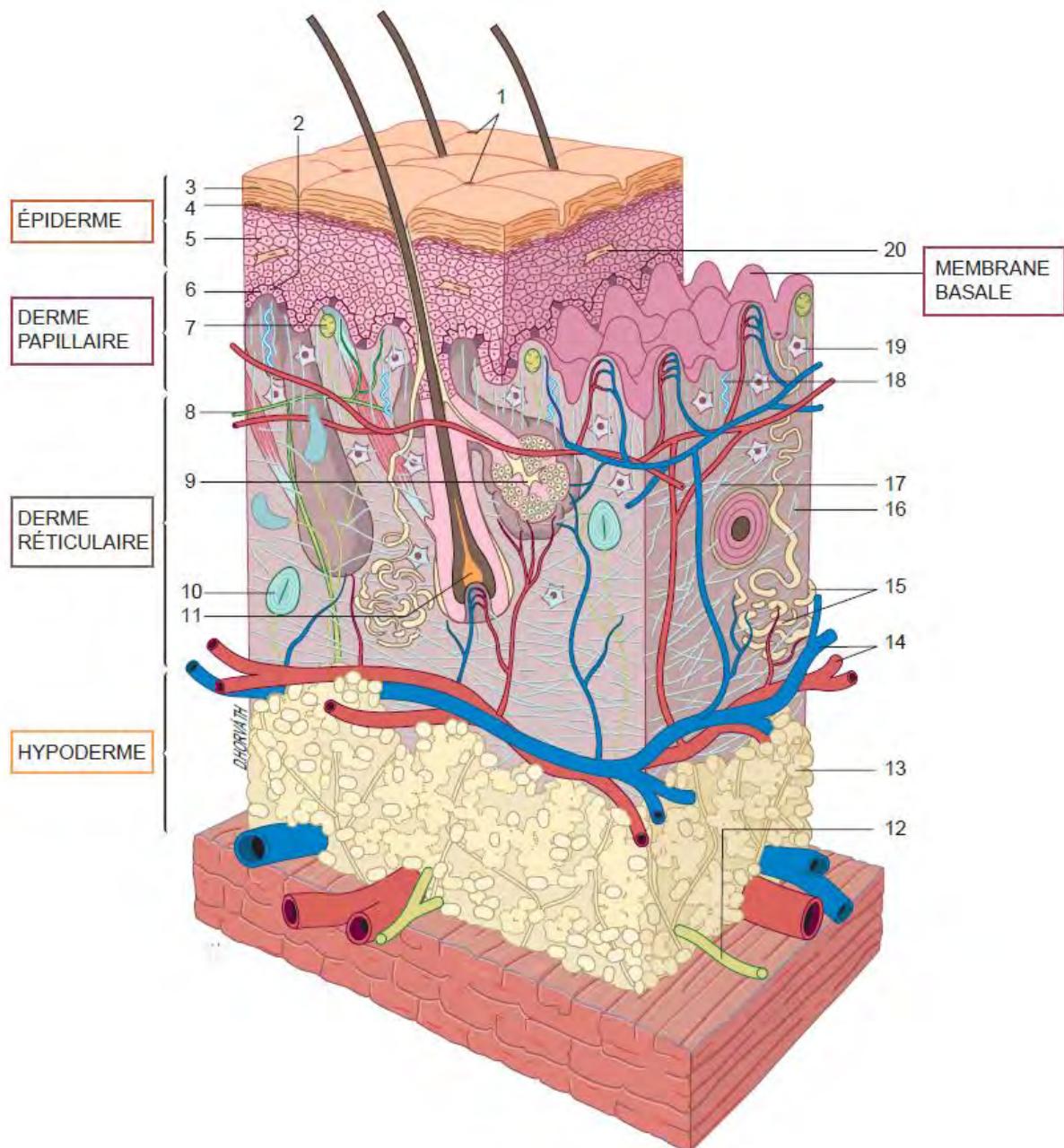


Figure 18 : La peau humaine.

1. Pore. 2. Lamelles de kératine. 3. Couche cornée. 4. Couche granuleuse. 5. Corps muqueux de Malpighi. 6. Couche basale germinative. 7. Corpuscule de Meissner. 8. Plexus nerveux sous-épidermique. 9. Glande sébacée. 10. Corpuscule de Pacini. 11. Follicule pileux. 12. Plexus nerveux profond. 13. Adipocytes. 14. Réseaux vasculaires. 15. Glandes sudoripares. 16. Fibres de collagène. 17. Fibres réticulées. 18. Fibres élastiques. 19. Fibroblastes. 20. Cellules de Langerhans. [72]

1. L'épiderme

Couche protectrice de la peau, l'épiderme est un épithélium malpighien (pavimenteux stratifié) kératinisé d'origine ectoblastique. Son épaisseur varie de 70 à 120 µm mais peut atteindre 1,4 mm au niveau des zones d'appui de la plante des pieds [71].

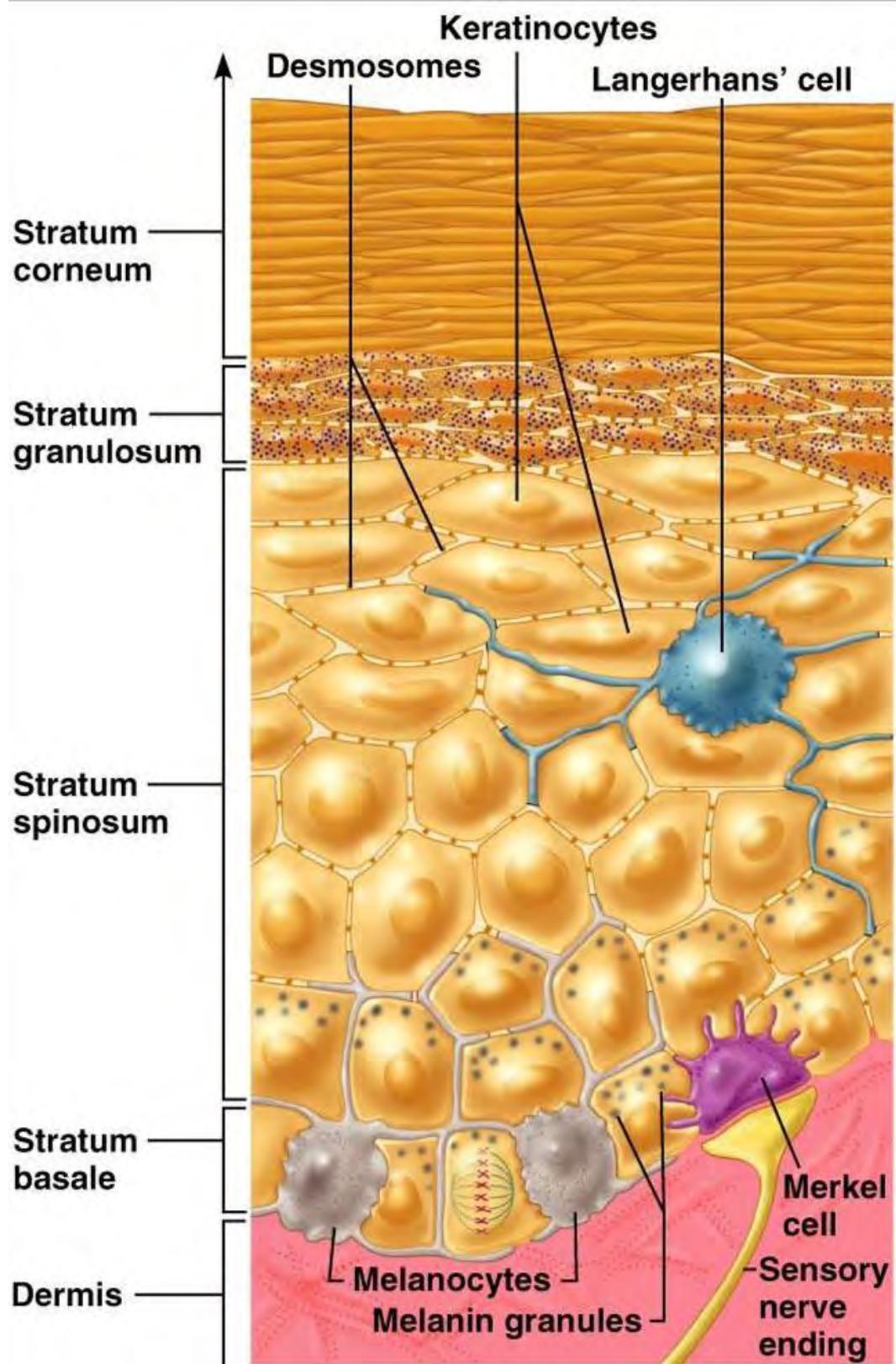
L'épiderme est un épithélium fait de couches de kératinocytes superposées [70]. Lesdites couches apparaissent par division continue de cellules immatures posées sur la lame basale de l'épiderme. Le déplacement perpétuel des cellules néoformées au travers des différentes couches est fonction d'une différenciation fondée sur l'accumulation cytoplasmique de kératine. Dans les couches supérieures de l'épiderme, les filaments de kératine remplissent intégralement le cytoplasme entraînant la dégénérescence du noyau et des organites cellulaires. Les dernières cellules sans vie, se désquamant à la surface de l'épiderme.

Les aspects successifs du cytoplasme durant les processus de différenciation cellulaire permettent de distinguer cinq couches au niveau de la peau épaisse (paumes des mains et plantes des pieds) et quatre couches au niveau de la peau mince (Figure 19) qui sont, de bas en haut :

- La couche basale (*stratum germinativum*) constituée d'une unique assise cellulaire de cellules immatures ;
- la couche épineuse (*stratum spinosum*) ;
- la couche granuleuse (*stratum granulosum*) constituée d'un amoncellement ordonné de cellules pavimenteuses ;
- la couche claire (*stratum lucidum*), absente de la peau mince ;
- la couche cornée (*stratum corneum*) constituée de cellules mortes subissant la désquamation.

Composée de 90 % de kératinocytes, l'épiderme comprend néanmoins d'autres types cellulaires de fonction essentielle. Les mélanocytes, cellules dérivées de la crête neurale, produisent un pigment protecteur, la mélanine ; conférant la pigmentation de la peau, la mélanine permet également l'atténuation des lésions induites par les radiations ultra-violettes [74]. Les cellules de Langerhans sont des cellules immunitaires présentatrices d'antigène. Les cellules de Merkel, mécanorécepteurs cutanés, font jonction avec des terminaisons nerveuses périphériques cheminant dans le derme sous-jacent [74].

Pour finir, étant un épithélium typique, l'épiderme est un tissu non vascularisé ; sa nutrition est assurée par diffusion simple d'éléments en provenance du conjonctif sous-jacent [70].



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Figure 19 : L'épiderme et ses couches cellulaires.

2. La lame basale

Il est d'usage de dénommer la zone d'ancrage d'un épithélium à son tissu conjonctif sous-jacent de *membrane basale*. Toutefois, la dénomination correcte reste la *lame basale* en ceci qu'en biologie, une membrane est une bicouche lipidique ; ce qui n'est pas le cas pour la « basale ».

Structure acellulaire, d'épaisseur variable (40 – 100 nm), la lame basale sert de liant entre l'épiderme sus-jacent et le derme sous-jacent, ainsi que d'ultrafiltre moléculaire passif [71]. Deux couches peuvent être observées ; une couche de faible densité, la *lamina lucida* et une couche opaque aux électrons, la *lamina densa* auxquelles il est possible d'associer une couche réticulée, la *pars fibroreticularis* [74].

Les principaux composants de cette jonction dermo-épidermique sont les protéoglycannes, la laminine et le collagène de type IV [71]. Attendu que le collagène de type IV est spécifique de la basale, une immunohistochimie à l'aide d'anticorps anti-collagène de type IV permet de visualiser irréfragablement la lame basale ; cette technique a l'avantage d'être utilisée lorsqu'on avance la preuve d'une régénération puisque cette dernière implique, du moins dans les temps précoces, l'absence de lame basale mature [75].

L'épiderme est ancré à la *lamina densa* par l'intermédiaire de protéines d'ancrages : les hémidesmosomes [74]. Le derme, lui, est relié à la lame basale par l'intermédiaire de fibres de collagène de type VII (Figure 20). Par la suite, se dirigeant vers le bas, les fibres de collagènes de type VII vont s'ancrer sur des plaques d'ancrage de collagène de type IV. Constituant un réseau, cette structure s'enchevêtre finalement aux fibres de collagènes de type I et III du derme [76].

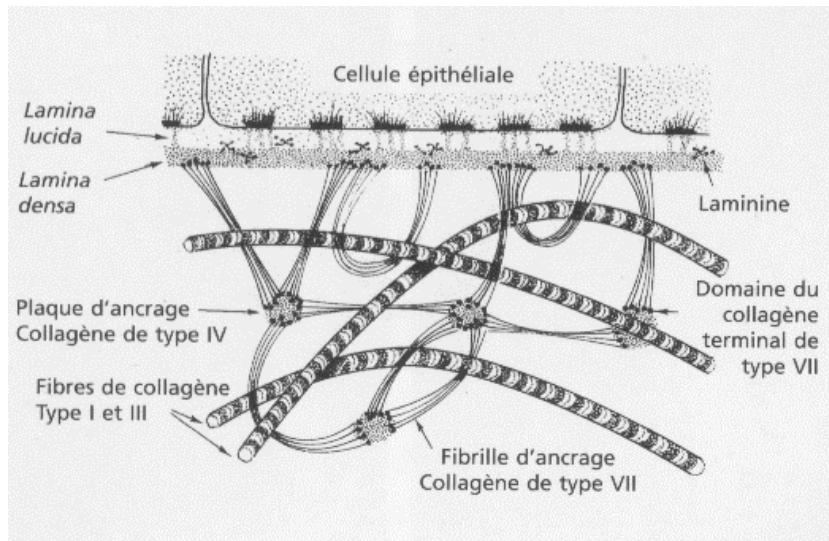


Figure 20 : Réseau d'ancre de collagène sous la *lamina densa*.
 [71][76]

3. Le derme

D'origine mésodermique, derme est le tissu conjonctif de soutien sur lequel repose l'épiderme [74]. Son épaisseur varie selon la région entre 0,6 mm et 3 mm [71]. Il contient en son sein, les annexes cutanées¹⁸ ainsi que les réseaux vasculaire et nerveux de la peau [74]. La composante cellulaire du derme est représentée en majorité par les fibroblastes, pourvoyeurs de l'ensemble de la matrice extracellulaire (collagènes et substance fondamentale), de macrophages résidents (histiocytes), lymphocytes et mastocytes [74]. La composante fibreuse est constituée de collagènes fibrillaires (collagène de type I et III) et de fibres élastiques. La répartition fibreuse permet d'identifier deux couches dermiques, un derme papillaire superficiel disposant d'une proportion élevée de collagène de type III et de fibres élastiques ainsi qu'un derme réticulaire profond fait de faisceaux denses de collagène de type I [71].

Richement vascularisé, le derme renferme deux plexus vasculaires [74]. Le réseau vasculaire naît de vaisseaux sous-cutanés qui vont former un plexus profond dans la partie interne du derme réticulaire et un plexus superficiel dans la partie supérieure du derme papillaire. Les annexes cutanées sont perfusées par des collatérales émises les deux réseaux sus-décris [74].

Enfin, le réseau nerveux cutané est observé dans le derme et est d'ordre sensitif et végétatif [74].

¹⁸ Les annexes cutanées dérivent de l'épiderme et sont d'origine ectodermique [77].

4. L'hypoderme

L'hypoderme, ou tissu sous-cutané, est constitué d'un tissu conjonctif lâche [71]. Il présente une composante fibreuse de collagène sommaire et une composante cellulaire essentiellement représentée par les adipocytes. L'hypoderme sert d'isolant thermique ainsi que de réserve énergétique [74].

5. Les annexes cutanées

Les annexes cutanées sont des structures d'origine ectodermique s'invaginant, à l'exception de l'appareil unguéal, dans le derme et l'hypoderme. Participant de l'homéostasie cutanée, ces annexes sont au nombre de quatre [71] :

- les follicules pileux ;
- les glandes sébacées ;
- les glandes sudoripares ;
- les ongles.

a. Le follicule pileux

L'Homme se distingue des autres mammifères par sa peau nue [78]. Bien qu'il paraisse comme un singe nu¹⁹, l'*homo sapiens* n'en présente pas moins une densité pilaire équivalente aux autres primates [71]. La dissemblance se situe dans le fait que, à l'exception de certaines zones bien délimitées, les poils de l'Homme sont incolores et excessivement fins [71] ; d'ailleurs, par ses particularités, ils ne remplissent plus leur fonction protectrice envers les agressions physiques, chimiques et ionisantes²⁰. Toutefois, même si la peau humaine paraît glabre, les follicules pileux sont bien présents et remplissent, sans aucun doute, leur rôle biologique.

Le follicule pileux est une structure épithéliale tubulaire s'ouvrant à la surface de l'épiderme (Figure 21 A). À l'origine du poil, c'est un organe dynamique qui est le siège d'intenses proliférations et renouvellements cellulaires [71].

¹⁹ Référence au titre de l'ouvrage de Desmond Morris, *Le Singe nu*. (Edition : *Le Livre de poche*, trad. : Rosenthal J, 1970)

²⁰ Certains auteurs pensent que cet état de chose, associé à une endurance exceptionnelle, a participé, en favorisant la sudation, de la survie de notre espèce [Alain Prochiantz. *Qu'est-ce que le vivant ?* Editions du Seuil, octobre 2012. p.95].

Le follicule pileux actif comprend une expansion terminale dénommée *bulbe pileux*, qui reçoit en sa partie inférieure une invagination de tissu conjonctif nourricier, la *papille dermique* [74].

Le bulbe comprend une *matrice cellulaire* de cellules épithéliales de laquelle nait la tige du poil et la *gaine folliculaire interne* (Figure 21 B).

Le follicule pileux est également constitué latéralement d'une *gaine folliculaire externe*, qui n'est autre que la continuité de la couche basale de l'épiderme [71]. Enfin, celui-ci est entouré d'une condensation des composants fibreux du derme, la *gaine fibreuse* (gaine de tissu conjonctif) sur laquelle s'insère le *muscle arrecteur du poil*.

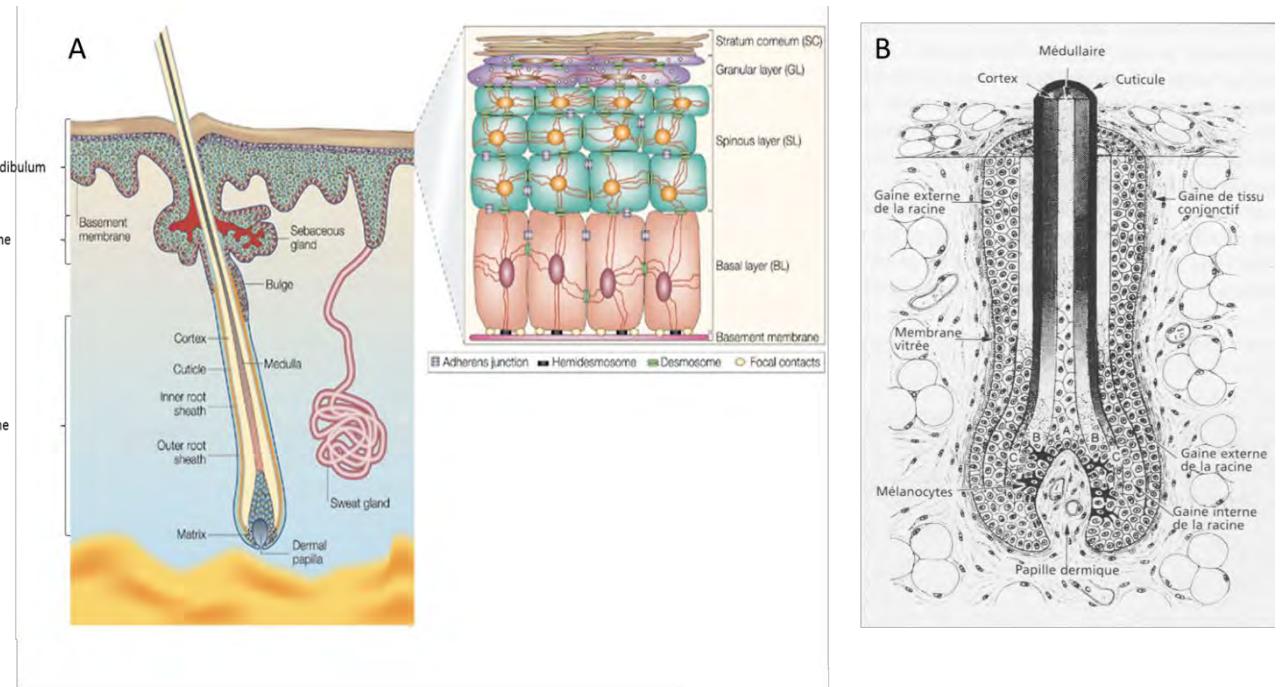


Figure 21 : Le follicule pileux.

A. Vue d'ensemble du follicule pileux [79]. Il est impérieux de remarquer la continuité des couches internes de l'épiderme avec la *gaine folliculaire externe*.

B. Schéma de la racine du follicule pileux [71]. La matière du poil dérive de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales surplombant la paille dermique. (A) Cellules épithéliales à l'origine de la médullaire ; (B) Cellules épithéliales à l'origine du cortex ; (C) Cellules épithéliales à l'origine de la cuticule du poil.

La croissance du poil (ou du cheveu) est cyclique c'est-à-dire qu'ils sont remplacés durant la vie de l'individu [71]. Lors de ce phénomène, le *bulbe pileux* subit une atrophie puis un nouveau développement à partir de cellules immatures contenues dans la *gaine folliculaire externe*, au niveau de régions permanentes du follicule (renflement/bulge, isthme) [80].

De manière intéressante, ces cellules immatures participent à la réparation de l'épiderme après blessure [81]. La réépithérialisation post-lésionnelle fait appel à divers types de *cellules*

souches folliculaires [82]. Il a été montré que pendant les phases précoces de la cicatrisation, des cellules *Krt15*⁺ participaient, selon un phénomène rapide et transitoire, à la réépithérialisation post-lésionnelle [80]. Plus tard, plusieurs études démontrent l'existence de nombreux autres types de *cellules souches folliculaires* capables de participer à la repopulation de l'épiderme après lésion [83] [84] [85]. Toutefois, leur action, à l'inverse des cellules *Krt15*⁺, s'étalait dans le temps et consistait à l'établissement sur le long terme de nouvelles *cellules souches interfolliculaires*²¹ (Figure 22).

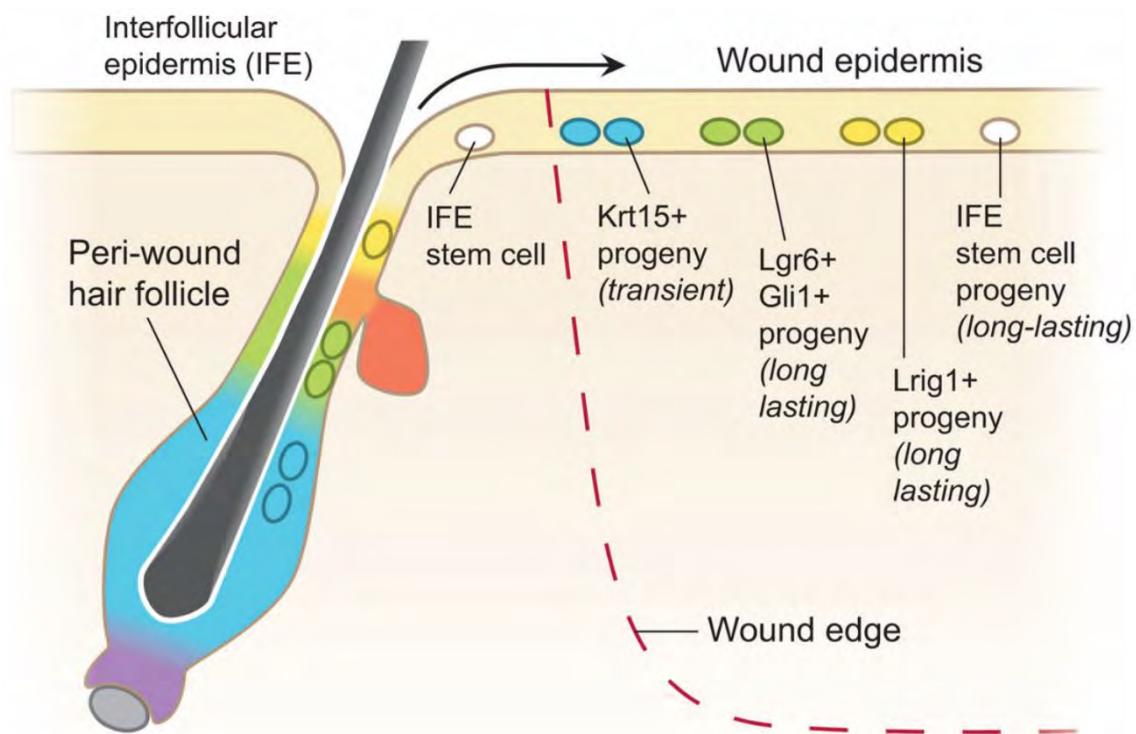


Figure 22 : Contribution des différentes cellules souches épidermiques à la réépithérialisation post-lésionnelle. [82]

Ces récentes découvertes sont à prendre en compte lors de l'analyse de pathologies cicatricielles. Nous pouvons citer en exemple les brûlures profondes et leurs cicatrisations problématiques. Lors de ces brûlures, la couche dermique est détruite et avec elle, les follicules pileux qu'elle contient (cf. Figure 28 p.69). La destruction des follicules, au vu des démonstrations précédentes, abolirait la réépithérialisation soutenue par les *cellules souches*

²¹ Les *cellules souches interfolliculaires* (CSI) ne sont rien d'autres que les cellules de la couche basale de l'épiderme. Cette dénomination a été introduite pour les différencier des *cellules souches folliculaires* récemment mises à jour. Il est à noter que seules les CSI participent du renouvellement perpétuel des couches épidermiques [82].

folliculaires ; le repeuplement de l'épiderme ne se ferait plus à partir des multiples foyers folliculaires adjacents à la zone meurtrie mais uniquement à partir des *cellules souches interfolliculaires* des berges de la plaie. Ceci entraînerait sans doute un retard de cicatrisation²².

b. Les glandes sébacées

Les glandes sébacées sont appendues aux follicules pileux et sont présentes dans tout le derme à l'exception des régions véritablement glabres [71]. Elles excrètent le sébum, amalgame de lipides, par sécrétion *holocrine*.

c. Les glandes sudoripares

Au nombre de deux, elles sécrètent la sueur. Les *glandes sudoripares eccrines*, les plus nombreuses, sont disséminées sur l'ensemble de la peau ; les *glandes sudoripares apocrines* ne sont retrouvées qu'au niveau des régions axillaires, des régions péri-anale et pubienne [71].

d. Les ongles

Les phanères unguéaux sont des formations compactes de kératine issues des cellules épithéliales de la matrice unguéale [71].

6. Les singularités de la peau murine

Les téguments humain et murin sont infiniment proches. Nonobstant, il existe quelques dissemblances à souligner lorsque l'on veut s'essayer à transposer les résultats obtenus en laboratoire vers la clinique.

La première différence, impérieuse pour l'appréciation de la cicatrisation, est que les follicules pileux murins présentent une densité bien supérieure aux follicules humains (Figure 23). En d'autres mots, la place qu'occupe l'épiderme *interfolliculaire* chez la souris est bien moindre que chez l'Homme. Considérant que les *cellules souches folliculaires* participent à la

²² Le retard de fermeture de la plaie est bien observé lors de la réparation tissulaire des brûlures profondes (*cf.* Chapitre II, les brûlures).

réépithérialisation des plaies, la cicatrisation murine serait-elle plus rapide que celle des humains ?

La deuxième différence tient dans une composante immunitaire résidente espèce-dépendante [86]. La peau murine contient deux populations lymphoïdes absentes dans la peau humaine, les *lymphocytes T $\gamma\delta$* (derme) et les *cellules lymphoïdes dendritiques* (épiderme) (Figure 23). La transposition de la mécanique inflammatoire murine chez l'homme est par conséquent à effectuer avec une extrême prudence.

Il existe enfin deux autres différences d'ordre histologique entre ces deux espèces mammifères ; cependant, elle reste mineure en comparaison de celles précitées en ce qui concerne leur importance dans la cicatrisation.

La peau murine est plus fine que la peau humaine ; l'épiderme murin comporte moins de couches cellulaires ainsi qu'un derme relativement mince [86]. Enfin, les rongeurs possèdent une peau particulièrement pauvre en glandes sudoripares [87].

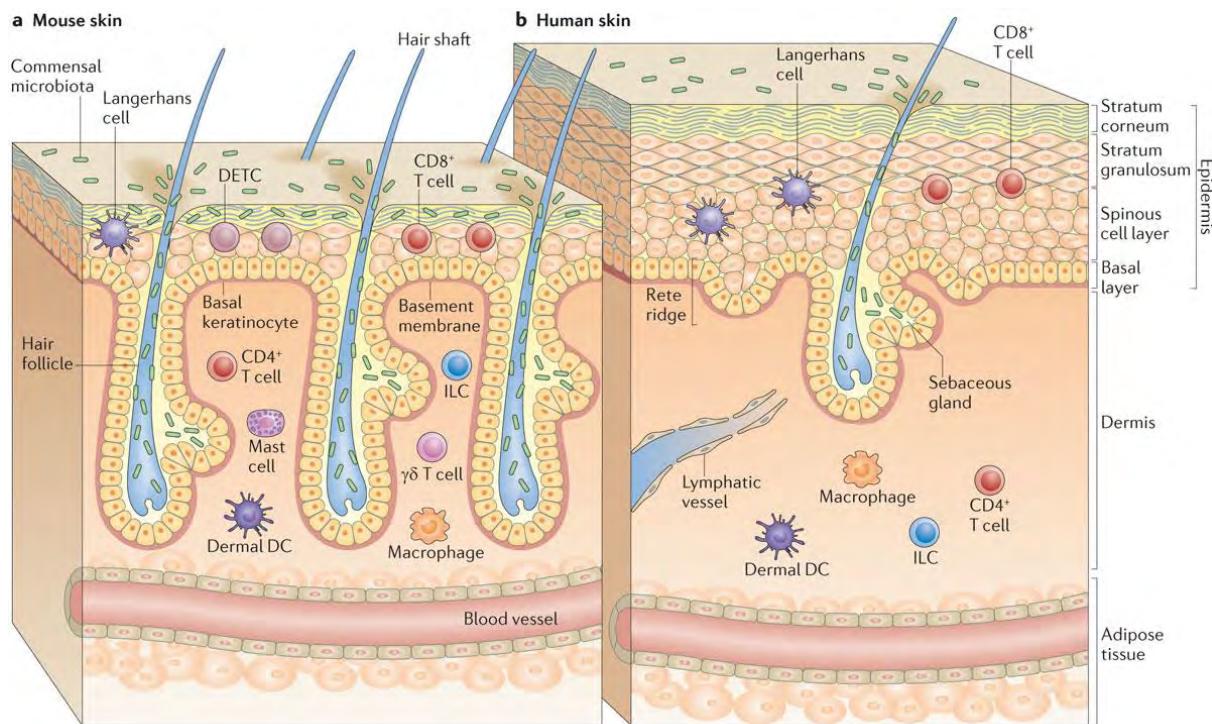


Figure 23 : Comparaison entre les peaux murine et humaine. [86]

B. La cicatrice cutanée chez les mammifères

La peau est l'organe le plus exposé aux agressions extérieures. Lorsqu'elle est lésée, celle-ci se répare spontanément selon les mécanismes de cicatrisation précédemment décrits [cf. Partie I, chapitre I, sous-chapitre B]. Cependant, la réparation peut être soit parfaite, soit fibreuse selon la profondeur du traumatisme cutané subi (Figure 24).

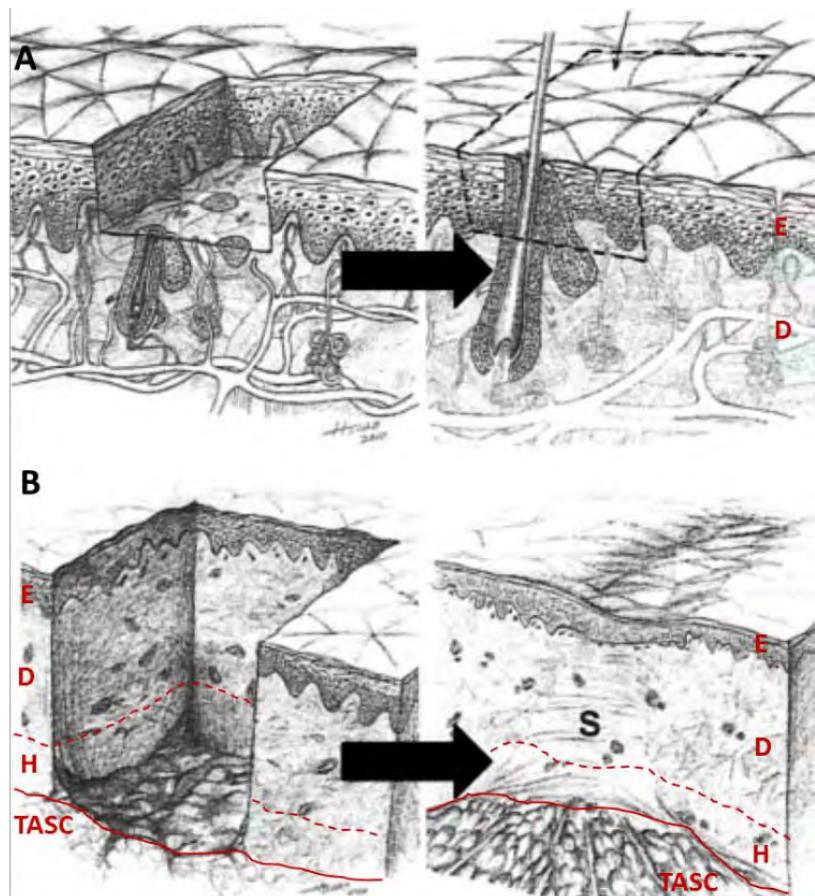


Figure 24 : La réparation cutanée chez l'homme selon la profondeur de la blessure. D'après Yannas IV.

A. Blessure détruisant l'épiderme ; la réparation finale est inviolable. **B.** La blessure a franchi la lame basale et le derme est atteint ; une cicatrice fibreuse se forme, l'organisation tissulaire jusqu'à l'hypoderme est totalement altérée.

S : Cicatrice ; E : Epiderme ; D : Derme ; H : Hypoderme ; TASC : Tissu adipeux sous-cutané.

Si la blessure emporte une destruction tégumentaire limitée à l'épiderme, la réparation va se réaliser selon une prolifération de cellules épidermiques aux alentours, qu'elles soient interfolliculaires ou folliculaires [74] [82] [88]. Bien que la marque réparatrice définitive sera inexistante, les mécanismes régénérateurs sus-décris ne se sont mis en œuvre [cf. Partie I, chapitre I, sous-chapitre A].

En revanche, lorsque la lame basale est détruite et que le derme est atteint, la zone meurtrie sera réparée par un paquet fibreux constitué d'une composante majoritaire de collagène de type I [74] [88] [89]. Autrement dit, la réparation conduira inévitablement à la formation d'une cicatrice fibreuse selon les phases cicatricielles décrites ; ladite cicatrice étant le résultat de la contraction et du dépôt matriciel effectués par les myofibroblastes [90] [91]. Finalement, une marque visible, tangible et indélébile sera observée macroscopiquement et histologiquement après cicatrisation [92].

Au vu des précisions précédentes, il apparaît que la cicatrisation est un processus immanent du stroma conjonctif ; en effet, une destruction parenchymateuse ne sera pas suivie de la constitution d'une cicatrice mais d'un remplacement des cellules fonctionnelles perdues par les cellules adjacentes et/ou les cellules souches du tissu en question [74] [82] [88] [92] [93].

La cicatrice, quelle que soit l'espèce mammifère considérée, se forme en comparaison d'une régénération, rapidement c'est-à-dire dans la deuxième semaine du processus de cicatrisation ; en outre, la cinétique temporelle de cicatrisation entre les espèces semblent sensiblement similaires (Figure 25). Toutefois, les comparaisons temporelles peuvent s'avérer trompeuses car l'étendue des blessures générées en laboratoire est généralement de taille exceptionnelle.

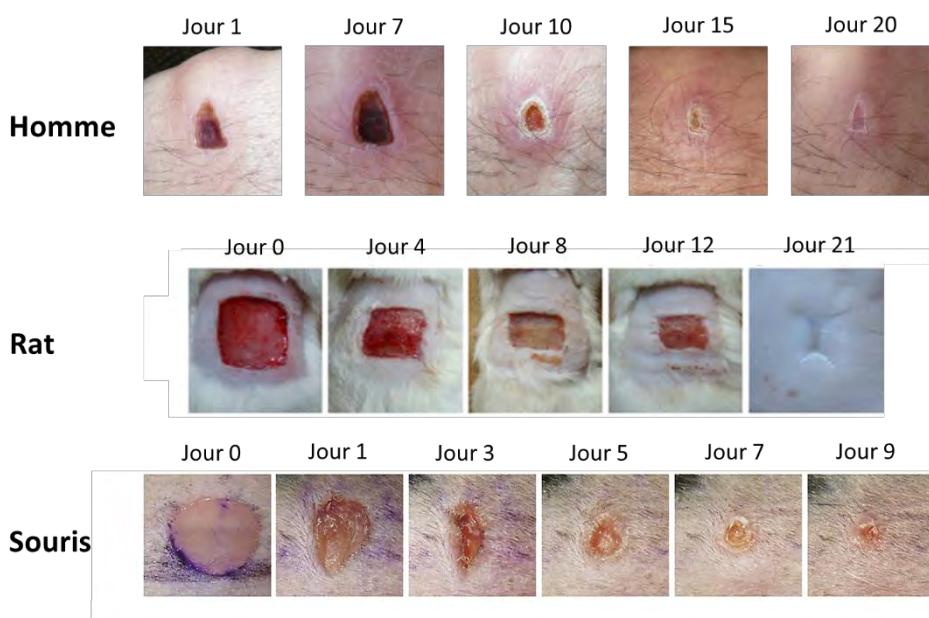


Figure 25 : observation macroscopique de la cinétique de cicatrisation chez l'homme, le rat et la souris.

Homme : Lésion traumatique au niveau de la main. Au jour 15, la cicatrice se laisse macroscopiquement observée [94].

Rat Wistar : Excision dorsale de 4 cm^2 sur toute l'épaisseur cutanée. Au jour 21, la cicatrice est constituée [95].

Souris C57BL/6 : Perforation dorsale de 16 mm^2 sur toute l'épaisseur cutanée. La cicatrice apparaît 12 jours après la lésion [96].

En ce qui concerne l'histologie, le tissu cicatririel présentera une architecture tissulaire semblable entre l'espèce murine et l'espèce humaine (Figure 26). Bien que l'architecture de la peau saine soit quelque peu différente selon l'espèce (cf. sous-chapitre A), l'organisation du tissu fibreux d'origine *myoblastique* après cicatrisation ne laisse discerner aucune singularité. En effet, que le tégument soit humain ou murin, la cicatrice possède un agencement dense de collagène de type I principalement, de micro-vaisseaux et de *fibrocytes*²³ emprisonnés dans ce réseau nouvellement formés. De manière frappante et au contraire d'un derme sain, l'agencement de collagène s'ordonne selon un axe parallèle à la surface épithéliale [97].

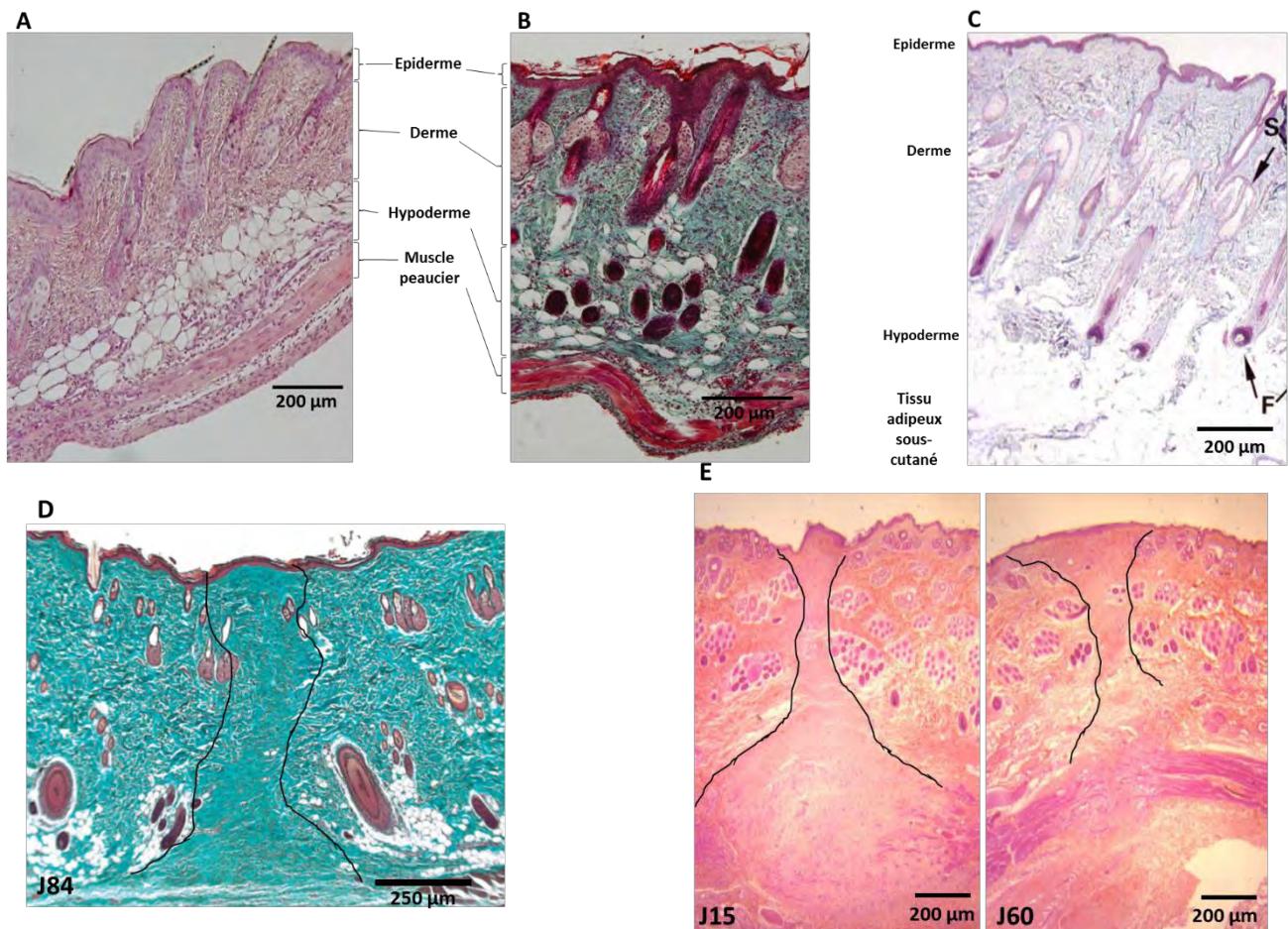


Figure 26 : Histologie de peaux saines et de cicatrices cutanées chez l'Homme et la souris.

A. Peau saine de souris C57BL/6 en hémalun-éosine (donnée personnelle). **B.** Peau saine de souris *Nude* en trichrome de Masson (donnée personnelle). **C.** Peau humaine en trichrome de Masson (© Wheater's Functional Histology, 5th édition, Churchill Livingstone, 2006). **D.** Cicatrice cutanée chez la souris *Nude* en trichrome de Masson (donnée recueillie dans la publication [98]). **E.** Cicatrices cutanées chez l'Homme en hémalun-éosine (données recueillies auprès du Pr. Pelissier [94]). A remarquer : la peau murine possède un muscle peaucier quelle que soit la région observée ; en revanche, celui-ci n'est retrouvé chez l'homme qu'au niveau de la région du cou [99].

²³ Le *fibrocyte*, en histologie, désigne le phénotype quiescent du fibroblaste [74].

Enfin, il est important de remarquer que l'hypoderme, couche cutanée qui confère pour partie l'élasticité et la souplesse de la peau, est irrémédiablement perdu (Figure 26).

Finalement, la cicatrice nouvellement formée connaîtra un remodelage matriciel sur le long-terme puis un renouvellement tissulaire qui concourront à son rétrécissement et son partiel effacement ; pour autant, elle ne disparaîtra jamais.

Nous avons vu précédemment dans la partie I du manuscrit que le processus de cicatrisation est un processus dynamique finement régulé. Sa complexité nous ait encore interdit en ceci que seule une partie de cette mécanique complexe est à ce jour décryptée.

Bien que mal comprise, il est fréquemment observé des processus anormaux de cicatrisation. Ces processus pathologiques se déclinent sommairement en deux types [100] :

- Les plaies chroniques ;
- les cicatrisations excessives.

Les plaies chroniques sont des plaies dans lesquelles le processus de cicatrisation reste bloqué à l'étape inflammatoire. En effet, l'inflammation devenant chronique, la phase de dépôt matriciel ne peut se produire. Nous pouvons citer en exemple les plaies ulcérées, les plaies ischémiques ou les plaies de patients diabétiques [100].

Les cicatrisations excessives sont quant à elle des cicatrisations anormales présentant une fibrose dermique particulièrement conséquente [101] ; cette dernière suggérant une persistance de la phase cicatricielle au cours laquelle se déroule le dépôt matriciel [102].

Pour situer ces deux types de pathologies cicatricielles, je vous propose le schéma suivant (Figure 27) :

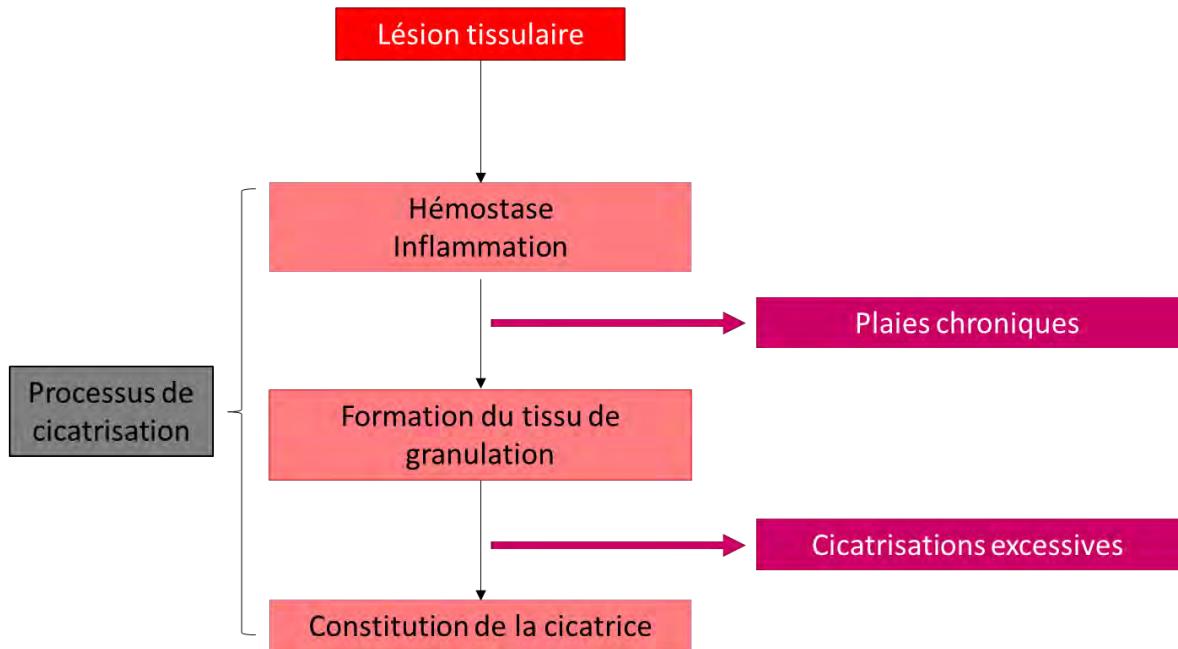


Figure 27 : Rapport entre les pathologies cicatririelles généralement décrites et les processus de cicatrisation. Schéma adapté de Darby IA, *et al.* [100].

Lors de ce travail de doctorat, seule une pathologie de cicatrisation excessive sera abordée : nous traiterons des cicatrisations hypertrophiques.

Les cicatrices hypertrophiques sont, avec les cicatrices chéloïdes, la résultante d'une cicatrisation excessive [90]. Toutefois, bien que par définition les chéloïdes soient hypertrophiques, celles-ci semblent s'observer uniquement chez une partie de la population humaine [102]. En revanche, les cicatrisations hypertrophiques proprement dites détiennent une prévalence élevée quelle que soit la population envisagée ; en effet, l'incidence d'une cicatrisation hypertrophique atteint 40 à 70 % à la suite d'une intervention chirurgicale et atteint un faîte à plus de 91 % pour les brûlures profondes [102].

Dans le chapitre à venir, le sujet sera de résigner la définition des brûlures, leurs caractéristiques mais surtout, de décrire les cicatrices qui en résultent et de discuter des traitements médicaux actuels, qu'ils soient préventifs ou curatifs.

II- Des brûlures et de leur cicatrisation

Les brûlures restent un réel problème de santé publique. Chaque année en France, environ 300000 personnes sont victimes de brûlures parmi lesquelles 11000 environ doivent être hospitalisées, et plus de 300 sont admises dans un centre de traitement des brûlés [103]. L'évolution clinique post-brûlure peut amener à des complications nécessitant souvent de multiples reprises chirurgicales.

Malgré les campagnes de prévention, le foyer domestique reste le premier lieu d'accident [104] ; l'exposition à un liquide chaud, la cause principale²⁴. Un problème majeur est que la plupart de ces traumatismes particuliers conduit au développement d'une cicatrisation exacerbée, connue sous la dénomination de cicatrisation hypertrophique [105]. L'hypertrophie cicatricielle consécutive aux brûlures profondes entraîne non seulement, des séquelles psychologiques mais également, des séquelles fonctionnelles (adultes, enfants) et de croissance (enfants). De surcroît, la prise en charge thérapeutique de telles cicatrisations reste peu efficace en rapport à l'évolution de la cicatrice et traumatisante pour les patients car elle demeure pour partie invasive et le plus souvent, itérative. La découverte d'une nouvelle thérapeutique est de fait impérieuse.

Dans un premier paragraphe, la définition, l'évaluation et les signes de gravité des brûlures seront laconiquement abordés (A).

Par la suite, nous discuterons des particularités de la cicatrisation des brûlures par l'intermédiaire de la description de la cicatrisation hypertrophique (B).

Pour finir, dans un troisième paragraphe, nous préciserons la nature de la prise en charge actuelle, les thérapeutiques utilisées au-devant des cicatrisations hypertrophiques et enfin, les innovations thérapeutiques envisagées (C).

²⁴ 65 % à 73 % des cas recensés [104] [106].

A. Définition, évaluation et signes de gravités des brûlures

La brûlure est définie comme la destruction traumatique de la peau par un processus principalement thermique [104] [106] [107]. La physiopathologie de la brûlure décrit une plaie évolutive en ceci qu'une nécrose envahissante évolue dans les heures et les jours qui suivent le traumatisme initial.

L'évaluation de brûlures se réalise selon trois critères :

- La profondeur ;
- l'étendue ;
- le siège.

L'évaluation de la gravité conditionnera l'orientation du patient vers une médecine ambulatoire, une hospitalisation ou vers un centre de grands brûlés [107].

1. La profondeur

L'évaluation de la profondeur de la brûlure est strictement histologique et nécessite la stabilisation de la lésion de sorte que la nécrose soit circonscrite dans l'espace [107].

Il existe trois degrés de brûlures (Figure 28) :

- Le premier degré, qui lèse exclusivement l'épiderme ;
- le deuxième degré, qui est classé en trois sous-catégories : le superficiel, l'intermédiaire et le profond. Quelle que soit la sous-catégorie, le derme est touché et ce, de plus en plus profond selon la sous-catégorie envisagée ;
- le troisième degré pour lequel toutes les couches de la peau sont détruites, jusqu'au muscle peaucier (souris) ou jusqu'au tissu adipeux sous-cutané (Homme).

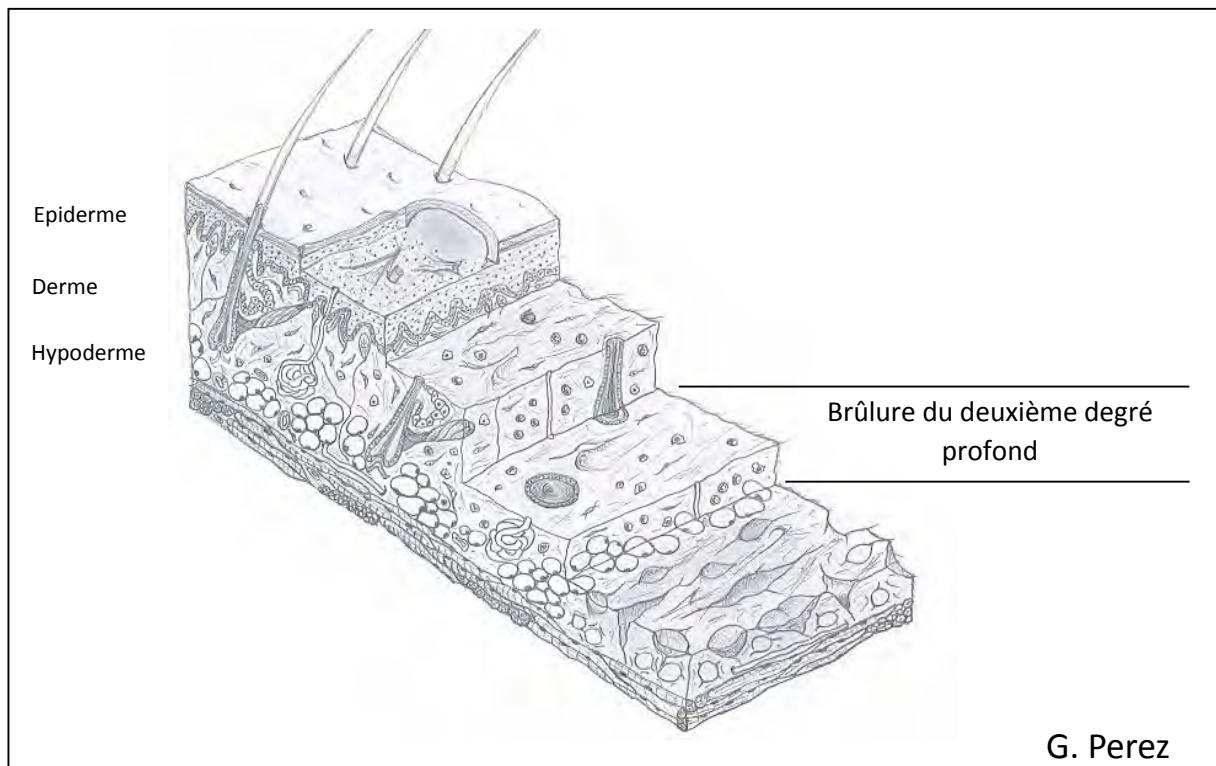


Figure 28 : Profondeur des brûlures ; la profondeur répertoriée dans le schéma sera celle de l'étude expérimentale.

2. L'étendue

L'étendue est évaluée selon des formules *ad hoc* dont les fondements ne seront pas détaillés dans ce tapuscrit.

Bien sûr, plus l'étendue est conséquente, plus la brûlure est grave. Pour une certaine surface brûlée, les changements pathologiques deviennent systémiques ; syndrome inflammatoire, modification de la volémie, endocriniennes, métaboliques jusqu'à dépression du système immunitaire [107].

3. Le siège

Le siège conditionne également la gravité de la brûlure [107]. Les endroits les plus sensibles sont les orifices des voies aériennes, le visage pour ses conséquences esthétiques et les articulations pour les dysfonctionnements et les retards de croissance²⁵ qui en découlent.

²⁵ Chez l'enfant, une grave brûlure située dans une région articulaire peut avoir de forts retentissements sur son développement. La cicatrice laissée grandira moins vite que le membre en question et interférera avec la croissance de celui-ci [106].

B. La cicatrisation des brûlures : l'exemple de la cicatrisation hypertrophique

Les brûlures dont la profondeur altère le derme conduisent à la formation d'une cicatrice hypertrophique dans 70 % à 91 % des cas [105] [108] ; la variabilité entre les chiffres étant probablement due à des évaluations non-standardisées des cicatrices [105]. Une telle cicatrice entraîne des séquelles aussi bien esthétiques que fonctionnelles et retentit défavorablement sur la qualité de vie du patient [105].

Dans la littérature médicale, la cicatrice hypertrophique est, usuellement, décrite comme une prolifération d'un tissu cicatriciel, par définition fibreux, dans les limites de la blessure originelle [102]. Bien que le caractère de pathologie soit souvent avancé, l'expérience clinique suggère que ce type de cicatrisation serait vraisemblablement une forme exacerbée de la cicatrisation normale ; toutefois, son étiologie reste en grande partie énigmatique pour les professionnels de santé qu'ils soient chercheurs ou praticiens [109].

Dans les paragraphes à venir, nous allons en premier lieu essayer de dégager une définition puis une description macroscopique et histologique de la cicatrice hypertrophique (1).

Par la suite, nous discuterons des pistes envisagées quant à son étiologie et à sa physiopathologie (2).

Pour finir, nous nous attarderons sur les traitements à disposition des cliniciens pour la prise en charge de telles cicatrisations (3).

1. Définition, description macroscopique et histologique des cicatrices hypertrophiques.

Est une cicatrice hypertrophique, une cicatrice, présentant un aspect macroscopique boursouflé, surélevé, une rubéfaction prononcée, dont les limites restent confinées aux berges de la lésion originelle (Figure 29) [90] [91] [101]. Elle se développe dans la troisième semaine du processus de cicatrisation mais régresse par remodelage/renouvellement avec le temps (6 mois / 1 an) [90] [101] [105] [110].

En ce qui concerne l'architecture histologique de la cicatrice, le réseau cicatriciel de collagène s'ordonne selon un axe parallèle à la surface épidermique (Figure 29 B) [97] [101]. Le « paquet » fibreux présente en son sein des nodules de myofibroblastes ainsi de nombreux micro-vaisseaux entourés de fibres *collagéniques* fines [101]. Enfin, la quantité de collagène de type I est trois fois plus importante qu'une cicatrice saine [101].

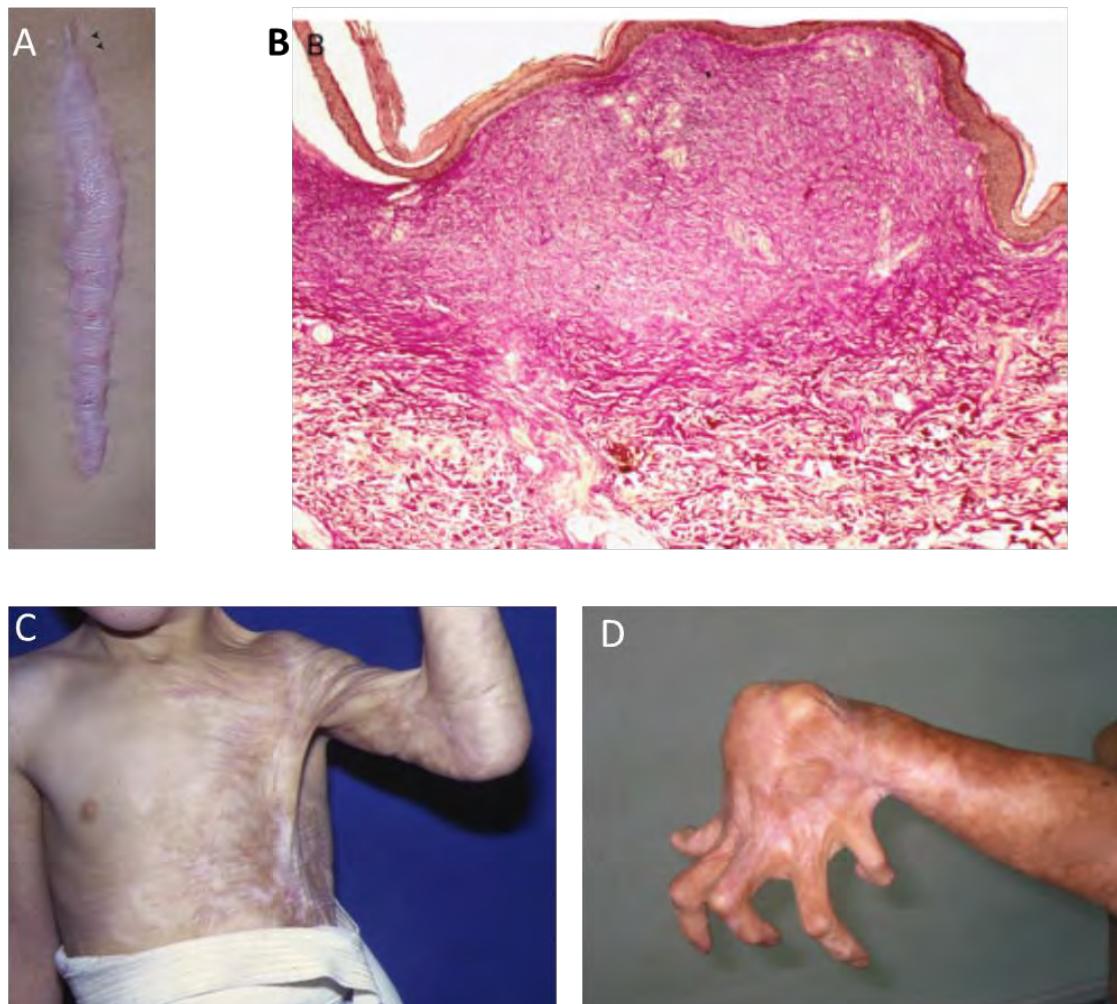


Figure 29 : La cicatrice hypertrophique ; aspects macroscopiques et histologie.

A. Cicatrice hypertrophique après traumatisme induit par chirurgie (donnée recueillie dans la publication 109). **B.** Histologie d'une cicatrice hypertrophique en coloration de Van Gieson x20 (donnée recueillie dans la publication 101). **C.** Cicatrice poly-articulaire hypertrophique et rétractile après brûlure chez l'enfant (© J. Baudet, 2005). **D.** Cicatrice poly-articulaire hypertrophique et rétractile post-brûlure chez l'adulte (© J.C. Castède, C. Isacu, CHU de Bordeaux, 2011).

2. Etiologie et physiopathologie de la cicatrisation hypertrophique

L'hypertrophie cicatricielle est, à la différence des chéloïdes²⁶, de prévalence élevée et est observée chez toutes les populations quelles que soient la couleur de peau ou l'appartenance ethnique [101]. Ces conditions laissent suggérer que la cicatrisation hypertrophique est une forme exacerbée de la cicatrisation normale sans qu'il y ait une cause pathologique initiatrice.

²⁶ Les chéloïdes sont les autres types de cicatrices hypertrophiques. De prévalence peu élevée, elles s'observent le plus fréquemment sur des populations à peau foncée ; les chéloïdes se développent environ 12 mois après cicatrisation et ne présentent pas de phase de régression [101] [105] [110].

Quoiqu'il en soit, l'expérience clinique a permis de dégager des éléments prédictifs du développement d'une cicatrisation hypertrophique ; une plaie sera sujet à une cicatrisation hypertrophique si elle est soumise à de fortes tensions (poly-articulaire, plis cutanés), profonde ou étendue [101] [102] [105]. En outre, la vitesse de fermeture de la plaie va également conditionner le développement d'une hypertrophie ; en effet, une plaie dont la fermeture est laborieuse va, le plus souvent, cicatriser selon un processus hypertrophique [105].

Bien que les examens cliniques aient pu dégager une prédictibilité de l'hypertrophie, les mécanismes cellulaires et tissulaires restent peu compris à ce jour [91] [109]. Cette incompréhension semble découler du fait d'un manque de modèles animaux développant une hypertrophie comparable à l'Homme [109]. En revanche, chacun s'accorde à dire que l'hypertrophie est due à un dépôt exubérant de collagène par les cellules fibroblastiques [90] [91] [100] [101] [102] [110]. Par ailleurs, pour la majorité de ces auteurs, la phase cicatricielle est la phase de la cicatrisation qui doit être incriminée. Il semblerait qu'elle soit sujette durant un processus d'hypertrophie à une activité et une persistance exagérées [90] [91] [102]. En effet, une activité et une présence atypique des myofibroblastes sont observées. En comparaison avec les myofibroblastes retrouvés lors d'une cicatrisation normale, les myofibroblastes d'une cicatrisation hypertrophique produisent une quantité plus importante des composants de la matrice extracellulaire [96]. De surcroit, ces myofibroblastes montrent une diminution de l'expression des MMPs et une augmentation de l'expression des TIMPs [91] [111] ; l'ensemble de ces données suggérant que l'accumulation de collagène est bien favorisée.

En ce qui concerne la présence des myofibroblastes, celle-ci est augmentée et persistante [112]. Cette présence atypique semble être la résultante d'une expression augmentée du CTGF [91]. Le CTGF est un facteur protéique sécrété par les fibroblastes et qui concourt à leur propre prolifération [40] ; en outre, ce facteur stimule la production de collagène de type I [91]. La quantité élevée de CTGF explique en partie le nombre de myofibroblastes observé sans pour autant étayer leur persistance ; en ce sens, l'interrogation de l'apoptose des myofibroblastes – l'apoptose des myofibroblastes est indispensable pour une cicatrisation normale [91] – a été effectuée. Les expériences ont montré des résultats contradictoires en ceci que certaines études démontrent une sensibilité augmentée des myofibroblastes aux produits *pro-apoptotiques* en situation d'hypertrophie et que d'autres ont observé l'exact

inverse [91]. En définitive, la persistance observée des myofibroblastes reste inexpliquée à ce jour.

En résumé, tous ces résultats mettent en exergue un déroulement de la phase cicatricielle soutenu et prolongé ; celui-ci étant expliqué en partie par une activité et une présence des myofibroblastes exacerbées.

En ce qui concerne des causes biologiques des mécanismes sus-décris, plusieurs auteurs semblent mettre en avant une situation inflammatoire, précédant le dépôt matriciel, particulièrement accentuée et insistance²⁷ [91] [102]. Toutefois, les expériences mises en place jusqu'à présent ne permettent pas une clarification certaine des relations de cause à effet entre ces deux évènements biologiques. Enfin, il est observé une réépithérialisation lente et difficile de la plaie qui pourrait expliquer une zone lésionnelle propice à des infections [91] ; l'infection ayant un retentissement amplificateur sur l'inflammation. Cette difficulté de fermeture de la plaie est d'autant plus prégnante chez les brûlures du fait de l'étendue et de la profondeur de celles-ci ; plus un traumatisme est profond, plus le nombre de follicules pileux participant à la réépithérialisation est faible.

Pour résumer le paragraphe précédent, je vous propose le schéma suivant (Figure 30) :

²⁷ A ne pas confondre avec une quelconque chronicité puisque l'inflammation se termine assurément car une cicatrice se constitue.

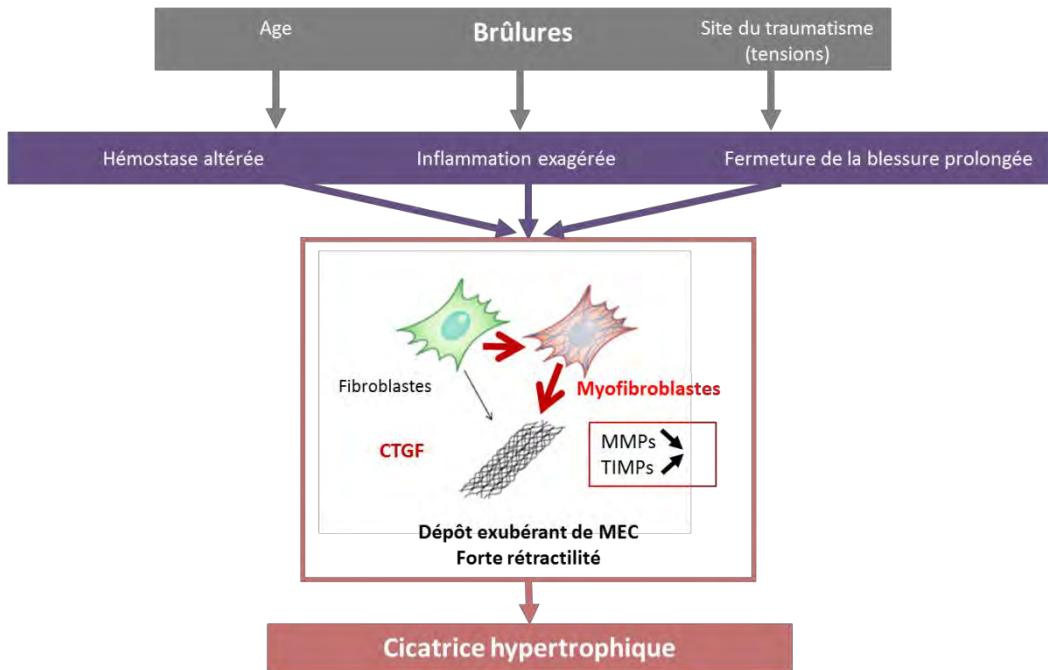


Figure 30 : Etiologie et physiopathologie de la cicatrisation hypertrophique.

Les caractéristiques de la blessure vont produire une altération des premières phases du processus de cicatrisation. Ces modifications premières vont conduire à une exagération de la phase cicatrielle en accentuant la présence et l'activité *myofibroblastique*. Des myofibroblastes particulièrement actifs conduisent à une forte contraction de la lésion et un dépôt exacerbé de matrice extracellulaire : la cicatrice hypertrophique est formée.

Deux données sont présentes dans le schéma sans l'être dans le texte :

- Age : un enfant, selon son âge, a une forte propension à développer une hypertrophie quel que soit le traumatisme [113].
- Hémostase altérée : une hémostase altérée semble un préliminaire à une cicatrisation hypertrophique [91].

Au vu des quelques mécanismes décryptés, la majorité des traitements mis en œuvre a pour but de prévenir une hypertrophie ou de défaire cette cicatrice si elle s'est effectivement constituée. La prévention de l'hypertrophie aura pour objet l'atténuation de l'inflammation et/ou une accélération de la fermeture de la plaie ; le traitement « curatif » s'attardera quant à lui, dans la majorité des cas, à essayer de réduire la population des myofibroblastes et de défaire la cicatrice hypertrophique.

3. Les traitements de la cicatrisation hypertrophique

Dans ce paragraphe, il sera lieu de ne décrire, succinctement, que les traitements servant à circonscrire la cicatrisation hypertrophique. Les premiers soins et la prise en charge de la phase aigüe des traumatismes thermiques ou autres ne seront que très laconiquement abordés en tout début de paragraphe.

Après une succincte introduction sur la dichotomie des soins, une première partie discutera des traitements préventifs de l'hypertrophie cicatricielle (a). Dans une seconde partie, les traitements « curatifs » seront décrits et ce, de manière non exhaustive (b).

La prise en charge de graves traumatismes au premier rang desquels les brûlures profondes²⁸ peuvent se scinder en deux catégories : les soins de la phase aigüe et les traitements de la cicatrisation.

La phase aigüe est la phase la plus critique. En premier lieu, les soins consistent à limiter l'aggravation des lésions. Dans un second temps, les pertes liquidiennes sont compensées, des assistances physiologiques sont mises en œuvre et la douleur est prise en charge si nécessaire²⁹. Enfin, les soins se concentrent à éviter tout risque infectieux. Le patient sera orienté par la suite en ambulatoire, en centre hospitalier commun ou centre hospitalier spécialisé selon la gravité du traumatisme.

La seconde phase du traitement sera, s'il y a présomption de formation d'une cicatrice hypertrophique ou si une hypertrophie est effectivement observée, une prise en charge de la cicatrisation et/ou de la cicatrice.

a. La prévention de l'hypertrophie cicatricielle

La prévention passera par des actions thérapeutiques sur les causes supposées de l'hypertrophie. Des traitements auront pour dessein d'atténuer l'inflammation consécutive à la lésion, d'autres de réduire le temps de fermeture de la plaie ou d'accélérer la réépithérialisation de celle-ci et enfin, certains, lorsque l'inflammation est terminée et que la fermeture de la plaie s'est produite, serviront à empêcher la constitution d'une cicatrice hypertrophique.

²⁸ Le terme brûlure profonde s'entend ici brûlure ayant atteint le derme.

²⁹ Les brûlures profondes ne sont pas douloureuses. Cette propriété permet grossièrement d'évaluer la profondeur de la brûlure sans passer par l'observation histologique [72] [104].

De manière générale, ces traitements sont combinés ; cependant, leurs bénéfices s'avèrent quelque peu limités [90].

- Traitements anti-inflammatoires locaux :

Il consiste en l'application locale de corticoïdes. Aussi bien utilisés en préventif qu'en curatif, les corticoïdes ont un effet bénéfique très relatif puisque ils arrivent à ralentir le développement de l'hypertrophie sans l'empêcher [101].

En revanche, ils induisent de nombreux effets secondaires dont des atrophies tissulaires [101].

- La chirurgie :

La chirurgie sert à diminuer la surface de la plaie afin d'accélérer la fermeture de celle-ci. Les sutures peuvent être intentées ; cependant, lors de brûlures très profondes et étendues, les greffes sont nécessaires [72].

Leur rôle est de couvrir la zone meurtrie ou de réduire la surface lésionnelle ; ceci afin de réduire la surface qui sera *réépithélialisée*. Par contre, elles ne préviennent que très relativement l'hypertrophie (Figure 8) [105] [113].

- Les traitements compressifs :

Popularisé dans les années 1970, le traitement consiste en la pose de vêtements compressifs [101] [114]. Les vêtements de compression se posent après la réépithélialisation de la blessure [105] [114]. Ils provoquent des effets bénéfiques incontestables en permettant une maturation plus rapide de la cicatrice qui devient, en conséquence, légèrement moins épaisse et moins érythémateuse [101] [105].

La pression appliquée consiste à créer une hypoxie locale afin de favoriser l'apoptose des myofibroblastes [114] ; or, l'induction de l'apoptose ne reste à ce jour qu'hypothétique [106]. Bien que des bénéfices soient observés, des complications sont également constatées ; au premier rang desquels nous pouvons citer l'apparition de nouvelles lésions sur l'épiderme fraîchement formé ou l'apparition d'œdèmes due à des pressions trop élevées [106].

Enfin, il est nécessaire que le patient suive le protocole – lourd, puisque les vêtements doivent être portés près de 24h / 24h – à la lettre pour espérer que les bénéfices se fassent ressentir.

b. Les traitements « curatifs » de l'hypertrophie cicatricielle

Les traitements « curatifs » seront appliqués lorsque la cicatrice hypertrophique se sera constituée. Ici, les traitements auront pour finalité de défaire la cicatrice. L'objet de la thérapeutique sera soit d'enlever la cicatrice, soit de défaire le réseau *collagénique* et/ou d'atteindre la composante cellulaire à l'origine du dépôt matriciel.

Dans la majorité des cas, les traitements sont également combinatoires [115] ; et lors de plasties chirurgicales, les traitements préventifs sont rappelés.

- La chirurgie :

L'excision pure et simple peut être utilisée ; cependant, la récidive hypertrophique est très élevée [90] [105]. Par ailleurs, certains auteurs, dans des cas pédiatriques, estiment qu'elle est d'« aucun secours » [113]. Lorsque la zone excisée est étendue, il est possible de recourir à des greffes ou des lambeaux de peau pour recouvrir la zone excisée.

La méthode qui donne le plus de résultats reste la plastie locale ou reprise chirurgicale. Le but de cette chirurgie peut être esthétique mais surtout fonctionnelle en ceci qu'elle est fréquemment utilisée lorsque la cicatrice est située au niveau d'une articulation afin de restituer les degrés de liberté de cette dernière. Il s'agira en substance, par incisions et sutures, de rétrécir la cicatrice et de la réorienter selon les plis naturels de la peau (Figure 31) [101]. Cette technique permettra de soulager les tractions exercées sur la cicatrice [113] ; bien qu'une nouvelle cicatrice se reforme, celle-ci a une plus forte probabilité d'être de meilleure qualité que l'originale [101].



Figure 31 : La chirurgie des cicatrices hypertrophiques : greffes et reprises chirurgicales.

Reprise chirurgicale au niveau de l'articulation scapulo-humérale ; dans cet exemple, il s'agit d'une plastie en Z qui a permis de recouvrir un certain degré de liberté articulaire (les soins chirurgicaux sont combinés avec des soins de kinésithérapie) [72].

La **greffe en filet** est utilisée lors de pertes tissulaires étendues. Greffe de peau mince pour la plupart, elle permet de diminuer la surface cutanée à *réépithélialiser* (données recueillies dans la publication 104).

La **greffe de derme** ici représentée consiste en la greffe d'un derme *acellularisé* (Alloderm) provenant d'une personne décédée mais également en la greffe autologue de peau mince. D'une cicatrice hypertrophique et fortement rétractile entraînant une atteinte fonctionnelle de l'articulation de l'épaule, la greffe a permis de récupérer une très bonne amplitude de mouvement selon le degré de liberté flexion-extension du bras [116].

Greffé de peau reconstituée ; il s'agit ici également d'une greffe de derme ; en revanche, les greffons dermiques ont été « repeuplés » *in vitro* à l'aide de cellules endothéliales, de fibroblaste dermiques et de kératinocytes [117]. Le but de cette thérapeutique était de diminuer l'hypertrophie et de gagner une amplitude de mouvement de l'articulation [117] [118].

- Un agent antiprolifératif : le 5-Fluorouracil :

Le 5-Fluorouracil est un analogue pyrimidique cytostatique ; en somme, il bloque la synthèse d'ADN et donc, la prolifération cellulaire³⁰. Utilisée en oncologie comme antinéoplasique, il peut être prescrit comme inhibiteur de la prolifération des fibroblastes et des myofibroblastes lors d'une cicatrisation hypertrophique [101]. Dans le cas de cicatrices hypertrophiques, cette chimiothérapie connaît quelques effets bénéfiques [101] ; cependant, plusieurs effets secondaires ont été observés tels que des ulcères ou des purpuras. Les effets indésirables de ce traitement peuvent être en partie jugulés par l'administration en synergie de corticoïdes [101].

- Un agent inflammatoire : *Imiquimod*

L'*imiquimod* est ce que l'on nomme un « modificateur de la réponse immunitaire » (Vidal) ; il agit en quelque sorte en rappelant la réponse inflammatoire par l'intermédiaire d'une stimulation de l'interféron α [101]. La cytokine pro-inflammatoire permet d'augmenter l'expression de collagénases (MMPs) qui, en retour, vont dégrader le réseau cicatriciel de collagène [101]. Présentant une relative efficacité chez les chéloïdes en complément d'une exérèse chirurgicale, son bénéfice est en cours d'évaluation à l'égard des cicatrices hypertrophiques [101].

- Une immunothérapie : Anticorps dirigé contre le TGF- β

Ce traitement est en expérimentation sur l'animal [90]. Le principe est de piéger le TGF- β , cytokine à l'origine de l'activation des fibroblastes et du dépôt matriciel [cf. Partie I, chapitre I, sous-chapitre B], pour en inhiber ces effets pro-*fibrosants*.

Le but de chapitre sur les thérapeutiques n'était pas de décrire de manière exhaustive toutes les thérapeutiques existantes dans la prise en charge de la cicatrice hypertrophique, fut-elle issue d'une brûlure profonde ou d'un traumatisme grave. De plus, pour les séquelles fonctionnelles, la part des actes de kinésithérapie n'a pas été étayée ; pour autant, leurs bénéfices restent inestimables. Il s'agissait de rendre compte de l'hétérogénéité des prises en charge et de discuter des mécanismes d'action des traitements sur lesquels les praticiens

³⁰ Vidal.

peuvent s'appuyer. Nous avons vu que certains traitements s'attaquent aux causes biologiques (préventif) de l'hypertrophie, bien que ces causes restent supposées, ou à sa physiopathologie (curatif).

Les traitements sus-décris apportent quelques bénéfices quant aux effets délétères de l'hypertrophie cicatricielle mais restent insuffisants ; en outre, beaucoup induisent des effets indésirables, d'autres sont difficilement applicables à la lettre par les patients et enfin, certains restent lourds, traumatisants et itératifs.

D'autres traitements adaptés sont à élaborer pour améliorer les séquelles fonctionnelles et esthétiques que l'hypertrophie entraîne. Qu'elle soit en combinaison avec les traitements connus ou délivrée seule, il est impérieux de trouver une nouvelle thérapeutique peu répétitive et efficace pour soulager la vie des cicatrisés.

La thérapie cellulaire est l'une de ces thérapeutiques. Bien que l'on puisse penser de prime abord à une médecine de la reconstruction à l'aide de cellules souches pluripotentes, il existe d'autres substrats cellulaires qui, gardant une capacité de repeuplement, détiennent des effets biologiques qui pourraient s'opposer aux causes présumées de l'hypertrophie cicatricielle. Ces cellules sont les cellules stromales mésenchymateuses ; leur définition, leurs qualités seront décrites dans le chapitre suivant.

III- Les cellules souches/stromales mésenchymateuses : un traitement pour la cicatrisation ?

L'hypertrophie cicatricielle est, comme décrit précédemment, une exagération de la phase de dépôt matriciel du processus de cicatrisation. Attendu que cette physiopathologie pourrait être modifiée en sa substance par un ciblage des cellules conjonctives responsables du dépôt matriciel, les traitements peuvent également être ourdis selon un dessein préventif. En effet, des causes présumées de l'exubérant sécrétoire, deux sont susceptibles d'être impactées par une nouvelle thérapie, la thérapie cellulaire.

D'abord, il est suspecté qu'un défaut dans la fermeture de la plaie conduit par consécution à une altération amplificatrice du dépôt matriciel [95]. Hors conséquentes pertes de substance et/ou importantes étendues lésionnelles au-devant desquelles les greffes sont inévitables, il est pertinent de penser que l'adjonction de cellules à forte capacité proliférative et/ou de différenciation pourraient être utile dans la démarche qui consiste à pallier le déficit de recouvrement de la zone meurtrie. D'ailleurs, cette thérapie cellulaire n'est pas contradictoire avec une greffe de peau puisqu'on peut réaliser une greffe et adjoindre des cellules en complément pour gagner en pouvoir réparateur. Reste à savoir quelles cellules seraient un substrat adéquat pour une telle médecine de la reconstruction.

Nous savons que des cellules souches existent intrinsèquement dans chaque organe [119] – ce qui est le cas dans l'organe tégumentaire – ainsi que, des cellules souches pluripotentes peuvent être dérivées de l'embryon (cellules ES) ou obtenues par modification épigénétique et/ou d'expression génique d'une cellule somatique (cellules iPS). En revanche, pour ce qui a attrait aux cellules intrinsèques dites cellules souches adultes, elles restent restrictivement, bien que cette notion puisse être pondérée par des évènements de plasticité, engagées vers le phénotype des cellules fonctionnelles qu'elles doivent suppléer ; le problème étant que lors de traumatismes sévères plusieurs catégories phénotypiques de cellules doivent être remplacées. En ce qui concerne les cellules souches pluripotentes que sont les ES et les iPS, les premières sont susceptibles d'être rejetées immunologiquement lors de leurs différenciation et les secondes, grief opposable également aux précédentes, présentent un risque de transformation. Quand bien même, si l'on utilise ces dernières après prolifération, amplification et différenciation contrôlées *in vitro*, de nombreuses limitations, bien que des progrès aient été accomplis, sont à surmonter quant à leur utilisation. Nonobstant, la médecine de la réparation ne saurait n'être abordée uniquement sous un angle d'une médecine de substitution. En effet,

une accélération de la réépithérialisation ou de la fermeture de la blessure peuvent s'appréhender sous l'égide d'une action sécrétoire. Autrement dit, l'adjonction de cellules douées de sécrétions de facteurs de croissance pourrait concourir à l'accélération de fermeture de la plaie par action proliférative sur les cellules constituant l'environnement lésionnel. Les cellules souches/stromales mésenchymateuses possèdent cette qualité sécrétoire de facteurs de croissance ; de surcroit, elles gardent une potentialité de différenciation qui pourrait agir en synergie avec les précédents effets. Les cellules souches/stromales mésenchymateuses deviennent des candidates sérieuses quant à la réussite d'une thérapie cellulaire vouée à accélérer la fermeture des plaies.

Un autre aspect causal du déclenchement d'une phase exagérée de dépôt matriciel est une réponse inflammatoire, subséquente au traumatisme, démesurément vigoureuse et prolongée. Un traitement permettant d'atténuer, de normaliser et/ou de juguler la phase inflammatoire pourrait être d'une aide salvatrice pour combattre la constitution d'une cicatrice hypertrophique. Or, à l'inverse des autres cellules utilisables en thérapie cellulaire, les cellules souches/stromales mésenchymateuses présentent des aptitudes anti-inflammatoires voire immunsuppressives.

En définitive, les cellules souches/stromales mésenchymateuses sont douées de qualités qui, utilisées avec rigueur, laissent entrevoir la réalisation d'une thérapie cellulaire efficace dans la lutte de la cicatrisation hypertrophique.

Dans le chapitre à venir, il s'agira en premier lieu de donner une définition aux cellules souches/stromales mésenchymateuses, de décrire brièvement leurs qualités biologiques et de rendre compte laconiquement de leur utilisation en médecine de réparation (A). Dans un deuxième temps, nous nous arrêterons sur les capacités *immunomodulatrices* (B) et sécrétoires des CSM (C). Enfin, dans un dernier paragraphe, nous discuterons des cellules souches/stromales mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux et nous rendrons compte de ce choix à travers la description de leurs singularités et, à la lumière d'exemples de protocoles précliniques dans des modèles animaux de cicatrisation cutanée (D). De manière générale, nous discuterons des CSM humaines car les cellules utilisées pour la mise en place de la thérapie cellulaire dans notre étude expérimentale dérivent de patients hospitalisés ; nonobstant, épisodiquement, on pourra se référer, dans les prochaines lignes du tanuscrit, à des CSM murines.

A- Les cellules souches/stromales mésenchymateuses, définitions et propriétés biologiques

Les cellules souches/stromales mésenchymateuses ont été décrites pour la première fois chez la souris en 1968 par l'équipe du Dr. Friedenstein [120] ; elles étaient définies comme une sous-population de la moelle osseuse, ostéogénique, non-hématopoïétique et adhérente en culture. Quelques années plus tard, une description plus exhaustive en fut donnée : il s'agissait en substance de cellules isolées de la moelle osseuse, de morphologie fibroblastique, capable *in vitro* de former des colonies (CFU-F), lesdites colonies pouvant servir de support à l'hématopoïèse et ayant une propension à se différencier en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes [121]. La caractérisation de telles cellules chez l'homme fut faite dans les années 1980 [122].

Dès lors, la dénomination de ces cellules au regard de leurs qualités devint complexe. Il a été proposé au début des années 1990 de qualifier ces nouveaux précurseurs, de cellules souches en raison de leurs capacités *multipotentes* [123]. Or, une cellule est dite « souche » lorsque celle-ci détient un potentiel *clonogénique*, une capacité d'autorenouvellement et de reconstitution de leur environnement d'origine [124] ; ce qui n'était pas démontré à l'époque pour les cellules stromales dérivées de la moelle osseuse.

Au-devant de confusions rencontrées dans la littérature et de la difficulté de démontrer l'autorenouvellement, une nouvelle terminologie fut adoptée par l'ISCT (*International Society for Cellular Therapy*) : cellules stromales mésenchymateuses [125]. Depuis lors, les CSM doivent, pour être nommés ainsi, répondre à des critères biologiques minimaux : adhérence au plastique, différenciation *in vitro* en trois types cellulaires d'origine mésodermique (ostéocyte, chondrocyte et adipocyte) et présentation d'un ensemble de marqueurs de surface, CD105, CD73, CD90 associé à l'absence de marqueurs hématopoïétiques, CD45, CD34, CD19, CD19 ou CD79, CD14 (ou CD11b espèce murine) et HLA-DR (humaines). Or, la plupart des stromas conjonctifs sont peuplés de cellules répondant à ces caractéristiques lorsqu'elles sont isolées et mises en culture [126] ; les CSM peuvent en conséquence être obtenues non seulement de la moelle osseuse mais également de multiples régions de l'organisme dont le tissu adipeux [127], la peau [128], le cordon ombilical (gelée de Wharton par exemple) [129] ou le ligament parodontal [130] etc.

Par ailleurs, il existe une hétérogénéité en ce qui concerne leurs capacités selon leur tissu d'origine [131] [132] ; en effet, il peut exister une variation de leur *sécrétome*, de leurs marqueurs et de leur potentialité de différenciation selon qu'elles proviennent de la moelle

osseuse, du tissu adipeux ou d'un autre tissu [131]. En conséquence, l'origine des cellules stromales mésenchymateuses doit être expressément renseignée pour éviter toute confusion.

L'absence de marqueur de surface spécifique renforce à la complexité du concept de cellules stromales mésenchymateuses et en outre, rend mal aisée l'observation de telles cellules *in situ*. Leur très faible fréquence, leur hétérogénéité et l'impossibilité de retranscrire leurs potentialités de culture dans l'organisme hôte ne peut éclairer sur la fonction physiologique des CSM. Cependant, il est proposé que la plupart des CSM, en partie du fait de leur présence ubiquitaire, possède une origine perivasculaire [133] [134] ; d'ailleurs, il a été observé une forte corrélation entre la fréquence des CSM et la densité vasculaire du stroma duquel elles proviennent [135]. Enfin, cette suspicion est amplifiée par le fait que des péricytes CD146+, PDGF-R+ possèdent *in vitro*, au niveau clonal, les mêmes capacités différenciatrices que les CSM [133]. Nonobstant, il reste admis que tous les péricytes ne sont pas des CSM et inversement, tous les CSM ne sont pas des péricytes [136].

En ce qui concerne leur autorenouvellement, la caractérisation d'une telle qualité chez les CSM a été questionnée, au niveau clonal, *in vitro* chez des cellules dérivées de la moelle osseuse [137] [138] et des cellules dérivées de cordons ombilicaux [139]. Toutefois, pour prouver de manière invincible l'autorenouvellement d'une cellule, l'expérience requiert des conditions particulières pour être validée : il s'agit de l'observer au niveau clonal mais surtout de la confronter non pas en culture mais par l'intermédiaire d'expériences chez l'animal. Cette expérience a été faite avec une sous-population CD146+ formant des CFU-F en culture ; il a été montré qu'une seule CFU-F CD146+ était capable après transplantation dans une logette sous-cutanée, de reconstituer un environnement similaire à celui retrouvé dans la moelle osseuse et en outre, après récupération de l'implant, un tri cellulaire a permis d'isoler des cellules CD146+ qui, remises en culture, formaient des CFU-F [140] ; cette expérience renseigne sur la possibilité d'un autorenouvellement de cette sous-population de cellules stromales.

En définitive, seules les propriétés *in vitro* des CSM sont caractérisées assurément ; ce sont des cellules provenant d'un stroma conjonctif qui, en culture, adhèrent, prolifèrent, possèdent un ensemble de marqueurs caractérisés et une potentialité de différenciation dans des lignages mésodermiques. D'ailleurs, la dernière caractéristique, conditionnant la terminologie de « cellules souches » pendant de nombreuses années, a été la raison pour laquelle les CSM furent utilisées en médecine de la réparation [131]. L'apport exogène des CSM, que cela soit par infusion vasculaire ou par adjonction locale, a montré des bénéfices dans de nombreux modèles animaux précliniques [141]. Cependant, les faibles événements de repeuplement et

de différenciation des CSM dans le tissu hôte n'ont pu expliquer les effets bénéfiques des thérapies cellulaires basées sur leur utilisation [131] [136] [141]. Leur utilisation comme substrats cellulaires thérapeutiques découlent en fait de deux activités biologiques bien définies *in vitro* : des propriétés *immunomodulatrices* sur l'ensemble des composantes du système immunitaire et d'une activité sécrétoire de facteurs qualifiés de « trophiques » [131] [141] [142]. Par ailleurs, la greffe de CSM en autologue n'est point obligatoire pour obtenir des effets bénéfiques de la part d'un traitement basé sur leur utilisation ; en effet, les CSM *allogéniques* voire *xénogéniques* ne sont pas rejetées par l'hôte et en outre, proposent des effets comparables sinon supérieurs aux CSM autologues [126] [141].

Dans les deux prochains paragraphes, nous discuterons de ces deux activités « thérapeutiques » à la lumière des apports bénéfiques qu'elles puissent apporter aux cicatrisations hypertrophiques.

B- Les propriétés *immunomodulatrices* des CSM

Une conséquente littérature discute des effets *pléiotropes* des CSM sur les cellules immunes. De nombreuses études montrent que les CSM sont aussi bien capables d'agir sur la composante innée que la composante acquise du système immunitaire [131]. Une telle potentialité au regard de la place de l'immunité dans la cicatrisation est particulièrement intéressante pour élaborer un traitement contre l'hypertrophie cicatricielle.

Dans ce paragraphe, nous traiterons des effets des CSM sur les cellules immunes qui sont communément observées lors du processus de cicatrisation.

Depuis l'observation que les CSM étaient capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T *in vitro* [143] et de garantir la survie d'un greffon allogénique chez le primate [144], un engouement s'est créé autour des propriétés *immunomodulatrices* des cellules stromales. Dès lors, les CSM ont montré des capacités *immunomodulatrices* sur la plupart des cellules immunes.

Lymphocytes T ; les CSM sont capables, nous l'avons dit, d'inhiber la prolifération des lymphocytes ; cette inhibition est produite par l'expression de l'enzyme IDO qui catabolise le tryptophane, acide aminé indispensable à la croissance des lymphocytes, en *kynurénine* [145]. En outre, les CSM peuvent induire un changement de phénotype des lymphocytes T CD4,

d'un phénotype Th1 exprimant l'IFN γ vers un phénotype Th2, pourvoyeur d'IL-4 [146]. De surcroit, elles peuvent inhiber l'apparition de lymphocytes T CD8 activés [147].

Un phénomène nous intéresse tout particulièrement pour notre étude expérimentale : les CSM sont capables également d'inhiber la prolifération de lymphocytes T $\gamma\delta$ [148].

Lymphocytes T régulateurs ; les CSM agissent directement sur les lymphocytes T par l'intermédiaire du HLA-G soluble, ce qui induit leur permutation en phénotype régulateur [149]. De plus, l'infusion de CSM dans un hôte permet l'expansion de ces lymphocytes régulateurs *in vivo* [150].

Cellules dendritiques ; Il a été reporté que des cellules dendritiques activées et co-cultivées avec des CSM retrouvaient un état immature c'est-à-dire par définition, un état inducteur d'immunotolérance [151]. La réversion de l'activation des cellules par les CSM passe par la sécrétion de la prostaglandine E2 [152].

Neutrophiles ; les CSM ont montré la capacité d'atténuer voire d'inhiber le *burst oxydatif* des neutrophiles entraînant en conséquence leur survie [153].

Natural killers ; En expérience de co-culture, l'ajout de CSM sur une culture de NK activés par l'IL-2 propose une diminution de la prolifération de ces derniers ainsi qu'une baisse de la sécrétion d'IFN γ [154].

Macrophages ; *In vivo*, il a été montré que les CSM par contact cellulaire et par sécrétion de PGE₂ parvenaient à faire augmenter la sécrétion d'*interleukine 10*, cytokine immunosuppressive, des macrophages de la souris hôte [155].

Toutes ces capacités *immunomodulatrices* sont essentielles en vue de composer un traitement contre les cicatrisations anormales. Cependant, les CSM ne sont pas nativement *immunomodulatrices* ; pour qu'elles acquièrent un tel pouvoir, nécessaire pour traiter les problèmes causaux de cicatrisation, il est nécessaire qu'elles soient stimulées par des cytokines pro-inflammatoires au premier rang desquelles l'IFN γ [126]. En revanche, ces capacités *immunomodulatrices* ne sont pas exclusives des CSM puisque les fibroblastes, autres cellules stromales capables de se différencier en culture en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes, les possèdent également [156].

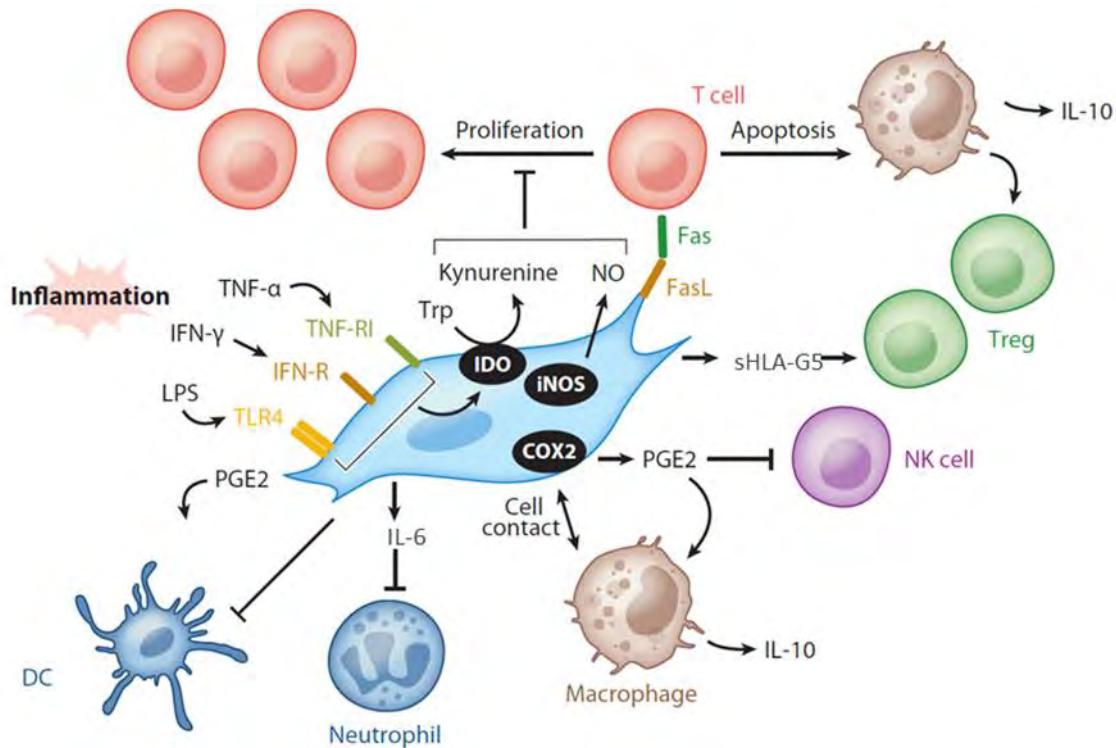


Figure 32 : Propriétés immunomodulatrices des CSM et les mécanismes associés. Schéma adapté de [126] et [136].

C. L'activité sécrétoire des CSM

Outre une activité *immunomodulatrice* dont les qualités peuvent proposer des bénéfices quant à la prise en charge de traumatismes tissulaires, les CSM sont utilisées également pour leur sécrétion conséquente de facteurs dits trophiques. Les facteurs trophiques sont un ensemble de facteurs protéiques, pour la plupart, qui possèdent des activités prolifératrices, de soutien et de nutrition des tissus biologiques.

Initialement utilisées comme cellules souches, les CSM ont montré une faible propension à coloniser les tissus et à suppléer les cellules détruites ; toutefois, les modèles pathologiques dans lesquels elles étaient utilisées montraient de nettes améliorations de leur état. Il s'est avéré que les mécanismes par lesquels les CSM amélioraient les conditions des modèles animaux découlaient de la sécrétion de facteurs pouvant réguler les dynamiques complexes des pathologies ou des traumatismes en présence.

Les sécrétions des CSM peuvent faire l'objet d'une classification en 4 groupes [131] [141] [157] :

- Facteurs mitogènes ;
- facteurs stimulateurs de l'angiogenèse ;

- facteurs pro-régénératifs / anti-cicatrisants ;
- facteurs anti-apoptotiques.

La plupart de ces facteurs sont résumés dans la figure 33 suivante :

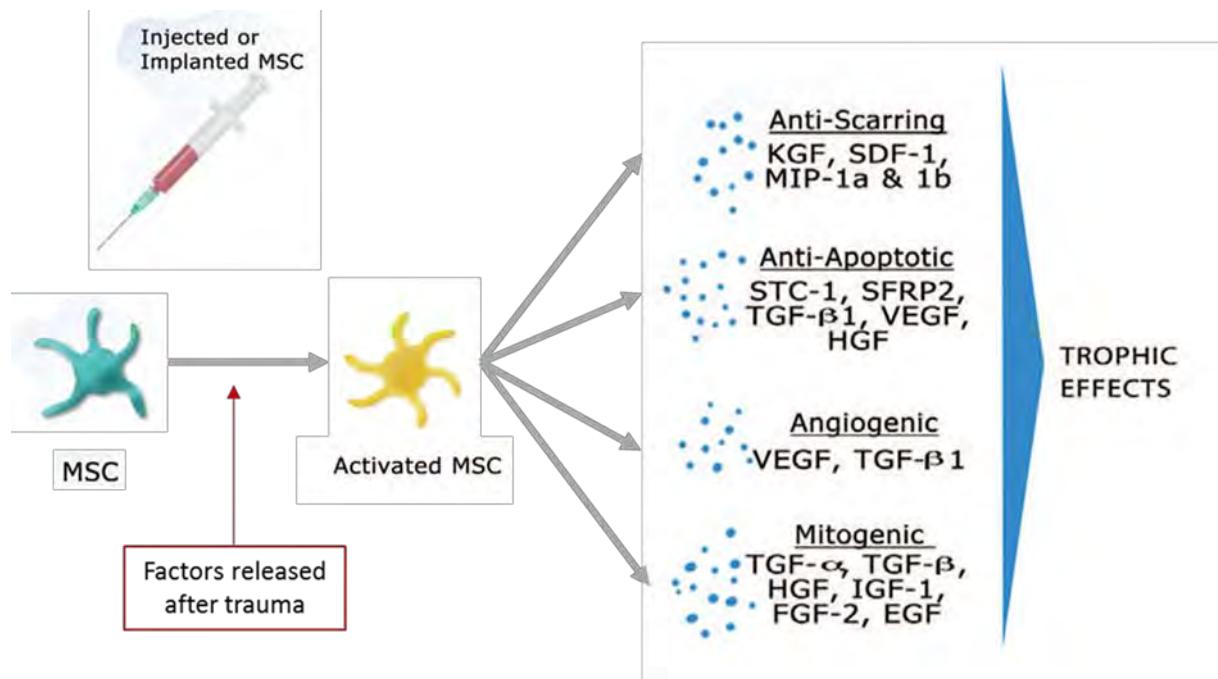


Figure 33 : Activité sécrétoire des CSM après stimulation par des facteurs circulants ou tissulaires sécrétées en réponse à un traumatisme ou une pathologie. Schéma adapté de [142].

De nombreux facteurs renseignés dans la figure 33 (*supra*) ont les qualités requises pour concourir à une accélération de la fermeture de la plaie ; le KGF, le HGF ou l'EGF sont des facteurs de croissance essentiels pour la réépithérialisation [41]. En outre, il a été remarqué que l'injection locale de milieux conditionnés de CSM au niveau d'excisions cutanées accélérerait la fermeture de ces dernières, signifiant que les sécrétions paracrinines de telles cellules suffisaient à améliorer le devenir de la cicatrisation des plaies [158].

De par leurs propriétés *immunomodulatrices*, en particulier anti-inflammatoires, et leurs sécrétions paracrinines accrues de facteurs de croissance, les CSM possèdent les qualités adéquates pour contrer deux des événements biologiques causales de la cicatrisation hypertrophique. Par contre, l'adjonction des CSM en vue de traiter des cicatrisations doit se faire, aussi bien pour qu'elles développent des propriétés anti-inflammatoires et un pouvoir sécrétoire particulier, dans les phases précocees après traumatismes en ceci que ce sont les

facteurs circulants et tissulaires qui activent les propriétés « médicaments » des CSM [141] [142].

D. Le choix des ASC (CSM dérivées du tissu adipeux) pour la prise en charge de la cicatrisation

Dans l'hétérogénéité des CSM, un sous-type détient depuis ces dernières années une place particulière : les CSM dérivées du tissu adipeux.

Leur facilité d'accès, l'abondance du tissu adipeux et l'augmentation des actes de chirurgie plastique font des cellules stromales du tissu adipeux une population très étudiée de CSM. De plus, la fréquence des CSM dans le tissu adipeux est supérieure à n'importe quels autres organes desquels elles sont recueillies (Figure 34).

Human tissue source	Native CFU-F concentration range per ml of fluid/tissue	MSC frequency range (CFU-F/10 ⁶ nucleated cells)
Bone marrow aspirate	109–664 ^a	10–83
Adipose/lipoaspirate	2058–9650	205–51000
Dermis	Not reported	74 000–157000
Umbilical cord blood	0.06	0–0.02
Peripheral blood	0	0–2 ^b
Synovial fluid	4–14	2–250
Amniotic fluid	3	9.2

^aBased on average of 8x10⁶ nucleated cells per ml bone marrow aspirate.

^bOccurrence of CFU-F in peripheral blood requires systemic treatment with GCSF.

Figure 34 : Concentrations et fréquences des CSM et de CFU-F issues de tissus adultes et fœtaux. D'après, [142].

Les CSM du tissu adipeux ont été identifiées pour la première fois en 2001 [159] ; dès lors, elles sont devenues une source privilégiée pour la médecine de la réparation.

De nombreux termes peuvent faire référence aux CSM du tissu adipeux ; toutefois, un consensus s'est créé en 2004 autour du terme ASC (*Adipose stem/stromal cell*) [160].

Comme toutes CSM, les ASC sont définies par les propriétés *in vitro* définies par l'ISCT :

- Adhérence au plastique ;
- multipotence vers le tri-lignage ostéo, chondro et adipocytaire ;

- les marqueurs CD105, CD90, CD73 positifs et les marqueurs hématopoïétiques négatifs.

En revanche, les ASC, à la différence des CSM de moelle osseuse, expriment à leur surface le CD34 dans les premiers temps de culture [161].

- **Différenciation *in vitro* et *in vivo***

Les ASC partagent les mêmes capacités de différenciation que les CSM de la moelle osseuse en culture ; par exemple, elles se différencient en ostéocytes aussi efficacement que ces dernières *in vitro* [162]. Cependant, les ASC possèdent quelques singularités : leur différenciation adipocytaire est plus aisée en culture que les autres CSM [163] ; leur différenciation *in vivo* en ostéoblastes reste difficile [164].

L'une des raisons du choix des ASC dans notre étude de cicatrisation cutanée est la propension de ces cellules à se différencier en adipocytes. Lors de la cicatrisation d'un traumatisme profond (atteignant le derme), l'hypoderme, couche cutanée profonde constituée principalement par des adipocytes, est perdue ; malencontreusement, cette couche donne la souplesse et une partie de l'élasticité de la peau [cf. Partie II, chapitre I]. L'utilisation des ASC dans notre modèle de cicatrisation pourrait augmenter la probabilité de recouvrir un linéament d'hypoderme et donc, pourrait participer à la constitution d'une cicatrice de meilleure qualité.

- **Les propriétés *immunomodulatrices* des ASC**

Les ASC partagent pour partie les capacités anti-inflammatoires des CSM de moelle osseuse dont notamment l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T [165]. Par ailleurs, à l'instar des autres CSM, pour que ces propriétés soient bien obtenues, il est nécessaire que les ASC aient perçu des signaux pro-inflammatoires [166].

- **Les sécrétions paracrines des ASC**

Les ASC sécrètent de multiples facteurs trophiques qui peuvent s'avérer essentiels pour la cicatrisation ; on peut citer par exemple le FGF-2, le VEGF, le HGF ou TGF- β 1 [167]. Ces sécrétions sont augmentées par l'hypoxie [168] ; d'ailleurs, une plaie est dans ces temps précoces hypoxique. Comme vu précédemment, les signaux tissulaires de lésions activent en

quelque sorte les CSM pour la sécrétion de facteurs pro-régénératifs ; l'hypoxie fait partie de ces signaux.

Les ASC possèdent néanmoins une particularité ; elles détiennent un potentiel *pro-angiogénique* supérieur aux autres CSM [169]. Cette capacité a été confrontée dans des pathologies ischémiques et a fait l'objet de plusieurs essais cliniques [170] [171].

- **Les ASC dans des modèles précliniques de cicatrisation cutanée**

Les capacités des ASC ont été mises à profit dans de nombreux modèles de cicatrisation cutanée. De manière générale, les ASC concourent à l'accélération de la cicatrisation quel que soit le modèle lésionnel proposé.

Plus spécifiquement ; dans un modèle de perforation cutanée chez la souris *Nude*, l'application d'un gel de collagène contenant des ASC directement sur la plaie conduit à l'accélération de la fermeture de la blessure [172]. De plus, dans un autre modèle de perforation cutanée traitée ou non par irradiation, l'adjonction d'ASC participe à l'amélioration de certains paramètres de la cicatrisation et ce, que l'on soit dans un modèle de cicatrisation sain (non irradié) ou pathologique (irradié) [173] ; en outre, il a été remarqué que des ASC co-cultivées avec des kératinocytes proposent une sécrétion de KGF plus élevée [173].

Enfin, dans un modèle de brûlure par ébouillantement, la greffe de tissu adipeux au niveau de la brûlure améliore la cicatrisation de la lésion en diminuant la fibrose cicatricielle [174]. Cette dernière est particulièrement intéressante dans le cadre de notre étude ; cependant, la thérapie était basée sur l'utilisation de tissu adipeux et non pas de ASC seules.

Considérant les propriétés et les capacités biologiques, les ASC semblent détenir les qualités requises pour mettre en œuvre une thérapie cellulaire dans le cadre d'une cicatrisation anormale. Les ASC possèdent des propriétés anti-inflammatoires aptes à lutter contre l'inflammation prolongée en partie responsable de l'hypertrophie cicatricielle post-brûlure ; en outre, les ASC possèdent des capacités sécrétoires essentielles pour la réépithérialisation des plaies dont en particulier, le KGF et l'HGF. En revanche, pour que ces qualités soient mises à profit, il est nécessaire d'adoindre les ASC dans les temps précoces du processus cicatriciel pour que ces dernières perçoivent les signaux de l'agression tissulaire.

Les singularités des ASC par rapport aux autres CSM en font des cellules adéquates pour des protocoles de thérapie cellulaire : leur facilité d'accès, leur fréquence relativement élevée dans leur tissu d'origine permettent d'en disposer suffisamment sans pour autant passer par des expansions conséquentes en culture ; l'expansion en culture pourrait augmenter la probabilité d'aberrations chromosomiques ou de transformation.

De surcroît, la capacité des ASC de se différencier plus facilement que les autres CSM en adipocytes peut constituer une force pour parvenir à obtenir une cicatrice de meilleure qualité.

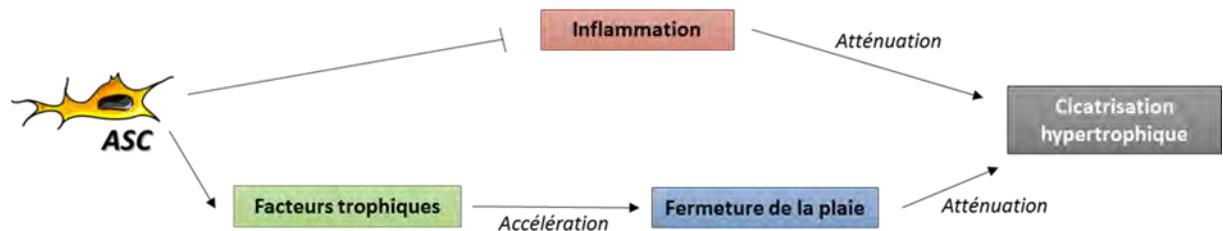


Figure 35 : Possibles mécanismes d'action thérapeutiques des ASC pour la prise en charge de cicatrisations excessives.

IV- Le plasma froid atmosphérique : nouveau dispositif dans la lutte contre les cicatrisations anormales ?

Lors de ce doctorat, nous avons également envisagé de mettre en place une stratégie de médecine « régénérative » quelque peu différente de la thérapie cellulaire. L'idée était d'essayer de mettre en branle les capacités endogènes régénératives de l'animal. Pour ce faire, il fallait disposer d'un outil capable de rappeler les phénomènes observés chez les animaux doués de régénération. Le principe était de pouvoir induire les vagues oxydatives et *in fine* apoptotiques décrites chez l'hydre, la planaire ou l'amphibien.

Le plasma, 4^{ème} état de la matière, présentait toutes les qualités requises pour répondre à ces attentes. En outre, et nous le verrons dans le chapitre suivant, au-delà de l'enthousiasme de l'idée précitée, le plasma détient des propriétés désinfectantes puissantes et également, induit l'apoptose de cellules mammifères. Ces deux propriétés restent très pertinentes dans le traitement des cicatrices hypertrophiques ; la désinfection serait apte à lutter contre l'inflammation prolongée, *dysphysiologie* causale de l'hypertrophie et l'apoptose grâce à l'immunosuppression qui en découle pourrait inhiber la réaction fibrotique immuno-dépendante, physiopathologie de l'hypertrophie.

Le terme « plasma » a été apporté par l'américain *Irving Langmuir* car la composition de la matière sur laquelle portaient ses travaux, lui rappela la composition hétéroclite du plasma sanguin [175]. De nature complexe (noyaux atomiques, élections, ions, espèces actives etc.), le plasma est l'état de la matière dans lequel des gaz ont subi une ou plusieurs ionisations (Figure 36). Cet état est obtenu, naturellement ou artificiellement, en soumettant un gaz à une énergie considérable, fut-ce thermique ou électrique. Cependant, à la différence des autres états de la matière, le plasma reste transitoire dans l'environnement dans lequel il évolue. Non présent à l'état naturel sur terre (à l'exception de la foudre), l'état plasma peut être obtenu à pression atmosphérique en soumettant un gaz à des décharges électriques de haute tension en laboratoire. Le développement par les physiciens de plasmas froids atmosphériques permet à présent d'envisager son utilisation dans les domaines de la biologie et de la médecine. La formation en pression atmosphérique est particulièrement intéressante en ceci que les animaux ou les patients pourront être traités sans l'utilisation d'enceintes confinées. La nature froide, inférieure à 40°C, est nécessaire car son utilisation ne surajoutera point de lésions.

Dans une première partie, nous décrirons très sommairement les sources de plasmas auxquels les chercheurs peuvent avoir accès (A). Dans un second temps, deux effets qui siègent à la médecine de la réparation seront discutés (B).

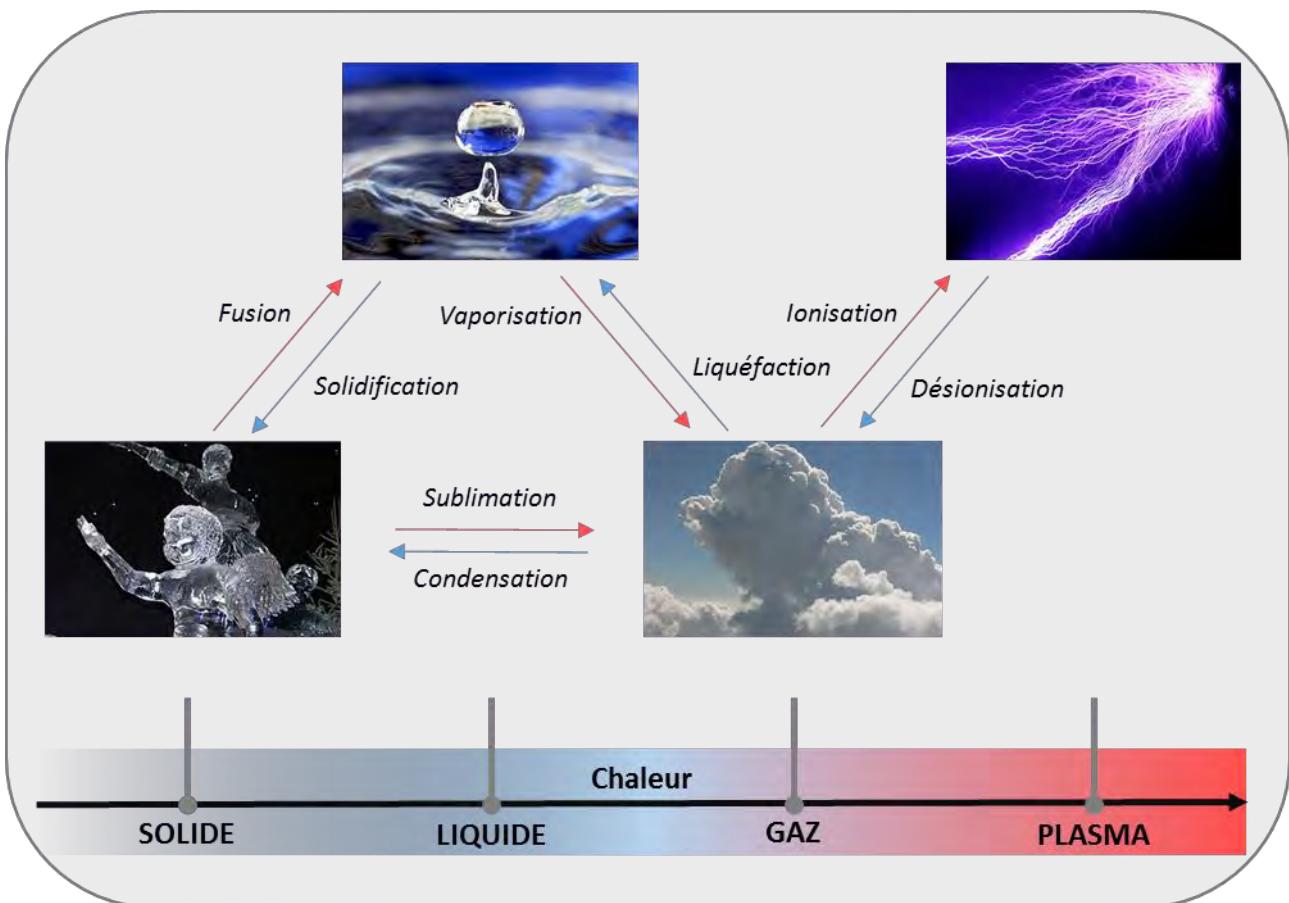


Figure 36 : Les quatre états de la matière. D'après, [176]

A- Les sources de plasma en laboratoire et en clinique

Les plasmas utilisés en biologie peuvent faire l'objet d'une dichotomie, les plasmas DBD et les plasmas jets (figure 37) [176].

Ne faisant l'objet de commercialisation, chaque appareillage détient des singularités ; singularités desquelles découlent des caractéristiques propres à chaque plasma. Autrement dit, chaque laboratoire utilise un plasma différent ; de ces différences, des effets dissemblables sur le vivant peuvent être appréciés.

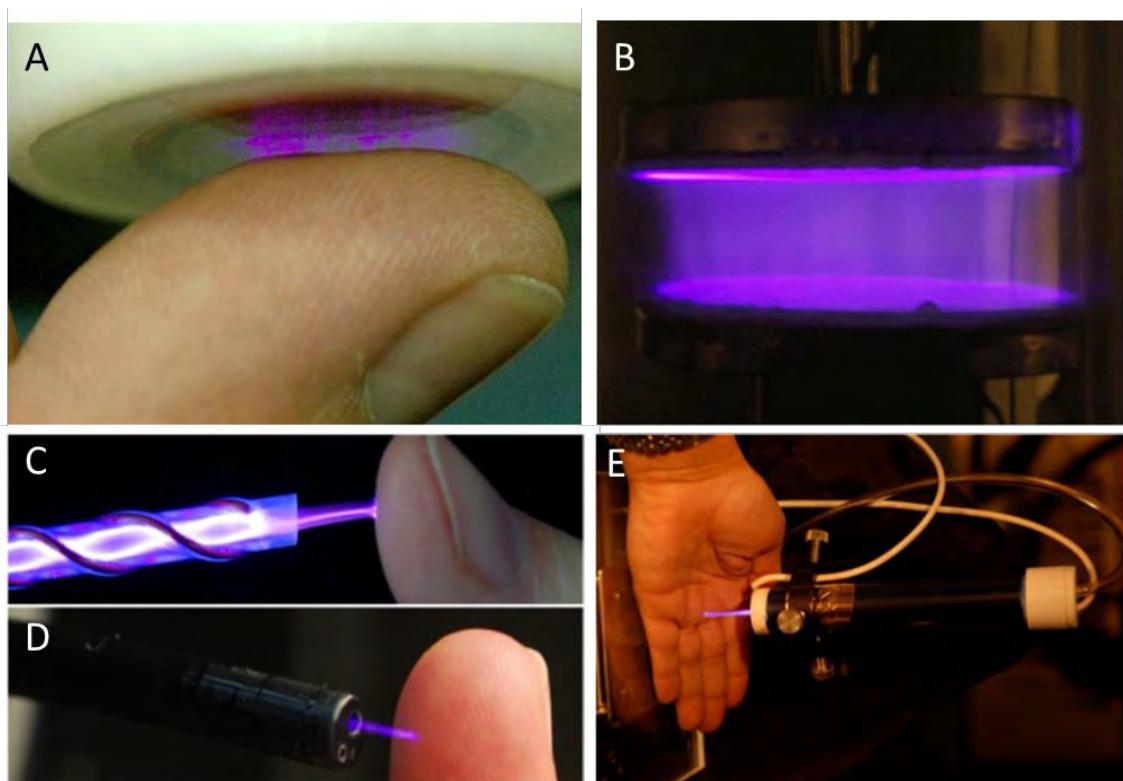


Figure 37 : Les sources de plasmas froids atmosphériques. D'après, [177].

A et B : Exemples de plasmas DBD. **C, D et E** : Exemples de plasmas jets.

1- Le plasma DBD (Dielectric Barrier Discharge)

Le plasma DBD est le plus couramment utilisé pour les applications biomédicales et ce, en particulier, pour le traitement des surfaces, la stérilisation des tissus et/ou la cicatrisation cutanée [176] [178].

L'appareillage DBD est composé, sommairement, de deux électrodes métalliques se faisant face et recouvertes d'un matériau diélectrique. Une électrode est reliée à un générateur de haute tension tandis que l'autre est reliée à la terre. Le gaz, généralement l'air ambiant, circule entre les deux électrodes où il sera ionisé.

L'appareillage utilisé sur tissu vivant est quelque peu modifié. En effet, l'électrode terre est remplacée par une électrode dite flottante et en l'occurrence, pour des actes cliniques, la surface cutanée [179].

L'appareil DBD permet de traiter des surfaces qu'à quelques millimètres de sa source (Figure 38). En outre, il produit de nombreuses espèces actives, peu de rayonnements ultra-violets mais peut engendrer de substantiels échauffements de la zone à traiter [180].

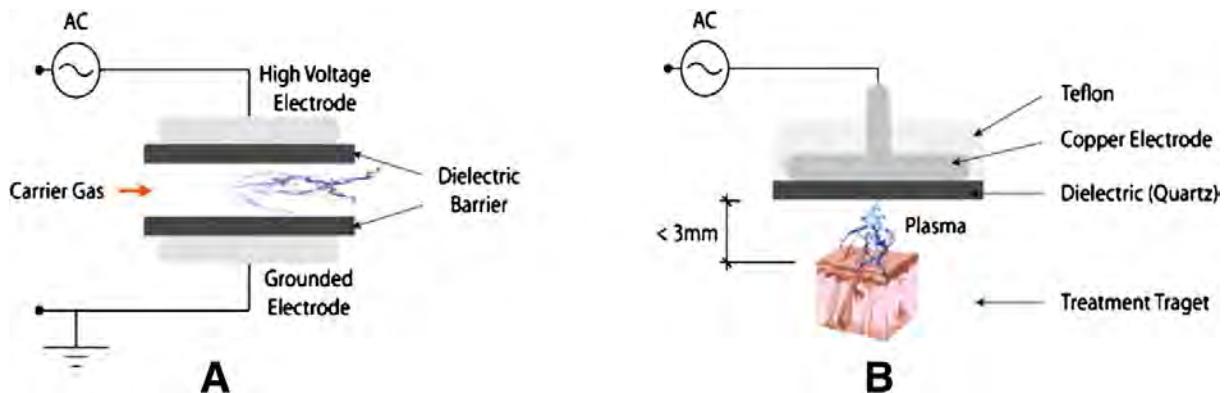


Figure 38 : Plasma DBD commun et plasma FE-DBD. D'après, [181].

A. Appareillage DBD. B. Appareillage FE-DBD (Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge).

2- Le plasma Jet

L'appareillage *Plasma Jet* est constitué de deux électrodes contenues dans un tube diélectrique. Ici, un gaz noble (hélium ou argon) chemine à travers le tube dans lequel des décharges de hautes tensions sont appliquées. Le gaz est donc ionisé dans une enceinte confinée et sera guidé vers l'atmosphère ambiante selon l'axe de la source. Il existe autant d'appareillages *plasma jet* que de laboratoire de recherche sur le plasma ; celui utilisé dans notre étude était un *plasma streamer* (Figure 39).

Dans un premier temps, le plasma produit des espèces dérivées du gaz porteur ; en revanche, lorsque le plasma généré atteint l'air ambiant, ce dernier va connaître une excitation de laquelle des espèces actives de l'oxygène et de l'azote vont être produites [181]. Nonobstant, il est possible de faire varier les gaz porteurs du plasma pour modifier les espèces générées ;

on peut notamment rajouter de l'oxygène ou de l'hydrogène en vue de produire des espèces actives associées, dans l'enceinte où est généré le plasma.

Le plasma jet présente quelques avantages pour une application sur des surfaces vivantes. La source du plasma peut être située à plusieurs centimètres de la zone à traiter limitant les risques électriques et thermiques.

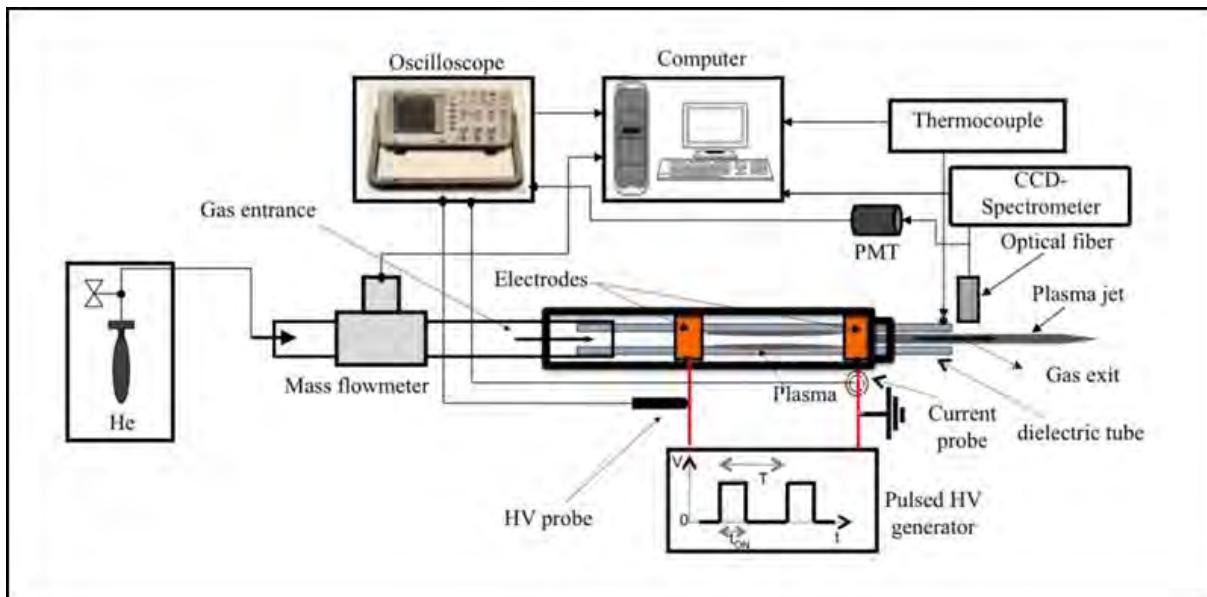


Figure 39 : Appareillage délivrant un jet de plasma (guided streamer) froid atmosphérique.
Appareil réalisé par Franck Clément, MCF, Université de Pau.

Pour notre étude, les gaz porteurs à partir desquels le plasma est généré étaient l'hélium (100 %) et l'oxygène (1%). Le générateur va délivrer des pulses de haute tension (5 kV) et de basses fréquences (10 kHz) concourant à la formation du plasma froid et ce, à pression atmosphérique.

B- Les deux effets des plasmas froids atmosphériques pertinents à la médecine de la réparation

L'utilisation des plasmas en médecine est, somme toute, assez ancienne ; toutefois, ces dernières années, les plasmas froids connaissent un véritable engouement. L'apport des plasmas se fait ressentir dans des domaines variés, allant de la stérilisation des outils chirurgicaux aux traitements des plaies infectées [180] [182] [183].

Deux aspects effectifs nous concernent tout particulièrement dans le traitement des cicatrisations excessives par le plasma froid : le pouvoir stérilisant du plasma, potentiellement capable de calmer une inflammation post-lésionnelle, et l'induction de l'apoptose chez des cellules mammifères au travers de la génération d'espèces actives de l'oxygène ; une telle

apoptose, si quantitativement conséquente, pourrait emporter une immunosuppression inhibitrice de la phase de dépôt matriciel de la cicatrisation.

1- Le pouvoir stérilisant du plasma

Le pouvoir stérilisant du plasma froid a déjà été testé en clinique sur des plaies infectées [182]. A l'issue de la phase II d'un essai clinique, des résultats se sont montrés très encourageants puisqu'une partielle décontamination a pu être observée et une fermeture des plaies s'est produite et ce, sans effets adverses majeurs [182].

D'autres études ont relaté que l'application du plasma froid, ne serait-ce que quelques secondes, parvenaient à désinfecter de manière synchronisée le dos et la région palmaire de la main [184] ; cet aspect pourrait révolutionner – si bien utilisé – tout un pan des mesures hygiéniques, que cela soit pour le public et pour les professionnels de santé.

De récentes découvertes ont pu mettre à jour les mécanismes par lesquels le plasma détient des qualités stérilisantes [185] [186] [187] [188]. En effet, il s'avère que les plasmas froids produisent leurs effets sur la plupart des microorganismes ; effets qui peuvent être qualifiés de propriétés bactériostatiques ou bactéricides, fongicides et également, qui sont efficaces contre les virus.

Pour comprendre les mécanismes par lesquels le plasma détient ces faramineuses propriétés désinfectantes/stérilisantes, il est nécessaire de revenir sur la composition de cet état de la matière. Sa composition, comme dit précédemment, est très hétéroclite allant des espèces actives des atomes en présence, aux champs électriques et particules chargées, passant par des émissions radiatives ultraviolets. En outre, la rencontre du plasma avec l'atmosphère surajoute à la formation d'espèces actives de l'oxygène et de l'azote. Si bien que chaque particule ou molécule émises par le plasma possède à elle-seule des propriétés toxiques pour les microorganismes.

Les espèces actives de l'oxygène et de l'azote possèdent des propriétés toxiques pour l'ensemble des cellules des organismes vivants, passant de la cellule procaryote à la cellule eucaryote. Les plasmas froids produisent ou concourent à la formation de H_2O_2 , de l'anion *superoxyde* ou du radical hydroxyle, espèces à effets bactéricides certains à des concentrations relativement élevées [189]. En outre, nous pouvons ajouter la possibilité de formation d'acide hypochloreux si le plasma, avec les espèces actives qui le composent et qu'il produit, entre en contact avec des liquides biologiques (plaies) dont les effets bactéricides se surajouteront aux espèces précitées.

Bien que la prééminence des espèces actives soit souvent mise en exergue, les radiations UV et les champs électriques qui composent les plasmas froids possèdent également des effets bactéricides patents. Les radiations UV induisent des cassures dans l'ADN entraînant subséquemment, dans la plupart des cas, la mort cellulaire ; par ailleurs, cet effet n'est pas spécifique du type cellulaire ; si bien qu'elles possèdent un effet délétère sur les cellules de l'hôte à traiter ; toutefois, nous pouvons faire varier la composition des gaz porteurs du plasma pour atténuer la formation d'UV [190]. Enfin, les charges et champs électriques ont la capacité de déstabiliser les membranes biologiques concourant à la mort des cellules bactériennes [191] [192] ; singulièrement, cet effet détient une certaine spécificité biologique puisque la sensibilité des cellules eucaryotes aux champs électriques est moindre que celle des cellules procaryotes [193] ; ceci est un autre argument en faveur de la désinfection des plaies par un dispositif délivrant un plasma froid.

La première qualité des plasmas froids pour le traitement des plaies reste sa propriété stérilisante qui, semblerait-il, soit supérieure aux produits communs cliniques et industriels. Cette qualité pourrait, en désinfectant la plaie, calmer l'inflammation post-lésionnelle dont l'intensité et la durée dépend pour partie d'une infection pathogénique.

2- Effets des plasmas froids sur les cellules mammifères : apoptose et autres événements

Les plasmas froids, nous le verrons, produisent des effets particuliers sur les cellules mammifères selon les modalités d'application utilisées [189] ; ses effets vont de la stimulation de la prolifération à l'apoptose ; cependant, il ne faudrait oublier que l'apoptose peut être perçue par les cellules environnantes comme un signal de prolifération [32].

À de faibles doses (faibles temps d'exposition principalement), le plasma est capable d'induire la prolifération de cellules endothéliales ; cette prolifération *in vitro* a été montrée dépendante de l'expression et de la sécrétion du FGF-2 [194]. De manière intéressante, lorsque les radicaux hydroxyles et le peroxyde d'hydrogène sont piégés respectivement par du mannitol et une catalase, la prolifération endothéliale est abolie ; en outre, une absence de FGF-2 dans le milieu de culture est notée par les auteurs [195].

À de faibles doses également, il a été constaté que des plasmas portés par l'hélium participaient aux détachements de cellules de type fibroblastiques de la surface de boîtes de

culture ; néanmoins, les cellules ainsi traitées restèrent viables et pouvaient être réensemencées [196] [197].

Lorsque des doses plus élevées sont utilisées par les expérimentateurs, des événements de morts cellulaires sont décrites. Selon le temps d'exposition et la tension appliquée pour générer le plasma, cette mort cellulaire peut être décrite soit comme une apoptose, soit comme une nécrose. Des travaux sur des lignées cellulaires dérivées de l'organisme mammifère montrent, selon les doses appliquées, que des événements d'apoptose se produisent avec comme cause prédominante une élévation de la quantité intracellulaire et environnante d'espèces actives de l'oxygène [198] [199]. Toutefois, les cellules restent des lignées dérivées de cellules épithéliales ; des événements de morts cellulaires sur des cultures primaires non seulement épithéliales mais également fibroblastiques ne sont encore que peu appréciés.

En ce qui concerne les effets du plasma sur tissus vivants, en l'occurrence l'organe tégmentaire, des dommages épidermiques et dermiques ont pu être rapportés sur deux lignées murines et le porc [178] [200] [201]. En revanche, l'application du plasma sur des peaux issues de patients décédées n'induit aucunes lésions tangibles [178] ; par contre, ces résultats sont à observer avec précaution puisque une matière inerte peut ne pas participer à répondre des effets biologiques du plasma. Bien que ces résultats semblent peu encourageants pour une application sur le vivant, l'atteinte cutanée en ses couches profondes est nécessaire pour que le plasma produise des effets sur des modèles ou des pathologies cicatricielles.

De par ses effets, les plasmas froids atmosphériques peuvent être proposés comme putatifs traitements pour les problèmes de cicatrisation ; d'ailleurs, ceux-ci ont montré leurs bénéfices sur des plaies chroniques infectées. De surcroît, les plasmas froids pourraient orienter favorablement les cicatrisations excessives en ceci que le pouvoir stérilisant saurait en premier lieu atténuer l'inflammation prolongée, vraisemblablement à l'origine de l'hypertrophie mais également dans un second temps, par des événements apoptotiques conséquents produire une immunosuppression probablement apte à inhiber l'immunité de type Th2 responsable du dépôt cicatriciel (Figure 40). Le dernier élément reste encore très hypothétique ; cependant, l'ingestion de corps apoptotiques par des macrophages permet leur permutation en phénotype régulateur pourvoyeur d'IL-10 ; l'IL-10, cytokine immunosuppressive, fonctionne entre autre en produisant et recrutant des lymphocytes T régulateurs, principaux acteurs de l'immunosuppression [cf. Partie I du manuscrit].

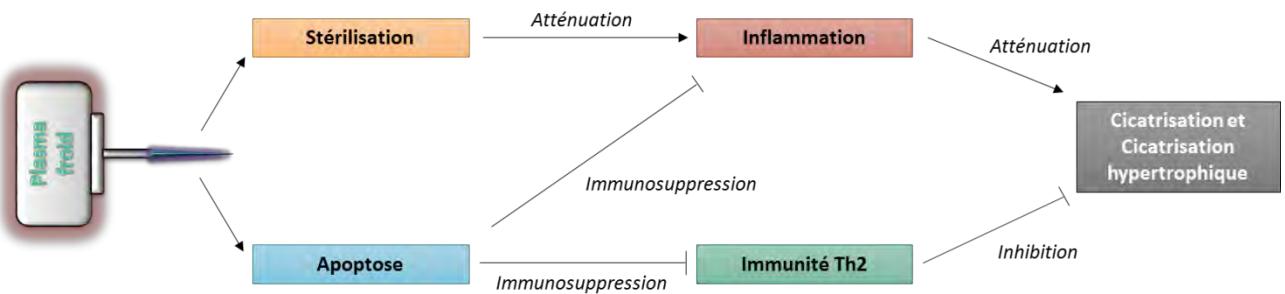


Figure 40 : Possibles mécanismes d'action thérapeutiques des plasmas froids pour la prise en charge de cicatrisations excessives.

Partie III

Etudes expérimentales

I- Objectif

Il s’agissait, dans ce travail de thèse, de dégager une stratégie de médecine « régénérative » efficiente dans un contexte lésionnel de brûlure profonde. L’intention scientifique était en effet d’élaborer un traitement innovant qui permettrait d’atténuer voire d’empêcher le développement de cicatrisations hypertrophiques et rétractiles observées au cours des réparations de brûlures profondes chez l’Homme.

Pour ce faire, deux stratégies ont été entreprises. Une première était fondée sur l’élaboration d’une thérapie cellulaire privilégiant les cellules souches/stromales du tissu adipeux humain (hASC). La seconde était, mettant de côté une thérapie cellulaire conventionnelle, de développer un traitement biophysique basé sur l’utilisation d’un plasma froid obtenu à pression atmosphérique.

Un paramètre important de l’étude, si ce n’est le plus important, était de disposer d’un modèle animal de brûlure profonde robuste se rapprochant de la réalité clinique. Il était impérieux de pouvoir standardiser un tel modèle afin d’apprécier les effets des traitements précités.

L’étude expérimentale s’articulera selon un plan en quatre parties. La première partie aura comme objet de présenter les particularités du modèle animal et l’adaptation qui a été proposée à partir du modèle original mis en place en 2009 au laboratoire. La deuxième mettra en exergue le « Matériel et méthodes » commun aux deux stratégies de médecine « régénérative » mise en œuvre. Dans une troisième partie, il sera lieu de décrypter les modes d’action par lesquels les cellules souches/stromales mésenchymateuses pourraient affecter substantiellement le devenir cicatriciel de la brûlure. Enfin, la quatrième partie décrira la mise en place de la thérapeutique basée sur l’utilisation du plasma froid et les résultats obtenus après application cutanée du traitement. La troisième et quatrième se concluront chacune par une conclusion et discussion spécifique et distincte.

II- Le modèle de blessure : la brûlure du second degré profond dans un modèle murin

A mon arrivée au laboratoire, un modèle de brûlure profonde avait été préalablement mis en place par Ambre de Berail et utilisé en routine par Olivier Abbo, internes en chirurgie pédiatrique.

Le modèle animal était approuvé par les instances réglementaires et, référencé sous le numéro *MP/04/63/11/11*. La brûlure par ébouillantement est une lésion ayant une prévalence très élevée en ce qui concerne les accidents domestiques chez l'enfant et elle fut choisie sur ces considérations. En outre, l'évolution de la cicatrisation d'une telle lésion reste hasardeuse (cf. chapitre III, partie I). Soit elle cicatrise relativement bien auquel cas l'individu sera pris en charge selon les procédures cliniques standards, soit le patient développe une cicatrisation hypertrophique et rétractile auquel cas les praticiens restent relativement impuissants et dans l'attente de nouvelles solutions thérapeutiques efficaces.

A. La souris *Nude* comme modèle animal



Figure 41 : La souris *Nude*

La première étape dans la réalisation d'une nouvelle stratégie thérapeutique avait été de générer un modèle animal pertinent, avec des caractéristiques biologiques assez semblables à celles de l'Homme de sorte que les résultats obtenus soient transposables chez les deux espèces. Ainsi, l'utilisation d'un modèle de souris *Nude* a été privilégié en première intention pour les avantages suivants : elle est, comme son nom l'indique, glabre ; elle dispose d'un système immunitaire capable de répondre par une inflammation relativement normale ; elle présente une immunotolérance.

La souris *Nude* fut observée pour la première fois en 1966 dans un laboratoire de Glasgow. L'apparition de cette souris glabre résultait d'une mutation spontanée chez une souche de souris albinos, la souche *BALB/c* [202]. Ce fut seulement quatre ans plus tard qu'il a été

remarqué que cette nouvelle lignée de souris présentait une aplasie thymique [203]. De par cette dégénérence, la souris *Nude* présente un répertoire de lymphocytes T relativement amoindri ; en conséquence, ce modèle murin fut adopté pour l'étude de greffe xénogénique et en particulier, de greffe de tumeurs humaines en vue d'explorer le comportement cellulaire tumoral tout en recherchant des thérapeutiques efficaces.

La glabreté est un atout majeur en ceci qu'elle permet d'accéder directement à la peau sans manipulation potentiellement délétère pour l'intégrité de la surface cutanée. En effet, la pilosité des autres souris nécessiterait un rasage ou une épilation. En outre, cette particularité rappelle celle de l'Homme, même si on peut objecter que la glabreté humaine n'est qu'apparence³¹.

Pour qui a essayé de raser une souris, il saurait que les rasoirs du commerce ou électriques à sabot sont inutiles pour obtenir une peau débarrassée de son duvet. Pour raser au près une souris, il faut disposer soit d'un rasoir à rabot, soit d'un scalpel. Ensuite, il suffirait d'entreprendre le rasage consciencieusement sans induire de lésions. Des tentatives ont été donc réalisées sur des souris de la souche C57BL/6. Immanquablement, des lésions cutanées ont été produites.

Ne restait que l'épilation. L'épilation à la pince a été proscrite car jugée infaisable. La seule possibilité qui restait, était la crème dépilatoire. Le problème est que celle-ci laisse des rubéfactions apparaître sur la peau des souris.

Une peau parfaitement lisse pour reproduire des brûlures standardisées ne pouvait être, donc, retrouvée que chez la *Nude*.

La souris *Nude* est capable de développer une inflammation comparable aux autres souris immunocompétentes [cf. paragraphe n°3 de ce chapitre]. La *Nude* est une souris *athymique*. Elle présente de ce fait un système immunitaire diminué. Nonobstant, elles disposent de l'ensemble du répertoire leucocytaire avec toutefois, des lymphocytes T non éduqués. La souris *Nude* reste, malgré son athymie, un modèle inflammatoire relativement pertinent.

Nous avions dans l'esprit de tester l'efficacité des cellules mésenchymateuses humaines. Il eut été alors obligatoire de disposer de souris incapables de développer un rejet de greffe. Les souris SCID ou RAG $-/-$, autres souches de souris *immunodéficientes*, présentent une

³¹ Comme décrit dans la *partie II, chapitre I*, l'Homme possède une densité pileuse certaine. Cependant, les poils étant trop fins, l'accessibilité de la surface cutanée est semblable à celle de la souris *Nude*. De surcroit, la souris *Nude* dispose également de follicules pileux.

inflammation insatisfaisante en ce sens que les composantes immunitaire de ces animaux sont bien trop altérées. Le choix le plus satisfaisant restait selon ces critères, la souris *Nude*.

B. Le protocole expérimental de brûlure par ébouillantement

Le protocole de brûlure consistait en l'immersion de 1 cm² de surface cutanée dans de l'eau portée à 70 degré Celsius et ce, pendant 10 secondes. La zone brûlée devait se retrouver à un endroit inaccessible à la souris de sorte qu'elle ne puisse y toucher. En conséquence, la zone choisie fut le dos de la bête dans un espace délimité en crânial, par les saillies scapulaires et en caudal, par les saillies des crêtes iliaques.

Nous disposions de :

- Compresses stériles ;
- pansements étanches de type Algoplaque® (URGOmedical) ;
- thermomètre ;
- récipient métallique ;
- bouilloire ;
- champs stériles.

La procédure est détaillée dans la figure 42 qui suit :

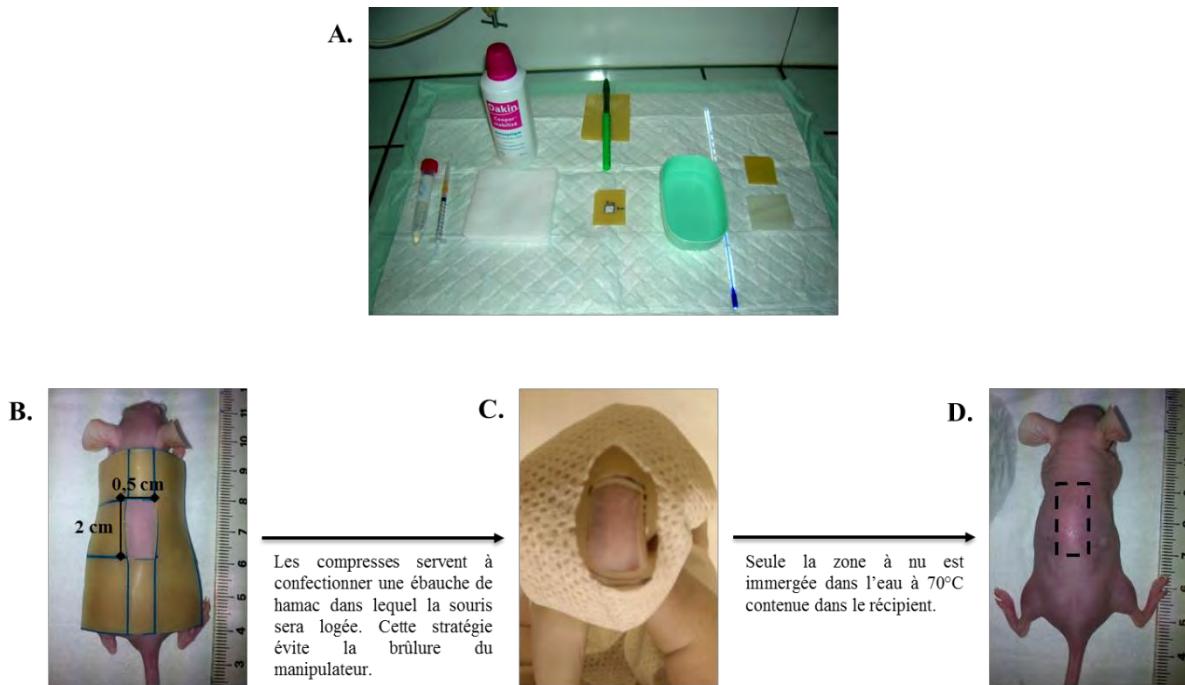


Figure 42 : Réalisation de la brûlure.

A. Le matériel. **B.** La souris sous anesthésie générale est recouverte d'un pansement algoplaque dans lequel a été procédée une encoche rectangulaire de 1 cm². **C.** La souris dans son « hamac ». **D.** Une rubéfaction et une légère desquamation apparaissent immédiatement après la brûlure. (Photographies d'Ambre de Berail, M2R et de Guillaume Perez).

La profondeur de la brûlure fut estimée selon des techniques histologiques standards c'est-à-dire par coloration en *hémalun-éosine* sur coupes de paraffine.

L'évaluation a été en premier lieu clinique et servait à apprécier le temps de stabilisation de la brûlure. Chez la *Nude*, mammifère de petite taille, le temps de stabilisation du traumatisme induit par la brûlure a été estimé à 48 heures [Ambre de Berail, M2R]. Autrement dit, après 48 heures, la destruction tissulaire était, pour ainsi dire maximale, en ce sens que la profondeur de la brûlure et les destructions collatérales n'allait plus évoluer dans le temps. Ensuite, la souris a été euthanasiée, la peau brûlée fut excisée et fixée dans une solution aqueuse de formol à 10% tamponnée à pH physiologique (pH = 7,4). La peau ainsi fixée fut incluse dans un bloc de paraffine de façon à ce que des coupes longitudinales soient confectionnées. La coupe longitudinale permit d'évaluer la profondeur de la brûlure tout le long du grand axe de la lésion (2 cm).

Dans un premier temps, mon travail a consisté de reproduire le modèle de brûlure pour valider la procédure standardisée (Figure 43).

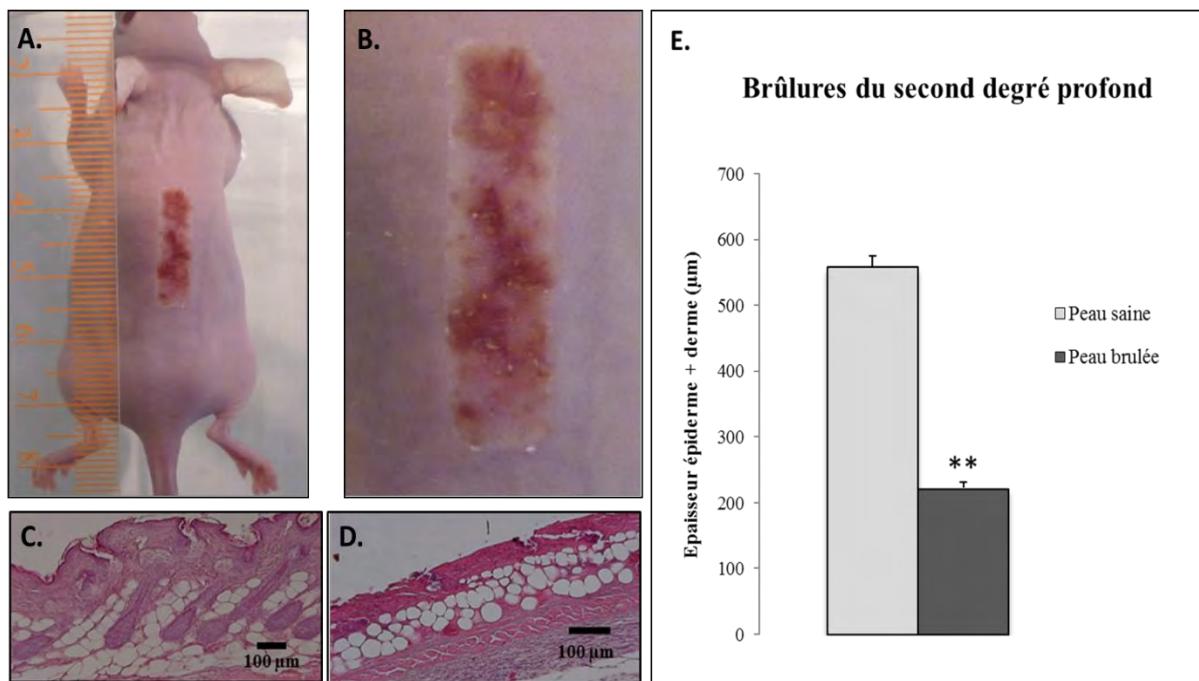


Figure 43 : La brûlure du second degré profond chez la souris *Nude*.

A. et B. Photographie macroscopique de la surface lésionnelle. C. et D. Coupes longitudinales colorées à l'hémalun-éosine de peau saine (C) et de peau brûlée (D). E. Epaisseur de peau 48 heures après brûlure. N = 5 ; Tous les résultats sont exprimés par la moyenne \pm ESM. ** p \leq 0.01.

Les résultats montraient que nous parvenions à reproduire chez la souris *Nude* une brûlure du second degré profond. En effet, l'observation histologique permit d'observer une perte tissulaire des couches dermiques jusqu'à l'hypoderme (Figure 43 D). L'hypoderme n'étant pas endommagé, les brûlures du troisième degré étaient de fait évitées. De manière plus satisfaisante, la répétabilité de la profondeur de la brûlure fut excellente puisque en moyenne, l'épaisseur de la peau lésée atteignait 222.412 μm avec une marge d'erreur de 8.055 μm (Figure 43 E).

Il était donc possible d'induire une brûlure de second degré profond chez souris *Nude* avec une relative précision et chose essentielle, avec une répétabilité certaine. Cependant, la brûlure est une lésion malcommode à réaliser, le protocole doit être par conséquent appliqué scrupuleusement dans un environnement calme et non anxiogène que ce soit pour l'expérimentateur ou l'animal.

C. Critiques du modèle *Nude* pour la cicatrisation cutanée

La cicatrisation, comme discutée en partie I de ce document, fait appel dans ces différentes phases à l'immunité. Il s'avère par conséquent que la souris *Nude*, souris *immunodéficiente*, peut présenter certaines limites quant à son utilisation. À cet égard, les limites peuvent être discutées selon trois points :

- Appréciation d'un système immunologique moins déficient qu'il n'y paraît ;
- comparaison de la souris *Nude* avec les modèles murins de laboratoire immunocompétents pour l'appréciation de la cicatrisation ;
- le rôle des hormones sexuelles dans la réparation tissulaire.

1. Un système immunologique presque au complet

L'absence de lymphocytes T compétents laisserait envisager que les souris *Nude* ne puissent développer une inflammation solide et par conséquent, de proposer une cicatrisation à la mesure de la brûlure.

Toutefois, la souris *Nude* présente tout le répertoire leucocytaire myéloïde mais également lymphoïde, qui en fait un modèle fréquemment utilisé dans des problématiques de cicatrisation cutanée.

En ce qui concerne l'immunité innée, principal participant de la cicatrisation, les souris *Nude* possèdent les polynucléaires, les mastocytes mais également les macrophages et ce, avec une activité normale voire augmentée [206] [207]. En outre, il est observé une présence quantitativement normale des *Natural killer* avec par contre, une activité supérieure à celle des lignées immunocompétentes [208] [209]. De surcroit, la souris présente une production similaire que les autres souris d'interféron gamma, cytokine impliquée dans l'inflammation et les défenses antivirale et antibactérienne [204]. Enfin, la résistance aux pathogènes intracellulaires restent particulièrement efficace en comparaison aux souches *euthymiques* [205]. L'activation de l'inflammation par l'immunité innée ne devrait par conséquent n'être que très légèrement affectée chez la souris *Nude*.

Pour ce qu'il est de la biologie des lymphocytes T chez la souris *Nude*, les interrogations sont plus nombreuses.

La souris *Nude* présente en fait tous les lymphocytes existant ; les lymphocytes T sont bien présents chez la *Nude*. Cependant, leur développement et leur biologie restent particuliers en

ce sens que le peu de thymus restant ne peut remplir son rôle de maturation sur ces cellules immunitaires. Néanmoins, il s'avère que les lymphocytes de souris *Nude* trouvent maturation dans des organes lymphoïdes autres que le thymus, maturation qui augmente avec l'âge [212] [213]. Les souris *Nude* disposent en nombre de lymphocytes T CD8 actifs avec prédominance de récepteurs composés des sous-unités γ et δ bien que qu'il puisse exister des lymphocytes T présentant des récepteurs constitués des sous-unités α et β [210] [211]. La composante la plus affectée par la mutation de la souris *Nude* reste la population lymphocytaire T CD4. Toutefois, avec l'âge, les souris *Nude*, même si elles gardent une population immature conséquente viennent à disposer de lymphocytes T CD4 compétents [212] [213].

Comme précité, les lymphocytes T de la souris *Nude* disposent principalement des sous-unités γ et δ constitutives de leur récepteurs. Cette particularité s'est révélée être intéressante en ce qui concerne notre modèle de brûlure. En effet, les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont les cellules lymphoïdes particulièrement actives lors de la prise en charge du traumatisme post-brûlures [107]. La souris *Nude*, disposant de ce type lymphocytaire en nombre, paraît apte à lutter contre l'agression tissulaire induite par les brûlures.

Au vu de toutes ces caractéristiques immunitaires, il y a lieu de penser que l'inflammation proposée par la brûlure chez la souris *Nude* soit relativement appréciable et peu altérée en comparaison à un modèle parfaitement immunocompétent.

2. Comparaison de souris *Nude* et des souris *C57BL/6* pour l'appréciation de la cicatrisation

La lignée *C57BL/6* est utilisée comme modèle murin de référence pour étudier les processus de cicatrisation. Nonobstant, il est impérieux de remarquer que pour cette lignée murine présente également une réponse immunitaire singulière. En effet, la lignée *C57BL/6* est un « prototype Th1 » de réponse immunitaire innée [214]. En d'autres mots, les souris *C57BL/6* ont tendance à développer une réponse inflammatoire exacerbée [214]. En intégrant la connaissance que les cytokines pro-inflammatoires sont prolifératives et participent à la formation du tissu de granulation [*cf.* Partie I, II], il y a lieu de penser que la cicatrisation proposée par les souris *C57BL/6* soit quelque peu particulière.

Nous avons en conséquence mené quelques manipulations pour interroger cette hypothèse.

En premier lieu, il a été choisi de regarder la cicatrisation de perforations cutanées. Pour ce faire, un carré de 1 cm² a été excisé de la surface cutanée dorsale de souris *C57BL/6*. Il s'est avéré que les souris cicatrisaient en 7 jours et qu'une très légère trace cicatricielle était

observée au jour 10 post-traumatisme (Données non montrées). En comparaison avec l'Homme, cette cicatrisation s'avère particulièrement véloce.

En deuxième intention, il a été entrepris de comparer sommairement la cicatrisation de brûlures profondes de souris *Nude* et de souris *C57BL/6*. Ce faisant, nous voulions être confortés dans le choix de la *Nude* comme modèle de cicatrisation pour les brûlures.

Les souris *C57BL/6* ont été rasées au scalpel et brûlées au second degré selon le protocole précédemment décrit. La profondeur de la brûlure a été évaluée par techniques histologiques d'usage et la cicatrisation a été appréciée uniquement par observation macroscopique (Figure 44).

Comparativement aux souris *Nude*, les souris *C57BL/6* présentent, semblerait-il, une cicatrisation plus rapide. En effet, une cicatrice apparaît formée en 12 jours chez les *C57BL/6* (Figure 44 A). Visuellement, cette cicatrice qui remplace les tissus cutanés après brûlure chez la lignée *C57BL/6* apparaît fine et de très bonne qualité.

Sondre le derme à la recherche d'une fibrose serait très intéressant car macroscopiquement, on pourrait penser que la souris se répare sans cicatrice. Néanmoins, il est indispensable de faire les colorations histologiques adéquates afin de démontrer l'assertion précédée.

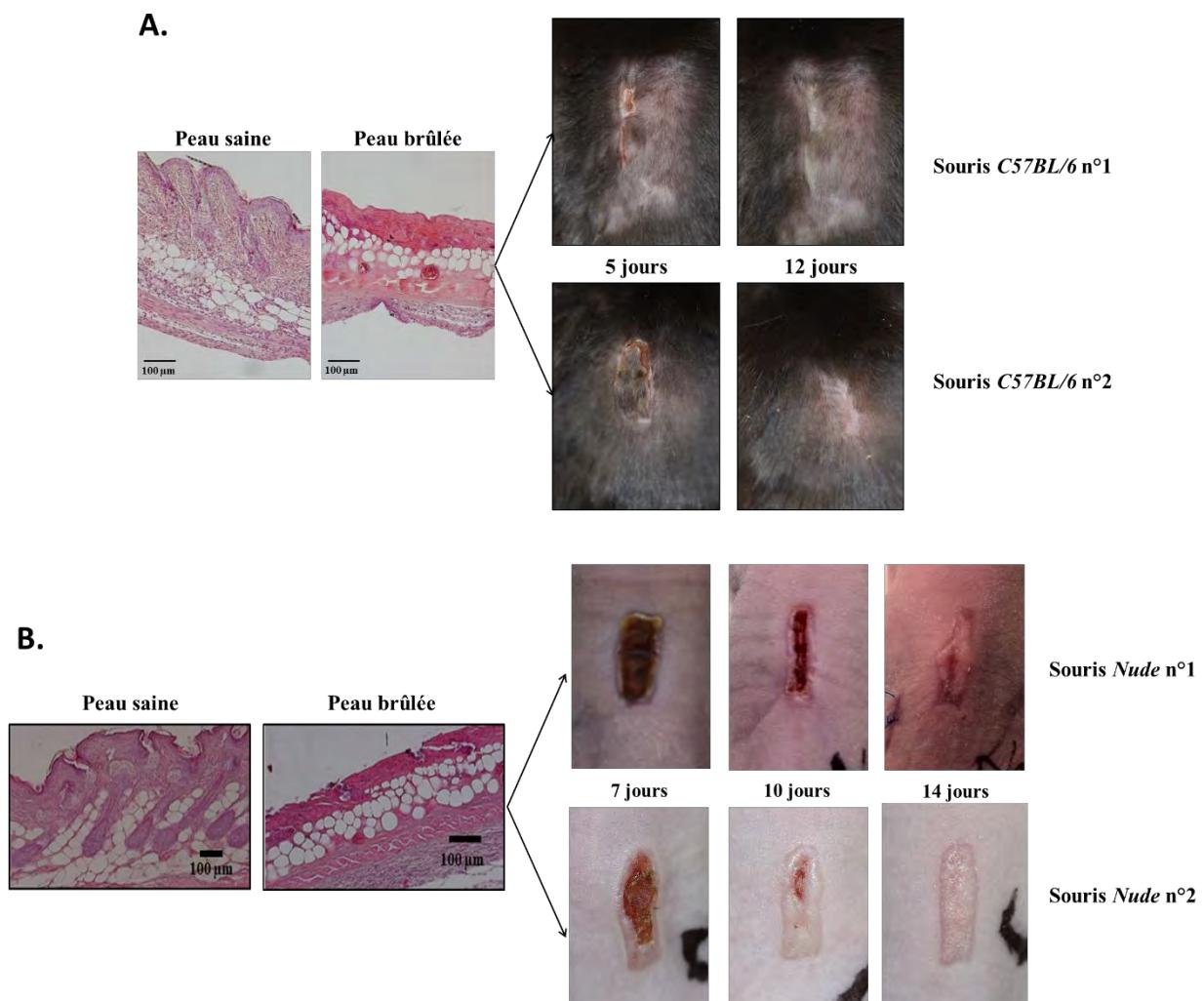


Figure 44 : Comparaison macroscopique de la cicatrisation de brûlure profonde chez la C57BL/6 et la Nude.

A. Brûlure profonde et aspect macroscopique de la cicatrisation chez la souris C57BL/6. **B.** Brûlure profonde et aspect macroscopique de la cicatrisation chez la souris Nude. L'histologie des peaux notées « brûlée » a été réalisée au jour 2.

Chaque animal a été traité 30 minutes après brûlures par une injection de solution isotonique de NaCl aux abords de la lésion. N = 8 pour les souris C57BL/6. Les souris Nude présentées sont les souris contrôles qui ont participé aux études expérimentales de ce travail de doctorat.

En ce qui concerne la souris Nude, la cicatrisation reste plus lente que la souris C57BL/6 puisque une cicatrice ne commence à apparaître qu'au jour 14 et est formée au jour 21. De plus, à l'inverse de la C57BL/6, la souris Nude laisse engendrer quant à sa cinétique de cicatrisation des tensions rétractiles à la lisière de la zone meurtrie (Souris Nude n°1, Figure 44 B). De surcroît, il s'est avéré que la souris Nude pouvait adopter une cicatrisation hypertrophique (souris Nude n°2, Figure 44 B) telle qu'elle est définie en clinique humaine i.e avec l'apparition d'un bourrelet qui reste dans les limites de la cicatrice initiale [110]. Ce paramètre est primordial quant à l'appréciation des effets des traitements sur le devenir

cicatriciel des brûlures en ce sens que l'Homme cicatrice, le plus souvent, selon une cicatrisation hypertrophique lors de traumatismes profonds induits par les brûlures [cf. Partie II, III].

Par contre, ces résultats, et ceux qui vont vous être présentés par la suite, sont en contradiction avec des études qui démontrent que la souris *Nude* répond à des lésions cutanées par des réparations sans cicatrice [215]. Pourtant, nous le verrons tout au long de ce travail de doctorat, nous retrouvions bien des fibroses dermiques conséquentes après cicatrisation de brûlures profondes chez la souris *Nude*.

Au vu de ces observations, la souris *Nude* comme modèle de cicatrisation nous ait donc apparu très pertinent.

3. Les souris *Nude* utilisées ont été *ovariectomisées*

Il existe une régulation par les hormones sexuelles de la cicatrisation cutanée [111] ; en effet, les œstrogènes, à l'inverse de la testostérone, ont un retentissement bénéfique sur les processus cicatriciels en partie, du fait, de leurs effets anti-inflammatoires et prolifératrices [216]. En conséquence et pour éliminer tout effet adossé aux hormones sexuelles, nous avons procédé à l'ovariectomie des souris femelles avant toutes utilisations. Pour ce faire, des souris de 4 semaines ont été *ovariectomisées* sous anesthésie gazeuse. Leur jeune âge garantissait l'absence d'imprégnation *œstrogénique* des tissus. Les brûlures ont été réalisées après une période de convalescence de deux semaines. De fait, nous nous affranchissons des bénéfices des œstrogènes et en conséquence, des effets observés du traitement, nous ne verrions que ceux de notre thérapeutique.

III- Matériel et méthodes commun aux stratégies de médecine « régénérative » mises en œuvre lors de ces travaux de doctorat

A. Réalisation de la brûlure au deuxième degré profond

Des souris *Nude* (*BALB/cOlaHsd-Foxn1nu*, *Harlan Laboratories*) femelles âgées de 4 semaines ont été *ovariectomisées*. Un intervalle de 15 jours a été retenu pour procéder aux brûlures cutanées. Les animaux ont été hébergés en cage collective, en atmosphère contrôlée avec accès illimité à l'alimentation et à la boisson (hébergement en portoir ventilé du service de zootechnie du CHU Rangueil). Les souris *Nude* ont été traitées en accord avec le protocole validé par le service de zootechnie de l'IFR 150 à Rangueil n° 08/5241/B14 et par le comité régional d'éthique de Midi-Pyrénées n° MP/04/63/11/11 pour la thérapie cellulaire tandis que le traitement par plasma froid était validé sous le n°CEEA-122 2014-42.

Nous avons modifié le modèle animal développé par A. de Beraïl en 2009 et optimisé par O. Abbo en 2010. L'anesthésie a été réalisée par injection intra-péritonéale d'une solution de *NaCl* 9%, *Kétamine* et *Xylazine* (7ml de *NaCl* 9%, 2ml de *Kétamine* à 100mg/ml et 1ml de *Xylazine* à 2%) à la posologie de 0,05 ml/kg. Un pansement protecteur type *algoplaque* avec une fenêtre rectangulaire de 1cm² est placé sur la partie dorsale de l'animal. Une exposition par immersion de 10 secondes dans une eau portée à 70°C permet de créer une brûlure du 2ème degré profonde. L'analgesie post-lésionnelle est assurée par adjonction de chlorhydrate de *tramadol* (solution à 50000µg/ml, laboratoire *Grunenthal*) à l'eau de boisson à la posologie de 4,3 mg/kg par jour soit 0,085mg/24h pour une souris de 20g.

B. Histologie

Les protocoles de fixation, d'inclusion et de coloration utilisés furent les mêmes pour l'évaluation de la profondeur de la lésion que pour l'appréciation de la cicatrice.

D'abord, les souris furent anesthésiées avec une solution de *Kétamine/Xylazine* à la posologie respectivement de 10 mg.kg⁻¹ et 50 mg.kg⁻¹. Après endormissement, la lésion fut excisée en suivant les abords lésionnels tout en laissant une partie de peau saine en haut et en bas de la blessure (Figure 45). Après excision, la peau lésée récupérée est fixée pendant 72 heures à l'aide d'une solution de formol à 10 % tamponnée à pH 7,4. Après fixation, la peau est coupée en deux selon un axe sagittal. Ensuite, les deux parties obtenues sont orientées suivant

leur axe longitudinal puis sont fixées à l'aide d'aiguilles entomologiques à la cassette d'inclusion à paraffine (Figure 45).

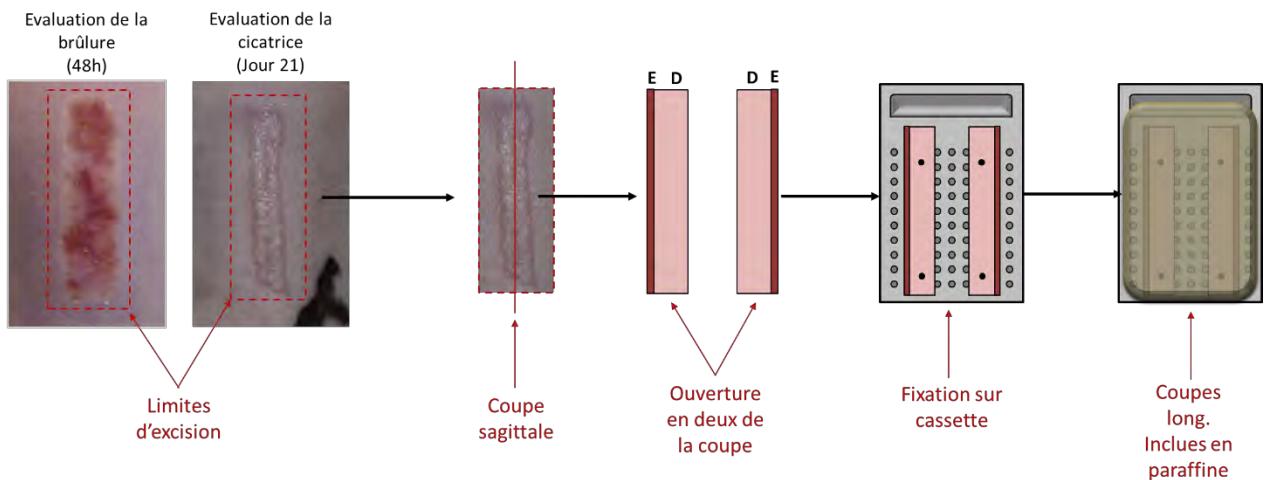


Figure 45 : Protocole d'inclusion en paraffine.

E = épiderme ; D = Derme.

L'inclusion terminée, les coupes sont confectionnées au microtome. Les coupes finales obtenues présentaient donc la peau lésée en son milieu selon le grand axe de la blessure (Figure 45).

Les colorations utilisées ont été un *hémalun-éosine* pour l'évaluation de la profondeur de la brûlure et un *trichrome de Masson* – avec un *vert-lumière* comme colorant pour les fibres de collagène – pour l'évaluation de la cicatrice.

C. Obtention des cellules souches/stromales mésenchymateuses du tissu adipeux

La récupération des cellules souches/stromales mésenchymateuses nécessite la possession du substrat primaire duquel elles proviennent, le tissu adipeux et en l'occurrence, dans cette étude, le tissu adipeux humain. Le tissu adipeux humain usité au laboratoire provient des produits de chirurgie plastique, en particulier des produits de *dermolipectomies* (DLA) issus des blocs opératoires du CHU Rangueil, service de chirurgie plastique et reconstructrice et ce, avec le consentement éclairé des patients.

Nous avons limité l'hétérogénéité des prélèvements en ne préparant les cellules qu'issues de :

- Donneurs jeunes (âge < 50 ans) car avec l'âge, certaines propriétés cellulaires sont modifiées, ce qui pourraient impacter les bénéfices que nous souhaitons leur attribuer [244] ;
- patients exempts de toutes maladies infectieuses ;
- donneurs dont l'indice de masse corporel est inférieur à 30³².

Lorsque le tissu adipeux humain remplit toutes ces conditions indispensables à leur utilisation, nous pouvons procéder à l'extraction des hASC (Figure 46).

La première étape est de fractionner mécaniquement le tissu à l'aide d'outils chirurgicaux stériles pour faciliter les traitements enzymatiques ultérieurs. Une fois cette étape procédée, il convient de traiter les fragments tissulaires obtenus par action enzymatique à 37°C sous agitation pendant 45 minutes. Naturellement, les enzymes choisies ont été des collagénases, protéases des collagènes, en ceci qu'elles sont capables de déstructurer et détruire les réseaux de collagènes et donc, de libérer les cellules qui y sont enchaînées. En revanche, l'utilisation des collagénases n'est pas anodine et leur utilisation peut soulever des limites biologiques en ce sens que leur présence serait susceptible de déclencher une réaction de stimulation inflammatoire des cellules en présence (*cf. cadre n°4*). Malheureusement, nous ne disposons pas en recherche d'entités biologiques dont les qualités pourraient suppléer l'action des collagénases.

³² Indice de masse corporelle ou IMC est obtenue par la formule (masse de l'individu) / (taille²). Un IMC supérieur à 30 indique une obésité. Un sujet obèse est un sujet à risque pour les pathologies métaboliques.

Cadre n°4 : Utilisation des collagénases et autres enzymes en culture cellulaire

L'utilisation des collagénases en biologie doit être faite avec prudence et parcimonie. En effet, les collagénases sont des *métalloprotéases*. Les *métalloprotéases* sont des enzymes protéolytiques responsables de la dégradation de matrice extracellulaire lors de plusieurs processus physiologiques et en particulier, lors d'une inflammation ou d'une infection (les collagénases usitées en laboratoire proviennent de la bactérie *Clostridium histolyticum*). De surcroît, les *métalloprotéases*, sont capables, aussi bien que des facteurs signalisant, d'agir sur le phénotype cellulaire [217]. Dans notre projet de recherche, l'utilisation de telles enzymes peut avoir un potentiel effet sur les cellules utilisées. Il a été montré, à l'instar des macrophages, que les cellules mésenchymateuses peuvent être activées par des cytokines pro-inflammatoires ou des cytokines de type Th2 [218]. Nous retrouvons, de ce fait, avec des cellules mésenchymateuses de type 1 ou de type 2 selon les molécules en présence [218].

Dans nos travaux, il serait important de vérifier si nos cellules sont effectivement activées vers le phénotype de type 1 ; d'autant plus que nous utilisons des concentrés plaquettaires comme facteurs de croissance dans nos cultures, les plaquettes étant gorgées de molécules pro-inflammatoires.

L'action des collagénases (2 mg/ml, Sigma-Aldrich®) terminée, nous obtenons un amoncellement de plusieurs types cellulaires qu'il est nécessaire de séparer. D'abord, les fragments non digérés sont soustraits par filtrations successives à travers des filtres de maillages de 100 μm puis de 25 μm . Ensuite, la séparation des adipocytes des autres composantes cellulaires est réalisée par centrifugation à 680g pendant 10 minutes ; les adipocytes, de moindre densité³³ que l'eau ou que les autres cellules, vont se retrouver séparés des autres entités cellulaires par capillarité. Après centrifugation, nous obtenons trois phases dans le contenant, une phase supérieure *adipocytaire*, une phase intermédiaire aqueuse et une phase inférieure cellulaire (Figure 46). La phase inférieure est ce que nous nommons *fraction stroma-vasculaire* (SVF). Elle contient toutes les entités cellulaires rencontrées dans le tissu à l'exception des adipocytes matures qui ont été préalablement éludés avec la phase supérieure et la phase aqueuse. De fait, la SVF est composée de MEC, de cellules épithéliales et endothéliales, de cellules immunitaires et de cellules mésenchymateuses dont les composantes fibroblastiques et les *progéniteurs adipocytaires*.

Après lyse des érythrocytes par choc osmotique induit par une solution de NH_4Cl , le culot de cellules non lysées est rincé, compté et la viabilité cellulaire estimée. Les cellules de la SVF

³³ Les adipocytes sont composés en grande majorité de triglycérides. Ces derniers sont insolubles dans l'eau de sorte que l'eau dispose d'une part négligeable dans ces cellules. Les autres cellules, à l'inverse, sont composées très majoritairement d'eau, nous pouvons donc exprimer leur densité en regard la densité de l'eau. Admettons que la densité des adipocytes soit égale à la densité des triglycérides et que celle des autres cellules soit sensiblement égale à celle de l'eau. Nous obtenons $d_{\text{adipocytes}} = \rho_{\text{triglycérides à } 20^\circ\text{C}} \approx 0.900 \text{ g.cm}^{-3} / \rho_{\text{eau à } 20^\circ\text{C}} = 0.998 \text{ g.cm}^{-3} = 0.902$ et $d_{\text{autres cellules}} \approx \rho_{\text{eau à } 20^\circ\text{C}} = 0.998 \text{ g.cm}^{-3} / \rho_{\text{eau à } 20^\circ\text{C}} = 0.998 \text{ g.cm}^{-3} = 1.000$. Donc, $d_{\text{adipocytes}} < d_{\text{autres cellules}}$. En réalité, la densité des adipocytes est sensiblement supérieure à celle des triglycérides et, celle des autres cellules légèrement supérieure à la densité de l'eau. Nous obtenons donc la relation suivante : $d_{\text{adipocytes}} < d_{\text{eau}} < d_{\text{autres cellules}}$; la disposition des phases dans le tube après centrifugation est bien démontrée.

sont ensuite ensemencées à la densité de 4000 cellules/cm² en flasques ventilées de 75 cm² (TPP®). Un lavage des cellules au DPBS 1X (Gibco®) après adhésion est nécessaire pour se débarrasser des cellules non-adhérentes et de la MEC. Au final, les cellules adhérentes seront cultivées avec du milieu de culture – MEMα (Invitrogen™) supplémenté en ASP (*Amphotéricine* à 0.25 µg/ml, streptomycine à 0.1 mg/ml, pénicilline à 100 U/ml), en plasma enrichi en concentré plaquettaire à hauteur de 2 % et en héparine à 10 U/ml – jusqu'à *subconfluence* et ensuite, les cellules sont récupérées en fin de culture primaire sous l'action de la trypsine (Gibco® Trypsin-EDTA) avant de procéder à la thérapie cellulaire.

Il est à remarquer que, à partir de la SVF, la seule sélection réalisée réside sur les capacités d'adhérence des cellules. En conséquence, nous disposons en fin de culture primaire d'une population cellulaire encore hétérogène regroupant des cellules de type fibroblastique, de cellules de type *péricyttaire* et des macrophages. Les macrophages, ne se divisant point, seront en fin de culture retrouvés en nombre négligeable. En revanche, les autres types cellulaires vont participer à la thérapie ; de sorte que le produit de thérapie sera en réalité composé de fibroblastes plus ou moins immatures, de *progéniteurs adipocytaires* et de *péricytes*. Cette circonstance mérite d'être relevée car lorsque nous parlerons d'ASC dans ce manuscrit, nous ferons référence à cette hétérogénéité cellulaire et aucunement, à une sélection de cellules selon une *clonogénicité*.

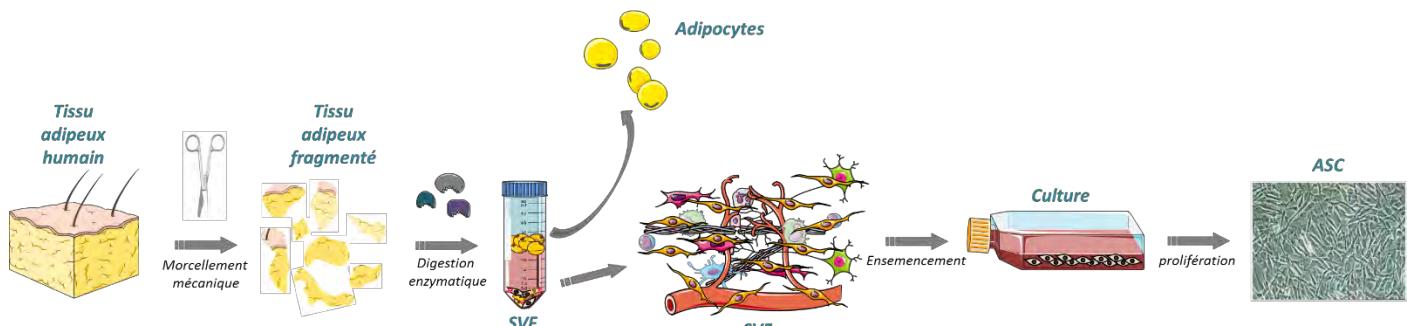


Figure 46 : Schéma récapitulatif de l'obtention des ASC humaines.

Il a été également entrepris une thérapie cellulaire allogénique dans cette étude. Pour ce faire, les cellules souches/stromales mésenchymateuses ont été récupérées de tissus adipeux sous-cutanés inguinaux de souris *Nude*. Le protocole d'obtention est similaire à celui des cellules mésenchymateuses humaines. Brièvement, le tissu adipeux murin est mécaniquement dissocié puis digéré dans une solution contenant une collagénase NB4 (SERVA Electrophoresis) à 37°C pendant 45 minutes. Le produit de digestion est filtré puis soumis à une centrifugation

à 680 g pendant 10 minutes. Après lyse des hématies, la SVF obtenue est ensemencée à une densité de 9000 cellules par cm². Après adhérence et lavages au DPBS 1X (Gibco ®), les cellules sont cultivées jusqu'à *subconfluence* dans un milieu DMEM-F12 supplémenté en ASP, acide ascorbique, biotine, acide pantothénique et en sérum de veau fœtal à hauteur de 10 %.

D. RT-qPCR sur tissus murins traités

La brûlure a été adaptée à partir du modèle original en partie pour faciliter la récupération des tissus murins supplémentés avec les hASC. La brûlure rectangulaire permettait en effet de récupérer une quantité importante de tissus brûlées et ce, à l'inverse de la brûlure carrée, avec un maximum de cellules humaines (Figure 47 A).

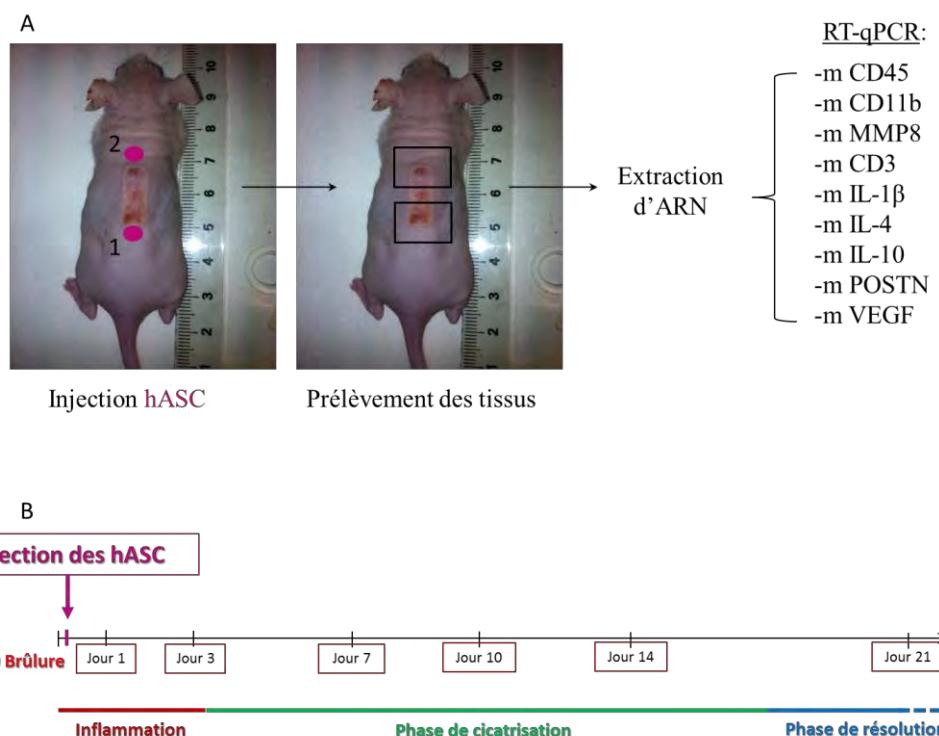


Figure 47 : Protocole d'extraction d'ARN des tissus murins supplémentés avec les hASC.

A. Protocole de prélèvement et les ARN observés. **B.** Cinétique temporelle de prélèvements des tissus confrontée à la cinétique temporelle de la cicatrisation. Chaque manipulation a été confrontée aux résultats obtenus avec l'injection de la solution de NaCl.
m devant l'amorce = murin.

En ce qui concerne les tissus traités par jet de plasma froid, les tissus récupérés pour l'extraction d'ARN ont été ceux ayant disposé d'un contact avec le plasma (Figure 48 A) ; ce faisant, l'analyse de la quantité d'ARN tissulaire n'a pas réalisée sur l'ensemble de la brûlure.

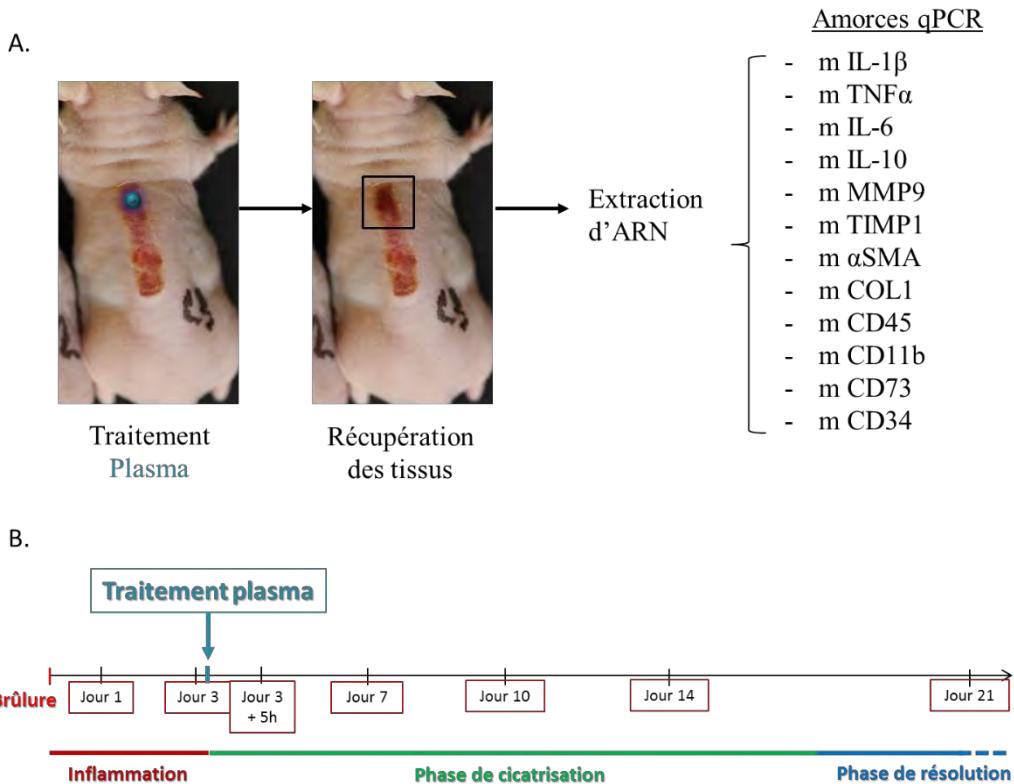


Figure 48 : Protocole d'extraction d'ARN des tissus muris traités par plasma froids.

A. Protocole de prélèvement et les ARN observés. **B.** Cinétique temporelle de prélèvements des tissus confrontée à la cinétique temporelle de la cicatrisation. Chaque manipulation a été confrontée aux résultats obtenus avec l'injection de la solution de $NaCl$. m devant l'amorce = murin.

Les ARN totaux ont été extraits à partir d'un prélèvement calibré de peau ($\approx 20\text{mg}$) à l'aide du kit *RNeasy minikit* (QIAGEN®). La qualité des ARN a été vérifiée sur puce Experion™ (BIORAD).

Les rétro-transcriptions ont été réalisées à partir de 500 ng d'ARN totaux à l'aide du kit *High Capacity cdna reverse transcription* (Applied Biosystems™). Les PCR quantitatives ont été effectuées sur les ADN complémentaires précédemment obtenus avec les amores suivantes :

Rplp0	<i>Forward</i>	AGTCGGAGGAATCAGATGAGGAT	<i>Reverse</i>	GGCTGACTTGGTTGCTTTGG
IL-1β	<i>Forward</i>	TGCCACCTTTGACAGTGATG	<i>Reverse</i>	TTGGAAGCAGCCCTTCATCTT
IL-4	<i>Forward</i>	CCGTAACAGACATCTTGCTGCC	<i>Reverse</i>	GAGTGTCCCTCTCATGGTGGCT
IL-6	<i>Forward</i>	ACACATGTTCTCTGGAAATCGT	<i>Reverse</i>	CAAGTCCATCATCGTTGTTCATAC
IL-13	<i>Forward</i>	ACGGTCATTGCTCTCACTTGCC	<i>Reverse</i>	CTGTCAGGTTGATGCTCCATACC
IL-10	AOD ref. Mm 00439616-m1 Applied Biosystems			
TNFα	<i>Forward</i>	GCAGTCTGTGCTGCTGGCAT	<i>Reverse</i>	CGCAGAACGGGATGAAGC
MMP8	<i>Forward</i>	GATGCTACTACCACACTCCGTG	<i>Reverse</i>	TAAGCAGCCTGAAGACC GTTGG
MMP9	<i>Forward</i>	GCTGACTACGATAAGGACGGCA	<i>Reverse</i>	TAGTGGTGCAGGCAGAGTAGGA
TIMP1	<i>Forward</i>	TCTTGGTCCCTGGCGTACTCT	<i>Reverse</i>	GTGAGTGTCACTCTCCAGTTGC
αSMA	<i>Forward</i>	TGCTGACAGAGGCACCACTGAA	<i>Reverse</i>	CAGTTGTACGTCCAGAGGCATAG
COL1a1	<i>Forward</i>	GGACCCATTGGACCTGAACC	<i>Reverse</i>	CCCAATCGTGAGACGTGGAA
POSTN	<i>Forward</i>	CAGCAAACCACTTCAACGACC	<i>Reverse</i>	AGAAGGCGTTGGTCCATGCTCA
VEGF	<i>Forward</i>	AGTCGGAGGAATCAGATGAGGAT	<i>Reverse</i>	GGCTGACTTGGTTGCTTTGG
CD45	<i>Forward</i>	CTTCAGTGGTCCCATTGTGGT	<i>Reverse</i>	TCAGACACGTCTGTCGCCCTTA
CD11b	<i>Forward</i>	TACTTCGGGCAGTCTCTGAGTG	<i>Reverse</i>	ATGGTTGCCTCCAGTCTCAGCA
CD73	<i>Forward</i>	CATCGCTATGGCCAGTCCAC	<i>Reverse</i>	CTCTGTTCCAGGGCTTCGG
CD34	<i>Forward</i>	GGAGTTCTGCTGGCCATCTT	<i>Reverse</i>	ATAAGGGTCTTCACCCAGCC
CD3	<i>Forward</i>	GCTCCAGGATTCTCGGAAGTC	<i>Reverse</i>	ATGGCTACTGCTGTCAGGTCCA
CD163	<i>Forward</i>	GGCTAGACGAAGTCATCTGCAC	<i>Reverse</i>	CTTCGTTGGTCAGCCTCAGAGA

E. Analyses statistiques

L’ensemble des valeurs est représenté par la moyenne \pm l’écart standard à la moyenne. Les analyses statistiques ont été effectuées à l’aide d’un test de *Student* (t-test). Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) et $p \leq 0,001$ (***)

IV- Mécanismes d'action des cellules stromales du tissu adipeux humain dans un modèle murin de cicatrisation cutanée

Nous avions en la présence des souris *Nude* un modèle de choix pour l'étude de la cicatrisation des brûlures. Comme discuté dans le chapitre II de la présente partie, les souris devraient présenter une inflammation à la mesure de la brûlure tout en proposant une cicatrisation observable.

Etant un projet porté conjointement par STROMALab et le CHU de Toulouse, il eut été décidé d'explorer le comportement et les bénéfices d'ASC humaine lors des processus cicatriciels de brûlure. La *Nude*, du fait de sa relative immunotolérance, ne constituerait donc aucun obstacle à la survie des cellules humaines injectées.

A. Protocole de thérapie cellulaire

Le protocole de thérapie cellulaire avait été déjà mis en place avant mon arrivée à STROMALab (Figure 49). Il consistait en l'injection d'un point de 250000 hASC sur chaque bord de la brûlure. Au total, 1 million de cellules étaient administrées par souris donc par brûlure. Les hASC étaient délivrées avec une solution isotonique de *NaCl* à une concentration de 1 million de cellules pour 40 μ l de solution. Enfin, l'injection se réalisait par l'intermédiaire d'une seringue de type *Hamilton* de contenance 10 μ l et avec une aiguille de gauge 26 et de longueur 51 mm et ce, 30 minutes après la réalisation de la blessure.

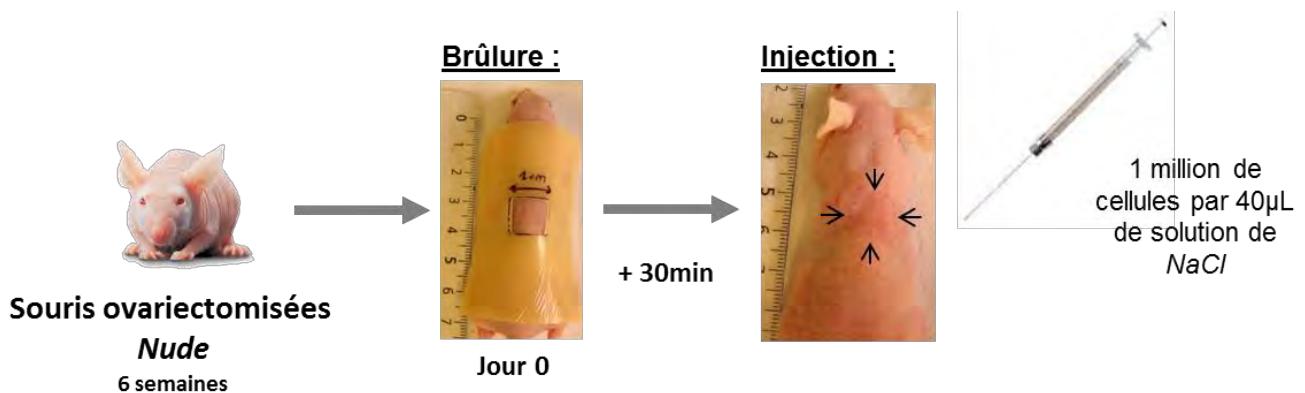


Figure 49 : Protocole antérieur d'injection [D'après, Ambre de Béral, M2R].

Le protocole antérieur prévoyait une brûlure de forme carré de 1 cm de côté [Ambre de Berail, M2R]. Nous avons choisi d'adapter cette blessure selon un rectangle de 2 cm de grand axe (crânial-caudal) et de 0,5 cm de petit axe. Les raisons qui nous ont décidées à adopter cette architecture sont de plusieurs ordres :

- Un ordre mécanique : nous souhaitions que les forces de contraction lors de processus de cicatrisation ne soient pas contraires. Avec un rectangle, la probabilité que les forces de contraction soient convergentes était plus élevée. Les vitesses de fermeture des blessures devenait par conséquent plus facilement comparables entre les individus ;
- un ordre observationnel : l'expérience a montré que le processus de cicatrisation commençait d'abord en crânial et en caudal de sorte que les berges de la blessure se refermaient plus rapidement au niveau des parties supérieure et inférieure. Nous pouvons apprécier donc une cicatrisation selon un axe longitudinal, ce qui facilitait également les comparaisons ;
- un ordre moléculaire : La première raison a été citée dans le « Matériel & méthodes ». En seconde intention, nous souhaitions vérifier si la cinétique d'apparition des facteurs moléculaires pendant la cicatrisation était similaire selon que nous nous trouvions en crânial ou en caudal. L'épaisseur tégumentaire influe légèrement sur la cinétique cicatricielle. Le rectangle permettait de couvrir une zone, en quelque sorte, plus hétérogène sans changer la surface de la brûlure.

La deuxième adaptation fut celle de la seringue. L'utilisation de la seringue de type *Hamilton* fut malaisée. En effet, la solution à injecter était très concentrée en cellules. L'exiguë conduit et la longueur de l'aiguille de l'*Hamilton* produisit des injections non homogènes de sorte que de temps à autre, les cellules restaient dans la seringue et seul le liquide était injecté. En outre, la seringue se bouchait régulièrement. Nous avons en conséquence préféré utiliser des seringues à insuline avec des aiguilles de gauge 27 et de longueur 13 mm ; cette adaptation améliorait l'homogénéité des injections.

La troisième adaptation fut celle de la localisation de l'injection. Les cellules ont été injectées en deux points en crânial et en deux points en caudal de la blessure et autant que faire se peut, le produit d'injection devait se retrouver dans le derme. L'injection en sous-cutanée pouvait

constituer une limite en ce sens qu'il existait une probabilité élevée que le muscle peaucier constitue une barrière entre les ASC injectées et le derme à reconstruire.

La concentration cellulaire de la solution d'injection resta inchangée.

Bien que ces précisions semblent insignifiantes, elles sont en réalité d'une importance majeure ; tous les paramètres décrits précédemment peuvent avoir des conséquences déterminantes sur les effets de la thérapie mise en œuvre. Ci-après, le schéma récapitulatif du nouveau protocole.

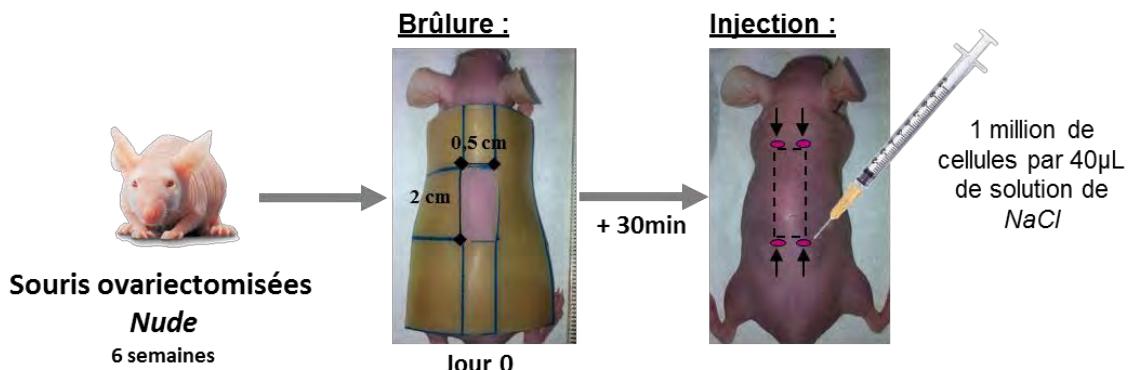


Figure 50 : Nouveau protocole d'injection.

Avant d'étudier les effets des ASC humaines, de décrire les stratégies mise en œuvre pour interroger les mécanismes d'action des cellules et de discuter des résultats, je vous propose un résumé schématique du protocole de thérapie cellulaire :

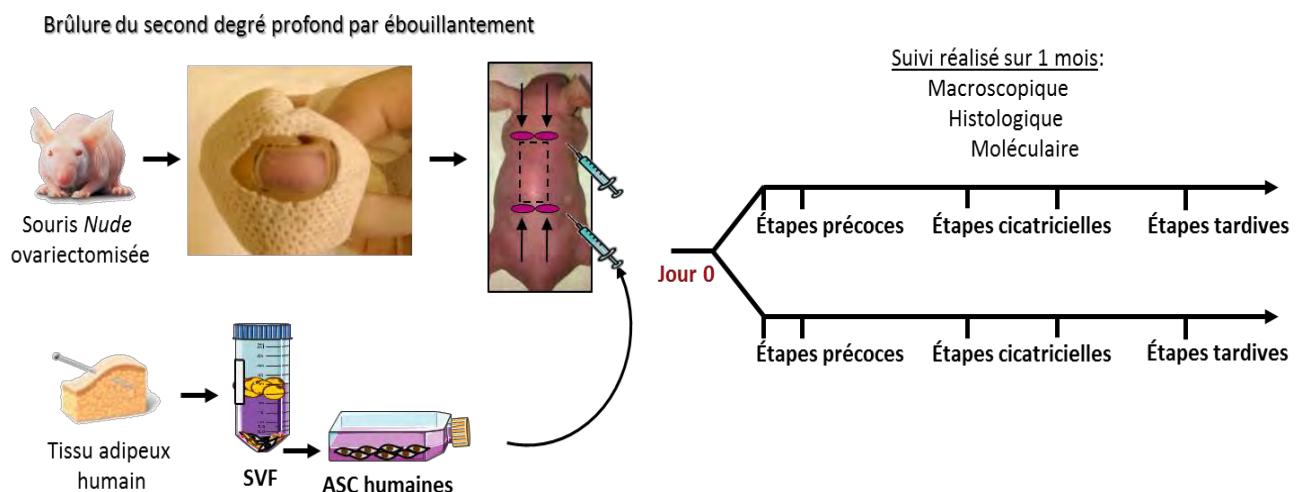


Figure 51 : Thérapie cellulaire basée sur l'utilisation des ASC humaines dans un modèle murin de brûlure.

B. Effets des ASC humaines sur la cicatrisation de brûlures profondes chez la souris *Nude* : résultats antérieurs

Les résultats antérieurs suggéraient que les hASC semblaient apporter quelques bénéfices notables sur les processus cicatriciels ; à savoir, une réduction de la rétraction cicatricielles, une moindre épaisseur dermique post-réparation, une amélioration du flux sanguin de la zone reconstruite mais ce, en l'absence de modification de la vitesse de réépithérialisation. Toutefois, il était indispensable de clarifier le rôle joué par les cellules humaines dans cette amélioration.

C. Devenir des cellules humaines dans le tissu-hôte murin

Les manipulations antérieures avait procédé d'un suivi des cellules injectées afin de déterminer le devenir des cellules mésenchymateuses humaines dans les tissus de la souris *Nude*.

D'abord, avant toute injection, il était indispensable de *phénotyper* les cellules que nous allions adjoindre. Les données ont montré que les cellules récupérées des boites de culture étaient CD45 négatives (marqueur de surface de cellules hématopoïétiques) mais CD90, CD73, CD34 et CD105 positives. Selon le phénotype admis dans la littérature, l'obtention de cellules souches/stromales mésenchymateuses a bien été réalisée [219] [cf. Partie II, chapitre III].

Pour observer le lieu d'établissement des cellules humaines, une transduction des humaines cellules avec un vecteur *lentiviral* exprimant le gène de la GFP a été mise en œuvre. Des expériences d'immunohistochimie ont attesté que les cellules humaines semblaient ne pas migrer de leur site d'injection ; en effet, les évènements de migration restaient exceptionnels. Les résultats donnaient donc quelques arguments en faveur d'une relative immobilité des cellules humaines injectées sous la surface cutanée.

Afin d'apprécier leur devenir temporel des ASC, il était indispensable de procéder à l'observation d'un animal vivant ; en effet, l'évaluation de la persistance ou du déclin de la population cellulaire humaine ne pouvait se réaliser que sur un même animal, de sorte que les mêmes cellules puissent être visualisées dans une cinétique temporelle. Pour ce faire, la microscopie *intravitaire* fut logiquement choisie. Cette dernière révéla de manière précise les quatre sites d'injection. Cependant, la fluorescence dégagée par ces sites déclinait avec le

temps. Se posa conséquemment la question du déclin de la fluorescence ; était-il dû à l'extinction de l'expression du gène de la GFP ? Était-il consécutif de la disparition des cellules humaines, qui exprimaient la GFP.

En complément de ces données et pour répondre à la question de manière quantitative, nous avons conduit des qPCR à l'aide d'amorces spécifiques pour les séquences ALU³⁴. D'abord, avant de procéder avec les tissus murins, il était nécessaire de déterminer le signal que nous pouvions obtenir avec un million de hASC dans une masse calibrée de tissu de *Nude*. Ceci réalisé, nous devions comparer ce signal avec ceux recueillis avec les expériences menées. Finalement, il a pu être mis en évidence qu'après 3 jours, il ne restait qu'environ 43 % de la quantité d'ADN humains injectée ; qu'après 10 jours, environ 15 % et qu'après 21 jours, environ 2% (Figure 52). L'analyse des données PCR a donc permis de mettre à nu une dégressivité de la quantité d'ADN humains dans le tissu-hôte.

Les résultats de la microscopie *intravitale* additionnés par ceux de la qPCR laissent suggérer que la population cellulaire humaine subissait un déclin substantiel au cours du temps.

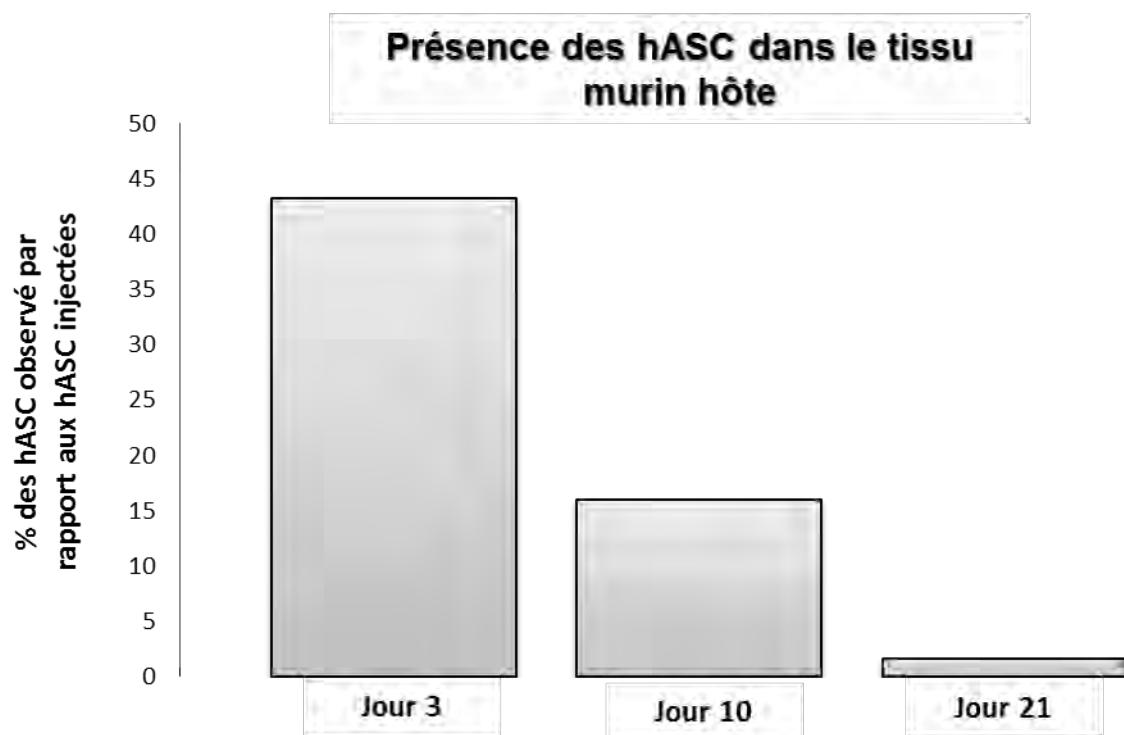


Figure 52 : La population de cellules mésenchymateuses humaines décline avec le temps. Détermination de la quantité de hASC dans le tissu hôte par qPCR, primers pour séquences ALU humaines ; N=3 ; les résultats sont exprimés par le pourcentage des cellules humaines totales injectées \pm ESM.

³⁴ Les séquences ALU sont les séquences SINE des primates. Ce sont des séquences nucléotidiques répétées dispersées dans le génome. Etant les séquences répétées les plus abondantes dans le génome humain, nous avions pensé que pour rechercher de l'ADN humain, en petite quantité, au milieu d'un tissu d'une autre espèce animale, ces séquences seraient nos meilleures alliées.

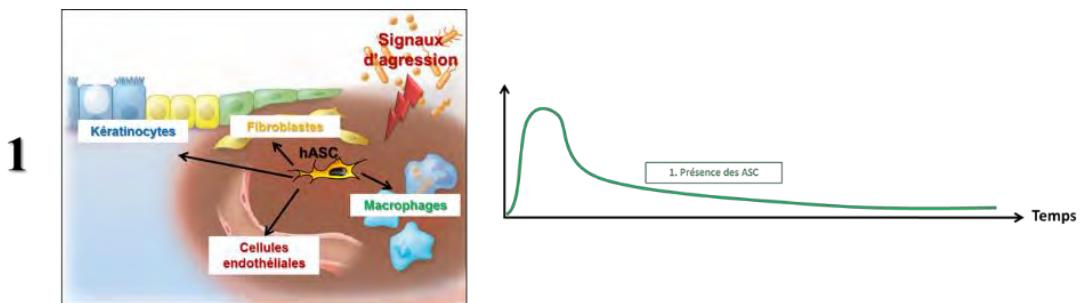
Les hASC semblent améliorer certains paramètres de la cicatrisation ; les évènements de migrations sont rares ; la population cellulaire montre un tarissement au cours du temps. Tout laisse suggérer que les cellules mésenchymateuses, au lieu de participer directement à la réparation, communiquent avec le tissu. De manière évidente, la présence transitoire de ces cellules produit des effets sur la cicatrisation des souris.

En conséquence, les résultats imposèrent, à mon sens, l'hypothèse suivante :

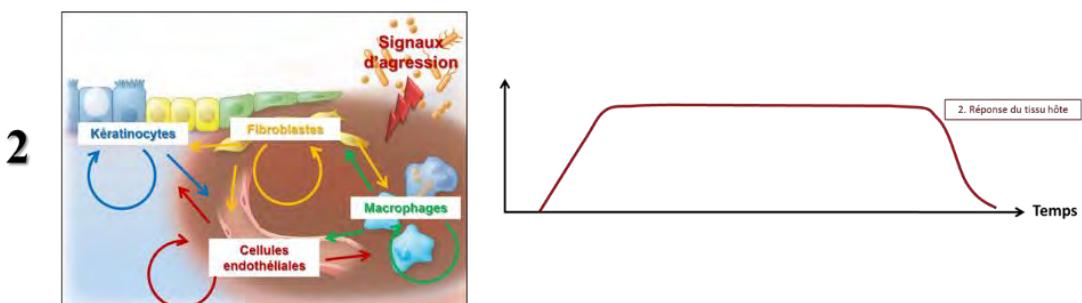
Les hASC « éduqueraient » le tissu-hôte. L'« éducation » serait secondaire à une communication entre les hASC et les composantes cellulaires et tissulaires du tissu murin.

Cette hypothèse pourrait rendre compte d'un effet bénéfique durable, bien que la présence des hASC soit transitoire.

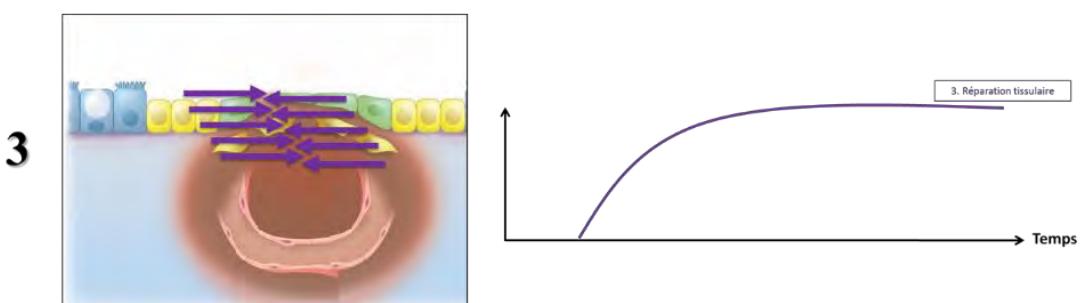
Pour mieux cerner le concept pré-énoncé, je vous propose une cinétique descriptive et schématique de l'hypothèse (Figure 53) :



1. Les hASC, recevant les signaux d'agression, communiquent par contact et par sécrétions avec les cellules du tissu-hôte.



2. En retour, les cellules du tissu hôte adaptent leur phénotypes et leurs actions en conséquence.



3. La réparation tissulaire mise en œuvre est par consécution plus efficiente.

Les évènements resitués dans la cinétique temporelle :

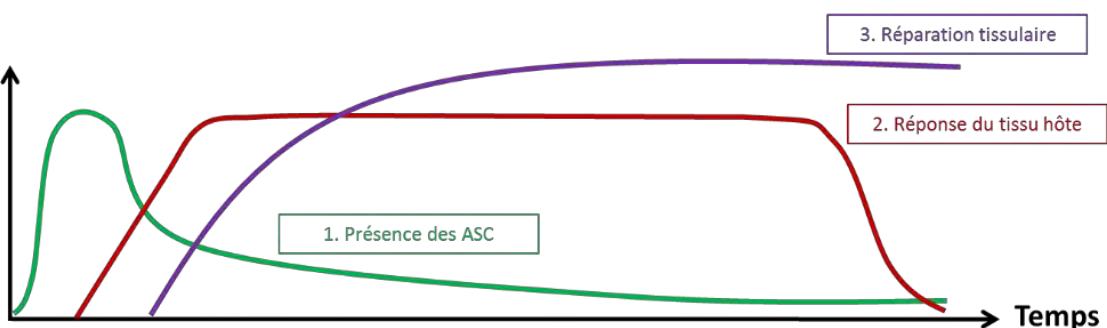


Figure 53 : Hypothèse des modes d'action des hASC dans la cicatrisation de la brûlure prochandes chez la souris Nude.

A partir de cette hypothèse, nous pouvions donc entreprendre deux types d'expérience :

- Des expériences *in vitro* : Observer le comportement des cellules immunitaires des souris *Nude* en présence des hASC ;
- Des expériences *in vivo* : Sonder le tissu murin à la recherche de modifications ayant des effets potentiels sur le processus cicatriciel.

D. Etude *in vitro* de l'interaction des hASC avec des macrophages murins de souris *Nude*

Etant donné nos résultats, l'étude de l'interaction entre les cellules mésenchymateuses humaines et les macrophages murins nous a paru être une évidence. En effet, bien qu'une multitude de cellules de nature différente participent de la cicatrisation, aucune autre cellule, à l'exception des cellules stromales, n'a un rôle aussi prégnant dans le type de réparation tissulaire (*cf.* Partie I, chapitre II). Le macrophage agit en quelque sorte comme un maître d'œuvre qui organise et adapte les réponses cellulaires et tissulaires au fur et à mesure de leur déroulement.

1. Matériel & méthodes

a. Obtention des macrophages

Le préliminaire de l'expérience était d'obtenir des macrophages de souris *Nude ovariectomisées* du même âge que celles utilisées lors de la thérapie cellulaire. En conséquence, les macrophages ont été obtenu à partir de souris *Nude ovariectomisées* de 6 semaines.

Pour ce faire, nous avons choisi les macrophages de la cavité péritonéale, séreuse qui abonde en macrophages. Dans un premier temps, les souris ont été anesthésiées avec une solution de Kétamine/Xylazine à la posologie respectivement de $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ et de $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Après étourdissement, la cavité péritonéale a été remplie de 10 ml de solution isotonique de *NaCl*. Il a été ensuite effectué des massages de la paroi de la paroi péritonéale afin de décrocher les macrophages de leur adhérence tissulaire. Enfin, un cathéter a permis de récupérer la solution *NaCl* contenue dans le péritoine. Les souris sont ensuite sacrifiées sous anesthésie par dislocation cervicale.

Les macrophages contenus dans la solution récupérée sont comptés à la cellule de *Thoma* et ensemencées au nombre de 1 million par puit de 9,6 cm² (plaques 6 puits, Greiner Bio-one) dans un milieu MEMα supplémenté en ASP et en sérum de veau fœtal à hauteur de 5 %. Après lavages au DPBS 1X (Gibco®), les cellules adhérentes sont les macrophages.

b. Stimulations cytokiniques et hormonales des macrophages

Avant tout traitement, les macrophages sont cultivés pendant 5 jours seuls afin de s'assurer qu'une stimulation induite par l'adhérence au plastique se soit estompée.

Pour obtenir des macrophages de type 1, il a été procédé à l'ajonction de 10 ng/ml d'interféron γ (PeproTech®) et 10 ng/ml de LPS (InvivoGen) dans un milieu MEMα supplémenté en sérum de veau fœtal à hauteur de 0,5 %. Après 24 heures de stimulation, les macrophages sont utilisables à l'expérimentation.

Pour obtenir des macrophages de type 2, il a été procédé à l'ajonction de 10 ng/ml d'interleukine 4 (PeproTech®) pendant 24 heures.

Enfin, pour obtenir des macrophages de type régulateur, 10 ng/ml d'interleukine 10 (PeproTech®) et 50 ng/ml de glucocorticoïdes pendant 24 heures.

c. Co-cultures des macrophages murins avec les hASC

1×10^6 hASC ont été ensemencées au jour 5 avec 1×10^6 macrophages, préalablement stimulés avec 10 ng/ml d'interféron γ (PeproTech®) et 10 ng/ml de LPS (InvivoGen) pendant 24 heures. Les cellules sont par la suite récupérées à l'aide d'une solution de DPBS + 2mM d'EDTA + 2 mM de chlorhydrate de lidocaïne et/ou grattage avec un *scraper*.

Les hASC sont cultivées soit en contact dans les plaques 6 puits dans lesquelles sont contenues les macrophages, soit à l'aide d'inserts de culture séparant les deux types cellulaires tout en permettant la diffusion de molécules solubles.

d. Phénotypage des cellules en cytométrie en flux

Les cellules ont été incubées dans une solution de PBS contenant 2 % de NCS et ont été marqués à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-souris conjugués avec différents *fluochromes* (FITC, PE, PerCp-Cy5.5, PE-Cy7, APC ou APC-H7) pendant 30 minutes à 4°C. Après lavages, les cellules ont été analysées en cytométrie en flux (FACSCantoII, Becton

Dickinson). L'acquisition des données et les analyses ont été réalisées sur le logiciel BD FACSDiva (Becton Dickinson). Tous les anticorps ont été commandés chez BD biosciences à l'exception de l'anti-DECTIN-FITC (AbD Serotec) et pour Anti-F4/80-PerCP-Cy5.5 (eBiosciences ®).

e. Evaluation de la quantité d'ARN chez les macrophages

Les ARN totaux ont été extraits à partir des macrophages cultivés pour l'expérience à l'aide du kit RNeasy minikit (QIAGEN®). La qualité des ARN a été vérifiée sur puce Experion™ (BIORAD).

Les rétro-transcriptions ont été réalisées à partir de 500 ng d'ARN totaux à l'aide du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™).

Les qPCR ont été effectuées par l'intermédiaire d'un système StepOnePlus™ (Life Technologies) sur les ADN complémentaires précédemment obtenus avec les amores suivantes :

iNOS	<i>Forward</i>	GAGACAGGGAAGTCTGAAGCAC	<i>Reverse</i>	CCAGCAGTAGTTGCTCCTCTTC
IL-1β	<i>Forward</i>	TGCCACCTTTGACAGTGATG	<i>Reverse</i>	TTGGAAGCAGCCCTTCATCTT
Arg. 1	<i>Forward</i>	CATTGGCTTGCAGACGTAGAC	<i>Reverse</i>	GCTGAAGGTCTTCCATCACC
RELMa	<i>Forward</i>	CAAGGAACTTCTGCCAATCCAG	<i>Reverse</i>	CCAAGATCCACAGGCAAAGCCA
CD163	<i>Forward</i>	GGCTAGACGAAGTCATCTGCAC	<i>Reverse</i>	CTTCGTTGGTCAGCCTCAGAGA
PGE2s	<i>Forward</i>	GGTAGACCTCTATGAAGCAGCC	<i>Reverse</i>	CATCACTCGCAGCACACCATAAC

f. Western-blot sur milieux conditionnés.

Des macrophages péritonéaux ont été cultivés pendant 24 heures avec de l'interféron γ (10 ng/ml) et du LPS (10 ng/ml). Ensuite, le milieu a été retiré et remplacé par un milieu contenant les hASC. Après 24 heures, le nouveau milieu fut récupéré et filtré par des filtres 0,8/0,2 μ m (PALL corporation) et soumis à un western blot.

Les Western-Blots/migration SDS-PAGE ont été réalisés à l'aide du tampon (Tris-HEPES-SDS) et des gels pré-coulés PIERCE™ selon les recommandations du fournisseur. 20 μ L de milieu conditionné par la co-culture ont été additionné de 5 μ L de tampon glycérol 5X, de

0.5µL de DTT et de 2µL de β -*mercaptoéthanol* puis l'ensemble a été déposé dans les puits des gels PIERCE™. Les membranes de transfert ont été incubées 1 heure à température ambiante avec un anticorps anti-souris anti-IL-1 β (Abcam™). Les membranes ont été ensuite incubées 1 heure à T°C ambiante avec un anticorps HRP anti-lapin (Pierce™, 1/8000). Enfin, les western-bLOTS ont été révélés à l'aide d'ECL+ Amersham™ selon les recommandations du fournisseur.

g. Immunofluorescence sur culture de fibroblastes de derme

Pour obtenir des fibroblastes de derme, 2 cm² de peau ont été excisés chez la souris *Nude*. brièvement, la peau a été mécaniquement dissociée puis digérée dans une solution contenant une collagénase NB4 (SERVA Electrophoresis) et une *dispase II* (Roche) à 37°C pendant 45 minutes. Le produit de digestion a été filtré puis soumis à une centrifugation à 680 g pendant 10 minutes. Après lyse des hématies, la SVF cutanée obtenue a été ensemencée à une densité de 9000 cellules par cm². Après adhérence et lavages au DPBS 1X (Gibco ®), les cellules furent cultivées jusqu'à 50 % de confluence dans un milieu DMEM-F12 supplémenté en ASP, acide ascorbique, biotine, acide pantothénique et en sérum de veau foetal à hauteur de 10 %. A partir de 50 % de confluence, il a été ajouté sur les cultures de fibroblastes, les milieux filtrés dans lesquelles avaient été cultivés les différents types de macrophages.

Après 24 heures, les milieux ont été retirés et le marquage avec des anticorps a été réalisé. Succinctement, les cellules ont été lavées au DPBS 1X, fixées en *paraformaldéhyde* puis mises en incubation avec l'anticorps anti-collagen I (ab21286, Abcam™) ou l'anticorps anti- α SMA (ab5694, Abcam™) pendant une heure à T°C ambiante. Ensuite, des anticorps secondaires anti-lapin Alexa Fluor® 488 ou 594 ont été mis à incuber avec les cultures de fibroblastes pendant une heure à T°C ambiante. Enfin, les fibroblastes ont été observés sous microscope à fluorescence (Leica DMRB type 301-371, 010) et les images ont été acquises par le logiciel *Image J*.

2. Les résultats

a. Les différents de types de macrophages obtenus en culture

Avant toute expérience, nous avons tenu à vérifier la biologie des différents types de macrophages et leur rôle dans la cicatrisation. Des macrophages péritonéaux recueillis, nous devions les examiner puis les orienter dans les phénotypes recherchés. Pour ce faire, les macrophages ont été stimulés par des facteurs biologiques adéquats selon le type désiré. Le phénotype et les sécrétions des macrophages ont été évalués respectivement par *cytométrie* en flux, RT-qPCR et western-blot. Enfin, l'action des sécrétions des différents macrophages sur des fibroblastes de derme a été appréciée par microscopie à fluorescence.

Attendu qu'il existe trois types de macrophages rencontrés dans la cicatrisation (*cf.* Partie I, chapitre II), nous voulions alors obtenir ces différents macrophages ; à savoir, des macrophages de type inflammatoire dit « M1 », des macrophages de type cicatrisant dit « M2 » et enfin, des macrophages régulateurs.

Pour disposer de M1, nous avons traité les macrophages péritonéaux avec de l'interféron γ et du LPS pendant 24h.

Le traitement nous a permis de mettre en évidence que les macrophages ainsi traités présentaient à leur surface, le CMH de classe II³⁵ mais peu de *lectine* de classe I, disposaient d'une quantité d'ARN élevée pour l'enzyme iNOS et la cytokine IL-1 β et enfin, sécrétaient la forme active de l'IL-1 β (Figure 54C, 54D et 54E). Ces résultats semblaient indiquer que nous étions bien en présence de macrophages inflammatoires.

Nous avons procédé de la même manière pour les deux autres classes de macrophages. Bien entendu, les traitements pour induire les phénotypes furent différents : IL-4 pour les M2 et IL-10 additionné de glucocorticoïdes pour les Mreg.

Les macrophages traités IL-4 présentaient à leur surface la *lectine* de type I et peu de CMH de classe II, exprimaient l'arginase de type I ainsi que la protéine RELM α et ne sécrétaient pas d'IL-1 β (Figure 54C, 54D et 54E). Les macrophages traités IL-10/corticoïdes présentaient à leur surface, les deux marqueurs CMH de classe II et *lectine* de classe I,

³⁵ Les marqueurs des macrophages sont tirés de la littérature. Le résumé de ces marqueurs et le rôle de chaque sous-type de macrophages peuvent être appréciés dans la figure 54A et 54B.

exprimaient l'ARN du récepteur *scavenger* CD163³⁶ et l'enzyme PGE2 synthase³⁷ et ne sécrétaient pas d'IL-1 β (Figure 54C, 54D et 54E). Nous étions, ce me semble, en présence des sous-types de macrophage voulus.

Toutefois, il était indispensable de confirmer leur rôle dans la cicatrisation. Rappelons-le, la présence de M1 et de Mreg n'est classiquement pas accompagnée de sécrétions fibroblastiques de collagène. Par contre, l'apparition de M2 est suivie par l'activation des fibroblastes en myofibroblastes.

Pour vérifier ces affirmations, nous avons en conséquence cultivé des fibroblastes de derme de souris *Nude* avec du milieu conditionné par les différentes classes de macrophages puis interrogé la biologie des fibroblastes ainsi cultivés.

Les fibroblastes cultivés avec du milieu conditionné par les M1 présentèrent une faible expression d' α SMA, montrant leur non-conversion en myofibroblastes et les expériences d'immunofluorescence réalisées avec un anticorps anti-collagène I n'ont révélé qu'un frêle réseau de collagène au fond de la boîte de culture (Figure 54F). A l'inverse, les fibroblastes ayant vu les sécrétions de macrophages traités avec l'IL-4 ont effectivement exprimé la protéine *myofibroblastique*, α SMA et sécrété une quantité conséquente de collagène I (Figure 54F). Enfin, pour les fibroblastes cultivés avec le milieu des macrophages stimulés par les facteurs immunsupresseurs, bien que l'expression de la protéine musculaire fût observée, les fibroblastes ne se présentaient que dans un réseau de collagène clairsemé (Figure 54F).

Nous avions pu obtenir, semblerait-il, par les présentes manipulations, les différentes classes de macrophages décrites en littérature. En outre, nous avions pu vérifier leurs effets sur les cellules responsables de la constitution de la cicatrice. Tandis que les sécrétions de nos M1 concourent à obtenir des myofibroblastes pourvoyeurs de collagène de type I, les sécrétions de nos M2 et de nos Mreg n'ont eu que peu d'impact *in vitro* sur les sécrétions *collagéniques* des cellules du tissu conjonctif.

³⁶ Le CD163 est le *scavenger* responsable de la *clairance* de l'hémoglobine. Son expression a été montrée augmentée avec un traitement IL-10 et corticoïdes [220].

³⁷ Les prostaglandines de type E2 sont des dérivés de l'acide *arachidonique* et semblent être fortement anti-inflammatoire [221].

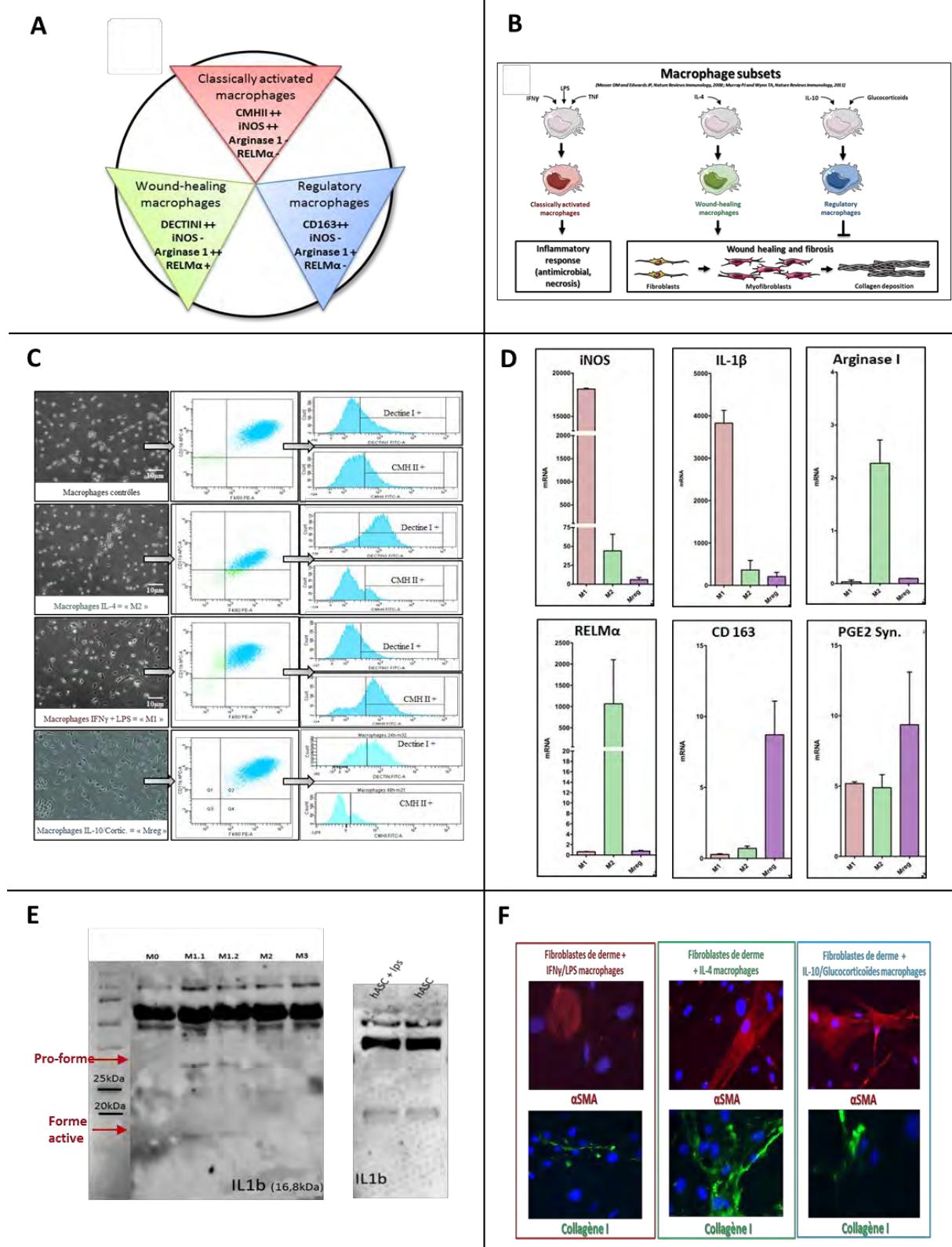


Figure 54 : Biologie et obtention des macrophages rencontrées lors de la cicatrisation

A. Marqueurs intracellulaires et membranaires des différentes classes de macrophages. **B.** Rôle des différents macrophages lors de la cicatrisation. **C.** Photographie des différents macrophages et leur phénotype membranaire en *cytométrie en flux*. **D.** Quantités d'ARN messagers de différents marqueurs *macrophagiques* déterminées par RT-qPCR. **E.** Western-blot réalisé avec un anticorps anti-IL1 β spécifique de l'espèce murine, sur les milieux de culture des macrophages. **F.** Expériences d'immunofluorescence réalisées sur des fibroblastes de derme de souris *Nude*, ayant été cultivés avec les milieux de culture des différents macrophages. N = 3

b. Co-cultures entre les macrophages stimulés IFN γ /LPS et les hASC

Dans le protocole de thérapie cellulaire mis en œuvre, nous injections les hASC trente minutes après la brûlure ; de fait, les hASC se retrouvaient en prémissie de l'inflammation. Cela signifie qu'elles auraient pu être en présence de macrophages de type M1 plutôt que des deux autres types. En outre, nous savions des expériences précédentes que la majorité des cellules humaines ne s'établissaient pas durablement dans le tissu. Nous avons par conséquent choisi d'évaluer le comportement de macrophages M1 murins en présence des hASC par système de co-culture.

Les expériences ont été réalisées selon deux principes : les cultures par contact cellules-cellules et les cultures par inserts pour interroger uniquement une communication sécrétoire. Le *design* des manipulations est présenté dans la figure 55 suivante :

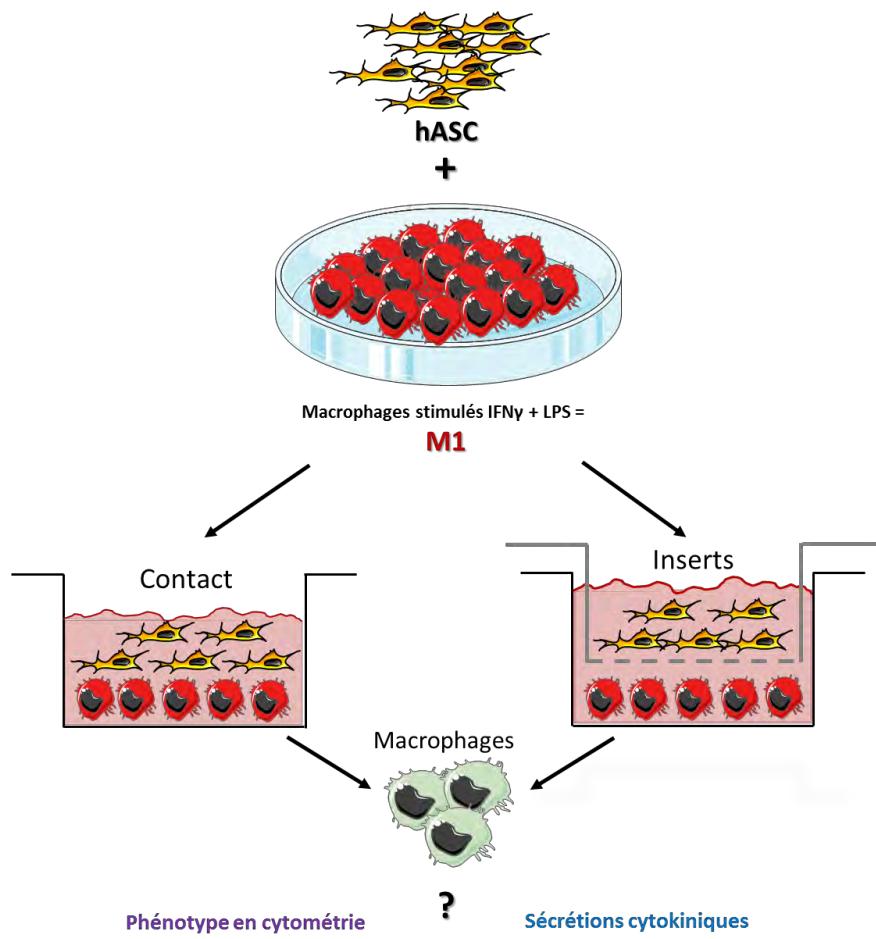


Figure 55 : Protocoles des co-cultures hASC et macrophages murins

Seuls les macrophages M1 sont cultivés avec les cellules mésenchymateuses humaines. Après les deux types co-cultures, les macrophages sont récupérés et leur phénotype est interrogé par *cytométrie* et *western-blot*. La durée des co-cultures n'excéderont pas 24 heures.

En première intention, les expériences de co-cultures auraient pu poser quelques inconvénients en ceci que la discrimination des cellules et de leurs sécrétions pouvaient s'avérer complexes. Seulement, les types cellulaires ne provenant pas de la même espèce, l'utilisation des cellules humaines possédait un autre avantage certain puisque au vu de notre hypothèse éducative, la discrimination entre les effets des hASC et la réponse des cellules murines pouvaient être aisément réalisable. Par exemple, la discrimination en *cytométrie* en flux en ce qui concerne les expériences de co-cultures, peut se faire simplement par le rajout d'un anticorps anti-HLA, i.e. un anticorps dirigé contre une protéine membranaire spécifique de l'espèce humaine. Les cellules HLA positives seront par la suite exclues pour l'analyse du phénotype macrophagique (Figure 56). Pour les sécrétions, idem : l'utilisation d'anticorps dont la réactivité est spécifique de l'espèce nous permet de discriminer ce qui relevait des macrophages et ce qui relevait des cellules humaines (Figure 54E).

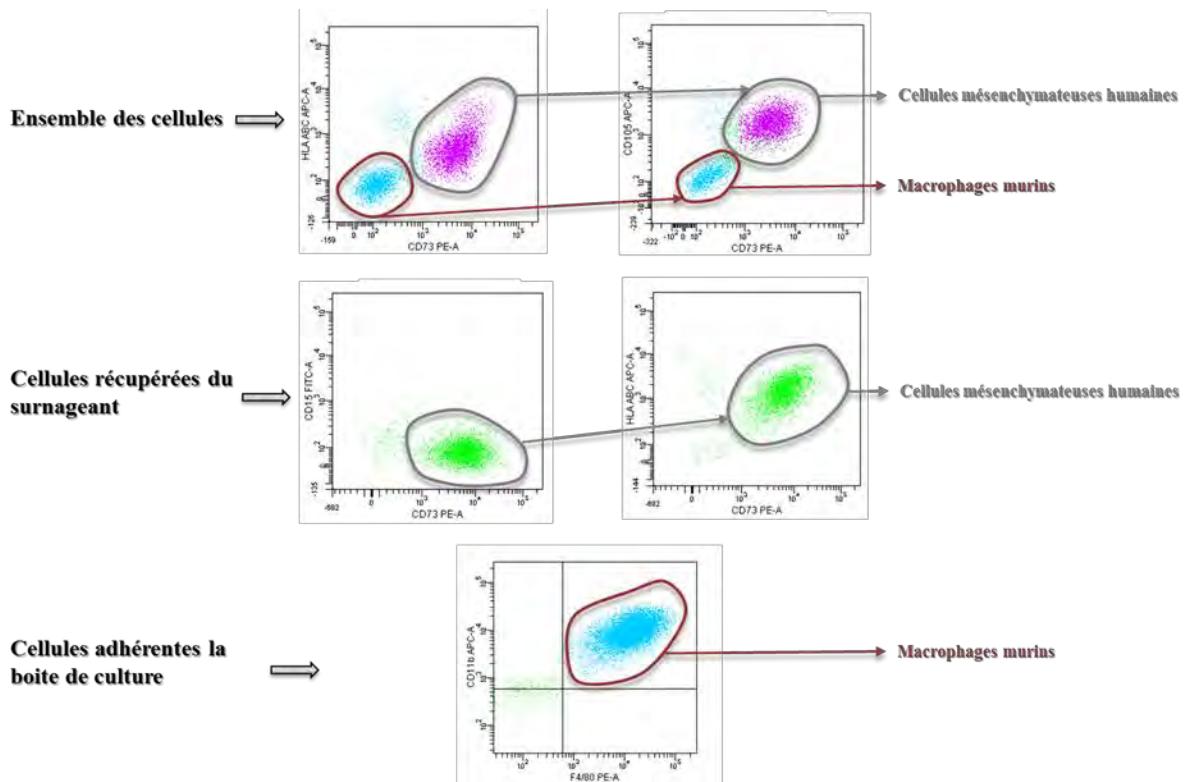


Figure 56 : Discriminations cellulaires lors des Co-cultures par contact.

Lorsque l'ensemble des cellules est passé en *cytométrie*, nous pouvons percevoir un pool de cellules HLA, CD105 et CD73 positives (population rose) ainsi qu'un pool négatif (pop. bleue). La positivité nous indique que nous sommes en présence de cellules mésenchymateuses et humaines.

Les cellules négatives sont ensuite interrogées selon le double marquage CD11b et F4/80 (Le CD11b est une intégrine exprimée sur les leucocytes et en particulier, sur la lignée *monocytaire* et le F4/80 est une glycoprotéine présente sur l'ensemble des macrophages murins). Les cellules double-positives pour ces marqueurs sont des macrophages murins.

Par ailleurs, un phénomène inattendu s'est produit. Le protocole *in vitro* consistait à cultiver d'un côté, les macrophages et de l'autre, les hASC. Ensuite, les hASC ont été rajoutées à la culture macrophagique de sorte qu'elles se retrouvent, dans un premier temps, au-dessus des macrophages. Sachant que les hASC étaient des cellules adhérentes, l'adhérence étant une qualité qui permet de les sélectionner, nous pouvions nous attendre à ce qu'elles viennent se fixer au plastique de la boîte en s'intercalant entre les macrophages. En dépit de nos attentes, les cellules humaines ne se sont jamais mises à adhérer à la boîte mais sont restées suspendues dans le milieu de cultures (figure 57). En outre, les hASC ont adopté une organisation particulière en ceci qu'elles se sont mises à se regrouper en des sortes d'entités sphéroïdes « flottantes ». Les sphères ainsi constituées se sont par la suite, positionnées au-dessus d'« îlots » adhérents constitués uniquement de macrophages (Figure 56 et 57). De surcroît, le contact cellulaire a pu être observé puisque des filaments cytoplasmiques entre les deux types cellulaires se sont établis (Figure 57).

La faisabilité des manipulations *in vitro* a été par les présentes manipulations confirmée. Nous avons pu par la suite questionner l'action des cellules mésenchymateuses humaines sur les macrophages de type 1.

En ce qui concerne les expérimentations par contact, le phénotype macrophagique a, semble-t-il, été modifié en regard des résultats obtenus par *cytométrie en flux* (figure 58). En effet, 51,2 % de la population macrophagique ayant vu les hASC exprimaient le marqueur *dectine* de classe I (Figure 58C) tandis que les macrophages stimulés avec IFN γ /LPS ne présentaient en leur sein qu'une population *dectine* I positive d'environ 5 % (Figure 58A). De plus, seuls 19,1 % des macrophages cultivés en contact avec les cellules humaines présentaient à leur surface le CMH de classe II (Figure 58D). Ce chiffre s'élève à 59,1 % lorsque les macrophages sont stimulés avec la cytokine pro-inflammatoire et l'endotoxine bactérienne (Figure 58B).

Au vu de ces résultats, les hASC semblent reverser, par contact cellulaire, le phénotype des macrophages traités par des cytokines pro-inflammatoires.

En ce qui concerne les cultures par inserts évitant tout contact entre les deux entités cellulaires, le phénotype macrophagique de surface n'a que très légèrement été remanié. La population *dectine* I positive représentait 54,2 % de la population initiale et la population CMH II positive 14,7 % (Figure 58E et 58F). En regard aux résultats obtenus avec des cultures par contact, ces dernières données indiquaient qu'en absence de contact cellulaire, les macrophages n'eurent pas été influencés par les cellules humaines.

Ces résultats démontrent un effet des hASC sur les macrophages murins ; cet effet semble anti-inflammatoire et nécessite un contact cellulaire.

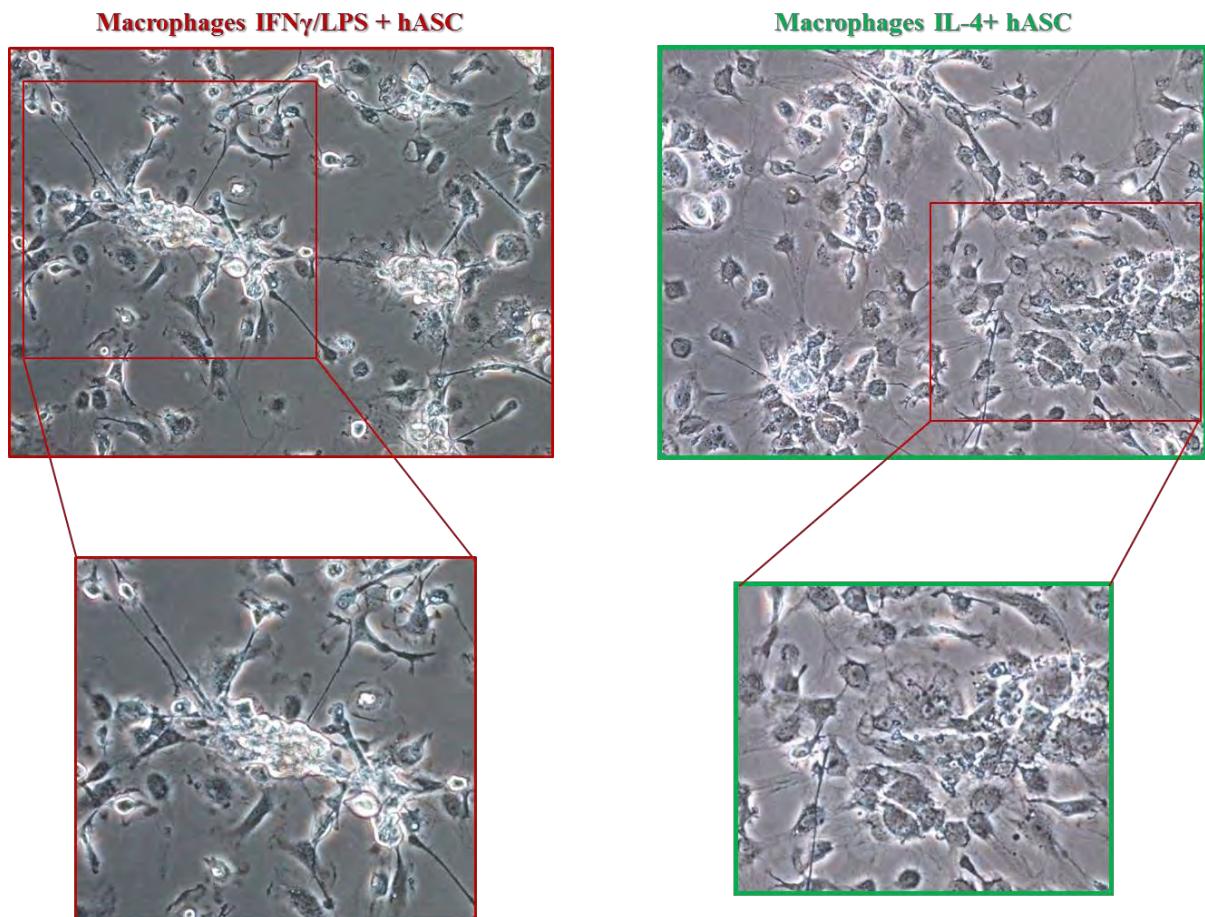


Figure 57: Photographies de co-cultures par contact des hASC et des macrophages

Les photographies de gauche représentent des hASC et des macrophages murins de type 1. Les hASC sont regroupées en sphère « flottante ». Les macrophages adhèrent au fond de la boîte et adoptent une morphologie étoilée signe de leur phénotype de classe I. N = 12.

Les photographies de droite, quant à elles, représentent des hASC et des macrophages murins de type 2. Ce type d'expérience a été réalisé par comparaison. Une remarque peut être faite ; les macrophages présentent une morphologie particulière. En effet, leur taille et leur disposition, différentes que celles des macrophages des photos de gauche, laissent transparaître des phénomènes de phagocytose. D'ailleurs, il peut être remarqué des débris cellulaires dans le milieu de culture. N = 12.

La première constatation que nous pouvions soulever était que le contact cellulaire fut nécessaire pour que les hASC aient un effet sur les macrophages murins. Cet effet semblait être une atténuation du phénotype macrophagique de type 1. Cependant, il était indispensable de regarder les sécrétions, attestant d'une relative fonctionnalité, des macrophages pour établir leur phénotype.

Pour ce faire, nous avons soumis le milieu des co-cultures par contact à une expérience de western-blot et utilisé un anticorps anti-IL1 β ³⁸, spécifique de l'espèce murine (Figure 58G). Il en résulta que les macrophages ayant été en contact avec les cellules mésenchymateuses humaines sécrétaient une quantité importante de la forme active de l'interleukine 1 β .

Au vu de l'ensemble de ces données, l'influence des hASC sur les macrophages murins semble dépendante du contact cellulaire. Les hASC modifient le phénotype membranaire des macrophages M1 sans pour autant influer leurs sécrétions. Une conclusion claire est donc impossible à formuler. La réalisation d'expériences complémentaires est impérative pour clarifier le phénotype des macrophages ayant été mis en contact des hASC. Nous pourrions imaginer d'augmenter le nombre de marqueurs membranaires à interroger et de pouvoir vérifier d'autres sécrétions cytokiniques ; ceci afin de clarifier le phénotype des macrophages en présence.

Les cellules humaines délivrent sans aucun doute une action sur les macrophages murins et ce, par contact cellulaire. Du point de vue du phénotype membranaire, les macrophages ayant été en contact avec les hASC présentent pour majorité une réversion phénotypique. Nonobstant, les sécrétions de tels macrophages sont contradictoires avec leur phénotype membranaire en ce sens que la production de cytokines pro-inflammatoires est retrouvée augmentée et que le phénotype membranaire ne désignent pas des macrophages inflammatoires.

³⁸ L'interleukine I beta est une cytokine fortement inflammatoire. Elle est sécrétée quasi-instantanément après la blessure. La vélocité de sécrétion est expliquée par le fait qu'elle est stockée en forme proactive dans les cellules. Lorsqu'un signal de danger est perçu, la *proforme* est clivée et est sécrétée dans le milieu extracellulaire. Ce complexe fait partie de ce que nous nommons *inflamasome* [222].

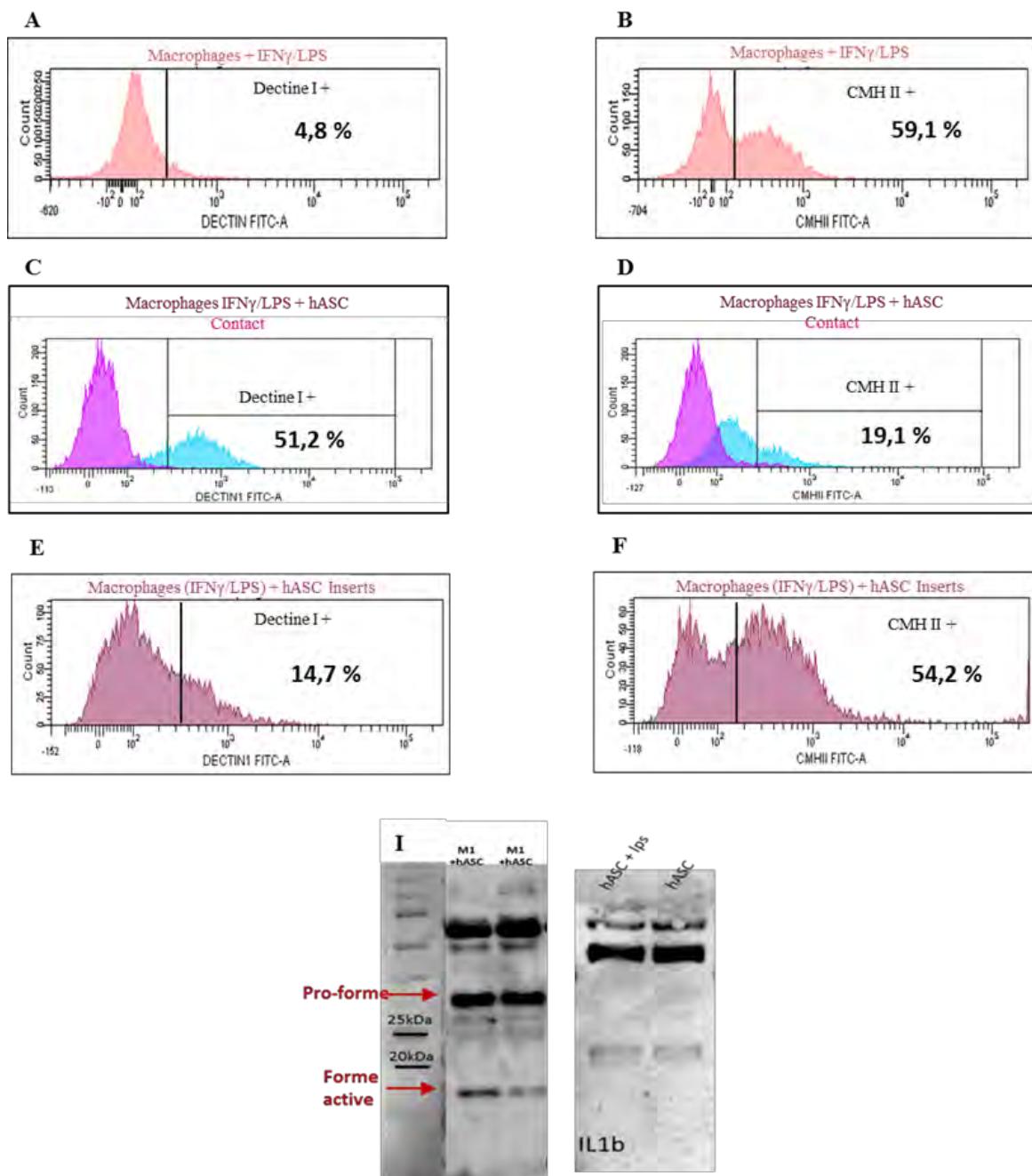


Figure 58 : Les hASC modifient le phénotype membranaire des macrophages murins mais augmentent les sécrétions pro-inflammatoires

A. Expression de la dectine I sur des macrophages stimulés IFN γ /LPS, observée en cytométrie. **B.** Expression du CMH II sur des macrophages stimulés IFN γ /LPS, observée en cytométrie. **C.** Expression de la dectine I sur des macrophages stimulés IFN γ /LPS ayant été co-cultivés par contact avec des hASC. **D.** Expression du CMH II sur des macrophages stimulés IFN γ /LPS ayant été co-cultivés par contact avec des hASC. **E.** Expression de la dectine sur des macrophages stimulés IFN γ /LPS ayant été co-cultivés par inserts avec des hASC. **F.** Expression du CMH II sur des macrophages stimulés IFN γ /LPS ayant été co-cultivés par inserts avec des hASC. **G.** Western blot réalisé à l'aide d'anticorps anti-IL1 β , sur les milieux des cultures macrophages stimulés IFN γ /LPS + hASC ; les anticorps sont spécifiques des sécrétions murines. Les bandes visibles aux environs des 75 kDa sont présentes à toutes les expériences. La nature de ces protéines doit de toute évidence être clarifiée ; cependant, de par la régularité surprenante, elles ont servi de contrôle de dépôt supplémentaire.

C et D. Les pics de couleur violette représentent les hASC. N = 3.

E. Les réponses tissulaires murines à la présence des cellules stromales mésenchymateuses du tissu adipeux humain

Après avoir observé les effets des hASC sur des cellules murines isolées en culture, il était impérieux d'apprécier la réponse du tissu des souris *Nude*, quant à leur présence durant la réparation de la brûlure. Selon notre hypothèse, la présence transitoire des hASC conditionnerait le tissu murin à répondre favorablement à la lésion c'est-à-dire à proposer une cicatrisation adéquate sans attenter à la fonction du tissu.

1. La réponse du tissu murin en fonction de la présence de cellules souches/stromales mésenchymateuses humaines

Pour entreprendre cette réalisation, nous avons voulu questionner l'expression de facteurs cruciaux dans la mécanique de cicatrisation et exprimés par le tissu murin par RT-qPCR.

Les facteurs retenus furent :

- Le **CD 45** : connu également sous le nom *Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor type C*. Le CD 45 est une protéine présente sur l'ensemble des cellules hématopoïétiques à l'exception des hématies et des plaquettes. Son expression est par conséquent fonction de la présence de cellules hématopoïétiques ;
- le **CD 11b** : intégrine présente sur les leucocytes myéloïdes et en particulier, sur les macrophages ;
- la **MMP8** : *Matrix Metalloproteinase 8* ou Collagénase neutrophile. Son expression sera fonction de la présence des neutrophiles ;
- le **CD 3** : complexe protéique associé avec le *TCR* (T-Cell Receptor), il est présent sur tous les lymphocytes T à l'exception des NKT;
- l'**IL-1 β** : cytokine pro-inflammatoire ;
- l'**IL-4** : cytokine majeure de l'immunité de type Th2, immunité pro-cicatrisante ;
- l'**IL-10** : cytokine sécrétée principalement par les lymphocytes T régulateurs. Elle est donc associée à l'immunosuppression et/ou l'immunotolérance ;
- la **POSTN** : *Périostine*. Protéine matricielle jouant le rôle de liant entre les fibres de collagènes. Elle renforce le réseau de collagène ;
- le **VEGF** : *Vascular Endothelial Growth Factor*. Facteur de croissance impliqué dans l'angiogenèse.

Comme nous l'avions indiqué précédemment, la thérapie cellulaire consistait à l'adjonction, une demi-heure après brûlure, de 2 points de 250000 hASC (1 point équivaut à 10 μ l de solution de *NaCl* contenant 250000 hASC) en la partie supérieure de la lésion et de 2 points de 250000 hASC en la partie inférieure. Les animaux contrôles reçurent quant à eux l'injection de 2 points de 10 μ l de solution isotonique de *NaCl* au niveau de la partie supérieure de la blessure et 2 points de 10 μ l de solution isotonique de *NaCl* en la partie inférieure.

Le protocole de récupération des ARN consistait à prélever deux pièces cutanées de la souris contenant ou ayant contenu les hASC ; une pièce au niveau de la partie supérieure de la blessure, une pièce au niveau inférieure et ce, aux jours 1, 3, 7, 10, 14 et 21 jours après la brûlure. Seules ces pièces ont été prélevées car elles contenaient, à l'inverse des zones centrales de la blessure, des tissus ayant été en rapport direct avec les cellules humaines. La manipulation a été élaborée de sorte que les quantités d'ARN aux temps choisis puissent être normalisées à l'unité arbitraire 1 avec une peau saine dorsale de souris *Nude* distinctes prélevées à des temps similaires. Enfin, les résultats avec les hASC ont été confrontées avec les résultats obtenus avec l'injection contrôle de solution isotonique de *NaCl* qui est l'expédient.

Attardons-nous dans un premier temps sur l'expression des facteurs représentatifs de diverses composantes cellulaires.

Les seules différences que nous pouvions relever étaient que le niveau d'expression d'ARN codant pour des protéines murines correspondant à des types cellulaires spécifiques était globalement augmenté au jour 3 suite à la présence des hASC (Figure 59).

Plus précisément, la quantité de CD45 en la présence des hASC était augmentée d'un facteur 3 en comparaison des contrôles. En ce qui concerne les autres facteurs reflétant la présence de leucocytes (MMP8, CD11b et CD3), leur quantité d'acide ribonucléique fut augmentée d'un facteur 2 au jour 3 après brûlure en comparaison avec les souris contrôles. Pour ce qui était de la protéine membranaire CD73 observée sur des cellules conjonctives, sa quantité d'ARN était augmentée d'environ un facteur 2 également.

Sans pour autant s'avancer, il semblerait que la présence des cellules attirait les cellules immunitaires de la souris mais également des cellules fibroblastiques pouvant suggérer qu'il se soit produit au jour 3 une réaction immunitaire liée à la présence des ASC.

En ce qui concerne les cytokines de l'immunité, seules deux présentèrent des différences. Au jour 3, les quantités d'ARN des cytokines IL-4 et IL-10 sont augmentées d'un facteur 4 et d'un facteur 3 respectivement avec le traitement (Figure 59). A contrario, il n'y a pas de dissemblances notables pour les quantités d'ARN de l'IL-1 β ; pour autant, les quantités sont particulièrement élevées dans les deux conditions d'expérimentation, que ce soit avec injection des hASC ou injection de *NaCl*.

Une cytokine inflammatoire (IL-1 β) fut présente, deux cytokines de réactions immunitaires autres furent augmentées. Une conclusion n'est pas discernable en l'état. En revanche, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une réaction immunitaire pour le moins ambiguë. Une prise de greffe suivi d'un rejet serait, à mon sens, vraisemblable en ceci que des cellules humaines qui étaient injectées dans un organisme murin, bien qu'il soit défini comme immunotolérant.

Pour ce qui est de la quantité d'acide ribonucléique codant pour la *périostine*, aucune différence significative n'a pour être notée (Figure 59). Attendu que la *périostine* est constitutive du réseau matriciel de collagène [223] et que l'augmentation de son expression est associée une cicatrisation exagérée [224] [225].

Pour finir, en ce qui concerne le VEGF, la quantité d'ARNm correspondant semble augmentée au jour 3 avec les hASC (Figure 59). Cette augmentation peut s'expliquer selon de deux possibilités :

- soit, une angiogenèse plus prononcée en raison d'une amélioration de la perfusion, reflet d'une meilleure cicatrisation en la présence des hASC ;
- Une angiogenèse stimulée pour l'arrivée des cellules immunitaires sur la zone dans laquelle les hASC ont été injectées. En effet, pour que les leucocytes arrivent en lieu requis, il est nécessaire que des processus d'angiogenèse s'établissent.

Toutefois, des expériences complémentaires doivent être entreprises sur ces échantillons pour vérifier *in situ* une augmentation de l'angiogenèse et la localisation de ce phénomène (techniques histologiques).

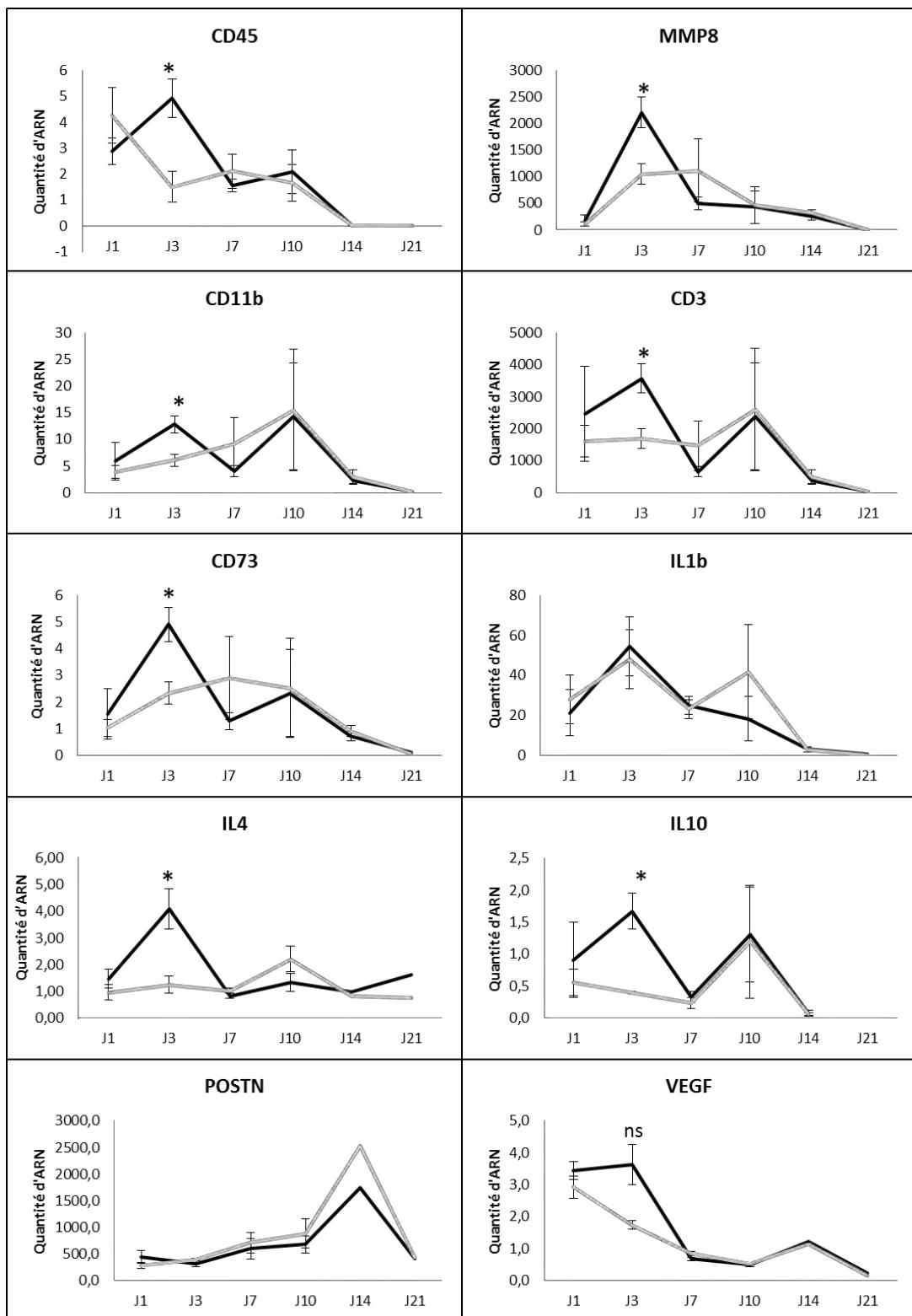


Figure 59 : Quantité d'ARN de facteurs protéiques impliqués dans la cicatrisation, relevée dans les tissus murins selon une cinétique temporelle.

N=3-4. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm ESM. Les lignes noires représentent les résultats obtenus avec les hASC, les lignes grises avec le contrôle i.e. la solution de NaCl.

Au regard des résultats obtenus par RT-qPCR, la déclaration d'une conclusion ne resterait que pure supputation. En effet, des quantités d'ARN de cytokines antinomiques quant à leur action furent simultanément augmentées en présence des hASC, des quantités d'ARN de marqueurs membranaires de cellules immunes furent également augmentées en présence des cellules humaines. En outre, nous avions vu que les hASC ne s'établissaient pas en majorité durablement dans les tissus (*cf.* partie III, chapitre IV, sous-chapitre C). On peut juste avancer que ces éléments laissent transparaître des évènements immunologiques d'importance avec la présence des hASC. Toutefois, il faut raison garder car nous avions observé uniquement des quantités d'acide ribonucléique.

Nonobstant, on peut imaginer qu'il se produit des évènements de prise ou de rejet de greffe. En effet, les quantités d'ARN de plusieurs classes de leucocytes, en l'occurrence, des macrophages, des neutrophiles et des lymphocytes, sont augmentées. De surcroît, des cytokines aux effets antinomiques sont manifestement présentes. L'ensemble de ces données reflètent une réaction immunologique conséquente ; d'autant plus qu'elle semble se produire uniquement lorsque les cellules humaines ont bien présentes dans les tissus murins. En outre, nous sommes dans une situation d'une thérapie cellulaire inter-espèce.

Pour clarifier la situation vers un rejet de greffe, il serait important de vérifier la quantité d'ARN des interleukines 2 et 5, qui sont les cytokines sécrétées par les lymphocytes T *helper* pour activer les mécanismes effecteurs du rejet du greffon [226]. Par la suite, nous pourrions augmenter les qPCR par des techniques permettant de sonder *in situ* ces cytokines et les cellules sécrétrices.

Pour clarifier une situation de prise de greffe, nous pourrions interroger les niveaux d'ARN de la protéine FOX3P qui est un marqueur spécifique des lymphocytes T régulateurs, lymphocytes impliquées exclusivement dans l'immunotolérance et l'immunosuppression [227]. Cependant, la présence de lymphocytes T régulateurs ne devraient pas coïncider avec la présence des ARNm codant pour les cytokines retrouvées dans cette étude, ni avec des cellules inflammatoires ; la prise de greffe est par conséquent peu probable.

Il peut être étonnant au vu de la description que fait la littérature scientifique de la souris *Nude* de penser à un rejet de greffe. Néanmoins, une souris *Nude* possède toutes les cellules requises pour développer une telle immunité (*cf.* partie III, chapitre II, sous-chapitre C). De plus, une expérience de greffon cutané réalisée au cours de mon doctorat laisse suggérer que la *Nude* est capable de rejet de greffe (données non montrées).

2. La réponse du tissu murin en fonction de la présence de cellules souches/stromales mésenchymateuses murines

Pour valider ou invalider notre hypothèse que le tissu murin répond à la nature humaine des cellules injectées, une manipulation pouvait être réalisée ; en lieu et place de l'injection de cellules mésenchymateuses humaines, nous pourrions injecter des cellules mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux de souris *Nude*.

Visiblement avec les cellules humaines, une réaction immunologique atteint son paroxysme au jour 3 après la brûlure et l'injection. Quelle serait la situation au jour 3 avec des mASC ?

Pour ce faire, nous avons interrogé les niveaux d'ARN du tissu³⁹ au jour 3 de plusieurs marqueurs par RT-qPCR avec des amorces pour le CD45, le CD163⁴⁰, le TNF α et l'IL-13⁴¹ avec l'adjonction d'ASC humaine et l'adjonction d'ASC murine.

En premier lieu, il fut observé que quel que soit le marqueur considéré, une augmentation significative des quantités d'ARN avec l'adjonction des cellules humaines par rapport aux conditions contrôles mais également, par rapport aux tissus traités avec les cellules murines (Figure 61). Manifestement, les cellules mésenchymateuses humaines déclenchaient une réaction inhérente à leur présence. L'allégation en faveur d'une réaction immunitaire en faveur d'une tolérance ou d'un rejet semblaient se renforcer.

En ce qui concerne les effets de l'injection des ASC de *Nude*, les résultats restèrent assez surprenants. En effet, aucune quantité d'ARN messagers ne semblait être significativement affectée. Visiblement, le seul qui présenta une légère augmentation fut le marqueur pro-inflammatoire, TNF α (Figure 60). Il en ressortait que la présence des cellules mésenchymateuses murines n'influait pas la mécanique tissulaire de cicatrisation, du moins dans les temps précoce. Un marqueur d'inflammation augmenté et un marqueur de fibrose inchangé à 72 heures de la blessure renvoyaient à un déroulement de cicatrisation « physiologique ». L'injection allogénique de cellules mésenchymateuses apparait ne pas influencer positivement ou négativement le développement de l'inflammation secondaire à la

³⁹ Ici, la discrimination des effets des cellules adjointes et de la réponse tissulaire était impossible. Cependant, la quantité d'ARN des mASC restait négligeable en ceci que la dilution d'un million de cellules sur un volume de 0,6 cm³ (1 cm² de tissu récupéré et l'épaisseur de la peau de *Nude* fait en moyenne 600 μ m) était évidemment trop importante.

⁴⁰ Récepteur *scavenger* de l'hémoglobine, retrouvé sur l'ensemble des types de macrophages [228].

⁴¹ Marqueur d'une immunité de type Th2.

brûlure. Encore ces données doivent être traitées avec prudence puisque seuls des quantités d'ARN ont été évaluées.

L'interrogation d'un tissu murin par RT-qPCR n'apporta pas une explication claire de l'amélioration de la cicatrisation par les cellules mésenchymateuses humaines. La seule conclusion acceptable qui a pu être émise est que la présence de cellules humaines bouleverse vraisemblablement, dans les temps précoce, le versant immunologique de la mécanique cicatricielle.

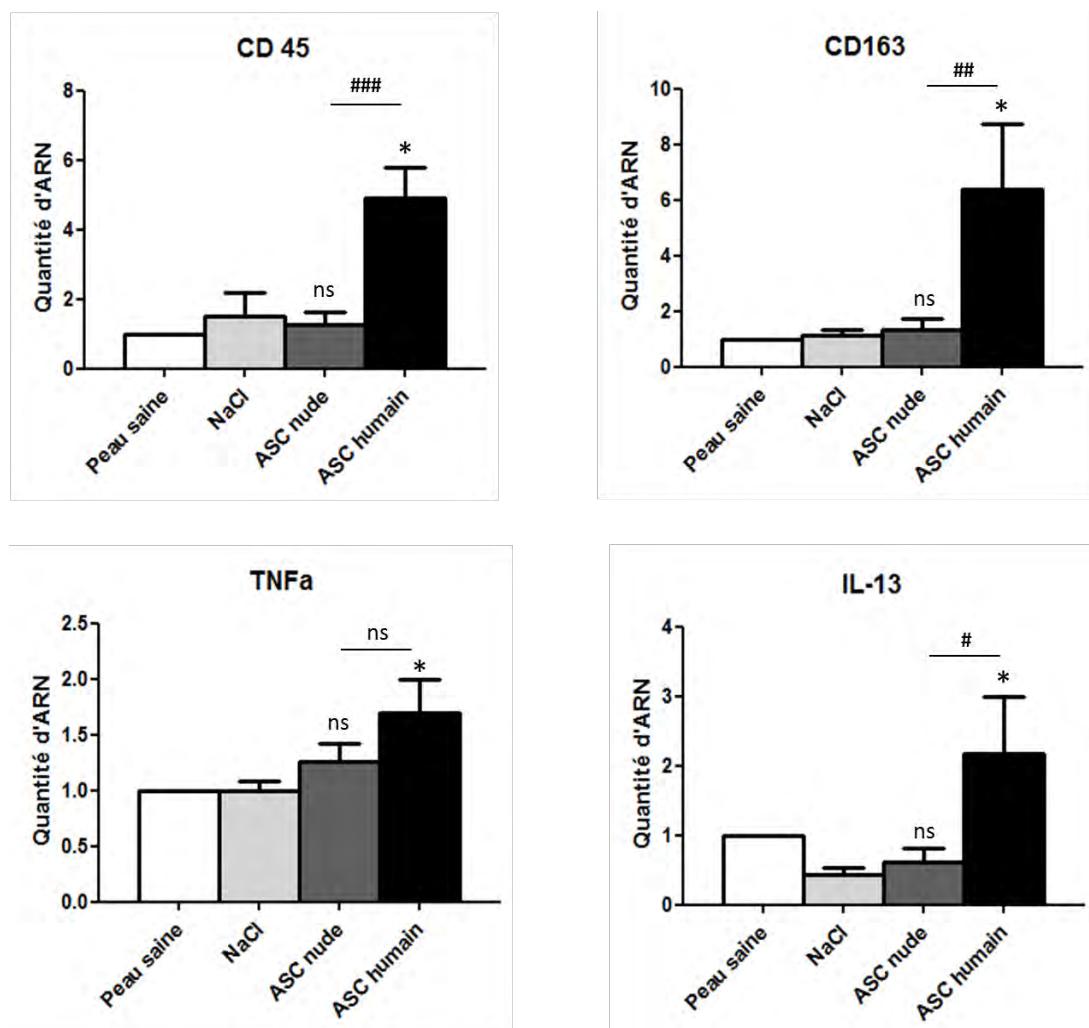


Figure 60 : Quantités relatives d'ARN messagers tissulaires au jour 3 après brûlure et injection.

N= 3 – 5. * p ≤ 0.05 NaCl vs. ASC Nude ou ASC humaines. # p ≤ 0.05 ; ## p ≤ 0.01 ; ### p ≤ 0.001 ASC Nude vs. ASC humaines.

F. Les hASC améliorent-elles la cicatrisation de brûlures profondes chez la souris *Nude* ?

Les manipulations explicatives sur l'amélioration ne permirent pas de dégager une explication sérieuse de l'amélioration de la cicatrisation induite par les hASC.

Toutefois, l'architecture de la blessure a été modifiée par rapport au protocole antérieur dans lequel une amélioration semblait être observée. Nous pourrions penser que la brûlure rectangulaire, même si elle représente, *a priori*, la même surface que le carré, semble altérer une plus grande étendue cutanée. Une surface brûlée plus conséquente va entraîner des changements biologiques certains dans l'ensemble de l'organisme tel qu'un syndrome inflammatoire par exemple. Le syndrome pourrait retentir sur les processus cicatriciels en les accentuant et donc, par conséquence, modifierait la mécanique de la thérapie cellulaire réalisée.

Il est donc nécessaire de vérifier si les hASC améliorent la cicatrisation de brûlures profondes et en l'occurrence, d'architecture rectangulaire.

En l'état, après nombre de brûlures, j'ai pu remarquer que l'injection de cellules mésenchymateuses humaines n'améliorait pas la cicatrisation de brûlures du second degré de forme rectangulaire.

A première vue, la superficie de la cicatrice pour les conditions contrôles était plus conséquente qu'avec les conditions thérapeutiques. Toutefois, en y regardant de plus près, l'aspect en surface des cicatrices présentait de fortes dissemblances. En effet, la cicatrice des conditions contrôles, qui semblait plus étendue, laissait entrevoir une apparence relativement lisse, sans marques de contraction cicatricielle (figure 61A). La palpation de la cicatrice cutanée révélait le recouvrement d'une élasticité, somme toute grossière, mais tangible. En revanche, la cicatrice laissée après thérapie cellulaire basée sur l'utilisation des hASC, bien que moins étendue, présentait des aspérités, des irrégularités mais également, les vestiges d'un processus de contraction de la blessure (figure 61A). En tout état de cause, au vu d'un examen macroscopique et partiellement clinique, la cicatrisation semble n'être aucunement améliorée par les hASC.

L'observation par techniques histologiques eut été nécessaire pour affiner les conclusions. Un trichrome de Masson fut donc réalisé sur coupes de peau incluses en paraffine. Les conclusions émises suite à l'observation de la surface extérieure de la cicatrice furent

confirmées par la coloration. Le derme issu de la cicatrisation dans les conditions thérapeutiques apparut avec une imprégnation plus marquée à la coloration au *vert-lumière*⁴². La fibrose cicatricielle semblait donc plus prononcée avec la présence des hASC (figure 61B). Par ailleurs, cette observation fut confirmée par les épaisseurs cutanées. La peau ayant supporté la cicatrisation dans les conditions thérapeutiques présenta une épaisseur plus importante que chez les contrôles ; en moyenne, 922,75 µm vs. 817,98 µm pour les contrôles (Figure 62C). Dans le détail, l'épaisseur épidermique après cicatrisation fut observée similaire dans les deux conditions (Figure 61C). Par contre, le derme, tissu conjonctif qui par définition subit la cicatrisation, fut observé augmenté chez les animaux ayant reçu la thérapie cellulaire ; en effet, l'épaisseur moyenne du derme chez les animaux traités atteignait 877,92 µm lorsque celle-ci atteignait 778,47 µm chez les contrôles (Figure 61C).

Au vu de ces données macroscopiques et histologiques, les hASC injectées dans les minutes après la brûlure n'amélioraient pas la cicatrisation des souris *Nude* dans un contexte de brûlures de second degré profond d'architecture rectangulaire.

Ces nouveaux résultats soulevaient de nombreuses interrogations. En effet, il se révélait être en opposition diamétrale avec les résultats obtenus précédemment au laboratoire. Mais, quelle en pouvait être la cause ?

L'architecture de la brûlure pouvait-elle avoir une incidence sur les effets bénéfiques des hASC ? Le changement d'expérimentateur aurait-il pu introduire des biais dans l'étude ?

Pour répondre à ces deux questions, nous avons en conséquence procédé à une manipulation en double expérimentateur.

L'expérimentateur avec lequel l'amélioration de la cicatrisation ayant été attestée dans le modèle de brûlure carrée a dû réitérer la manipulation tantôt avec des blessures d'architecture polygonale régulière tantôt avec des blessures rectangulaires. La même expérience m'a été, par ailleurs, confiée.

Les résultats semblaient confirmer les observations précédentes, à savoir que les cellules mésenchymateuses humaines n'apportaient macroscopiquement pas de bénéfices tangibles en ce qui concerne la cicatrisation des brûlures (Figure 62).

Finalement, la difficulté de reproductibilité des blessures entre les deux expérimentateurs ne nous permirent pas de démêler les causes des divergences rencontrées.

⁴² Colorant se fixant aux fibres de collagène. Plus précisément, une étape à l'*acide phosphomolybdique* (APM) a été réalisée préalablement ; cet acide se lie aux collagènes. Par la suite, le *vert-lumière* chasse l'APM pour prendre sa place.

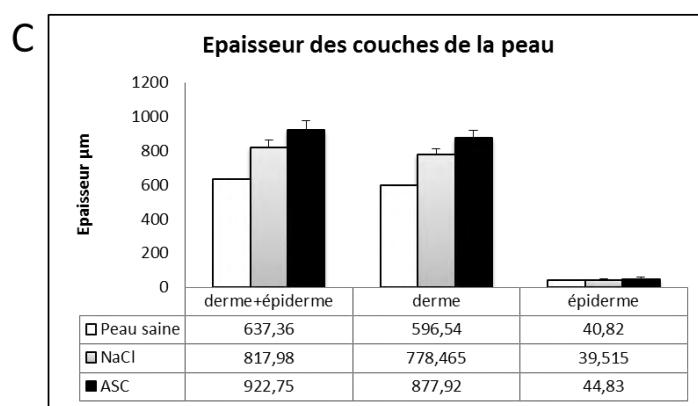
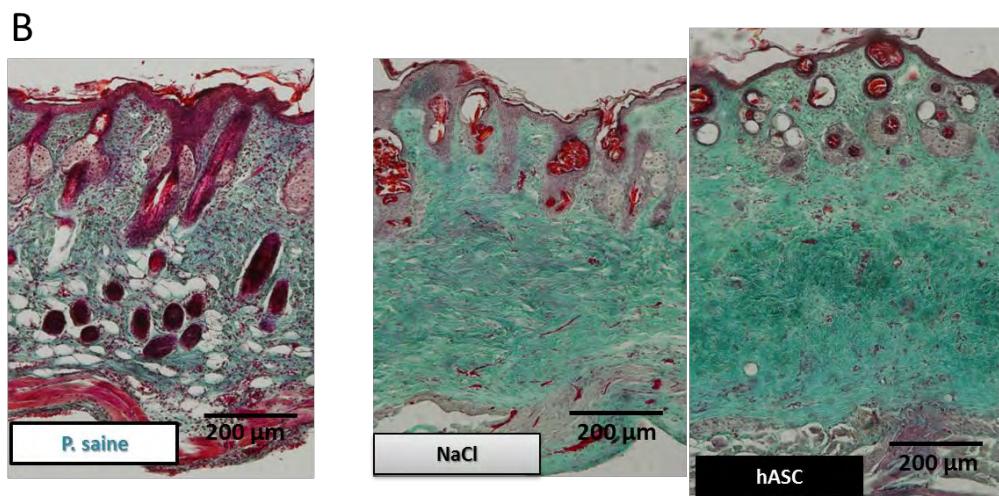
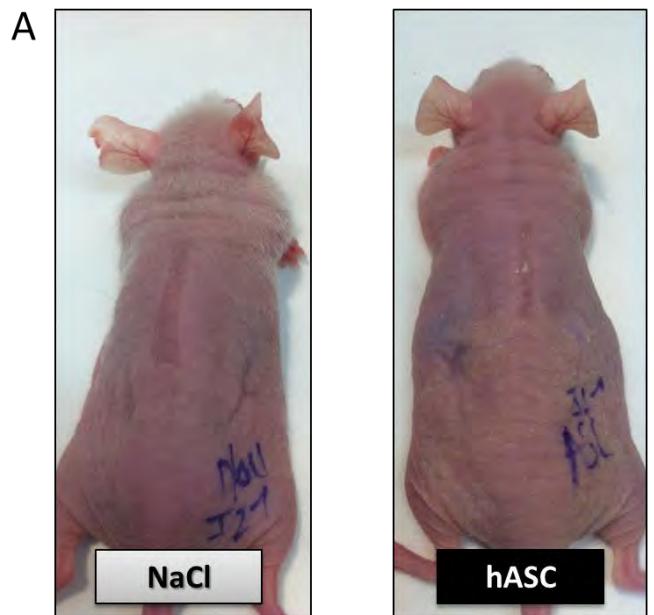


Figure 61 : Les hASC n'améliorent pas la cicatrisation des brûlures dans un modèle murin

A. Photographie macroscopique de la blessure au jour 21. B. Trichrome de Masson réalisé sur des coupes longitudinales de peau saine et de peau brûlées et traitées. C. Epaisseurs en μm des couches cutanées ; N=3.

Quoiqu'il en soit, plusieurs expériences complémentaires seront nécessaires pour affiner et prouver scientifiquement la précédente conclusion et les précédentes données ; d'abord, il faudrait calculer minutieusement la vitesse de réépithérialisation de la blessure dans les deux conditions expérimentales. Ensuite, il serait important d'évaluer en trichrome de Masson les cicatrices et d'augmenter ces données avec d'autres colorations spécifiques, ceci afin d'apprécier avec rigueur l'ensemble de la composante matricielle de la cicatrice. Par la suite, une étude approfondie des événements devraient comporter l'évaluation de la perfusion sanguine du tissu cicatriciel formé.

Au terme des expériences précitées, une conclusion argumentée devrait pouvoir être émise. Néanmoins, il convient de préciser que le traitement avec les cellules mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux de souris *Nude* n'a pas eu macroscopiquement plus de succès (données non montrées) ; suggérant que ce n'est pas la provenance des cellules qui pourraient en être la cause mais la nature de celles-ci.

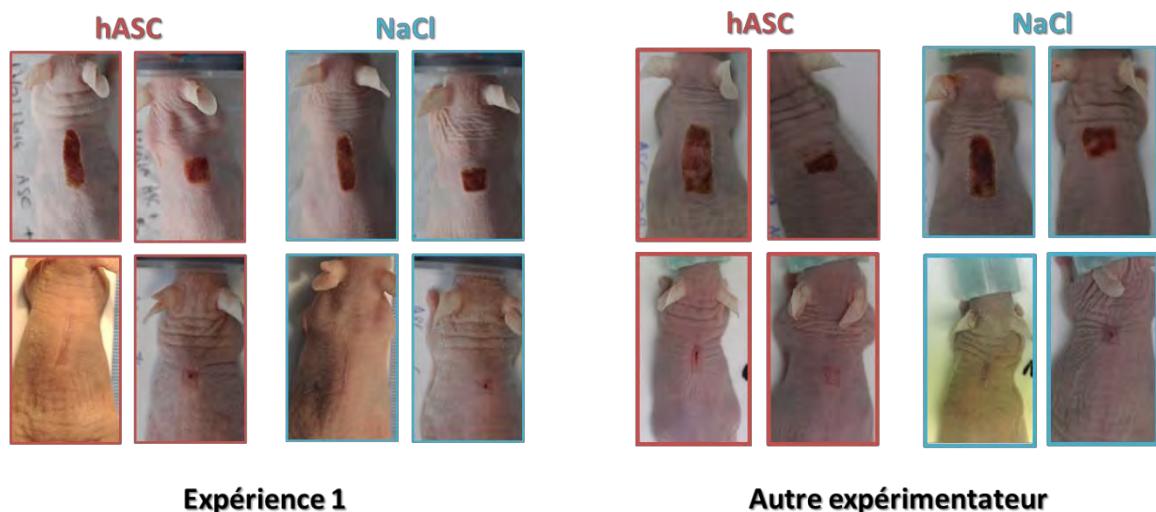


Figure 62 : Les hASC n'améliorent macroscopiquement pas la cicatrisation quelle que soit l'architecture de la blessure et quel que soit l'expérimentateur diligenté.

N = 2 x 5 par expérimentateur. Les images ont été prises aux jours 3 et 14.

G. Tentative de thérapie cellulaire avec les hASC après l'initiation de l'inflammation lésionnelle

Pour clore le chapitre sur la thérapie cellulaire basée sur l'utilisation des cellules mésenchymateuses en vue d'améliorer la cicatrisation cutanée, nous allons discuter d'une dernière manipulation dans laquelle les hASC seront injectées après l'initiation de l'inflammation consécutive de la blessure.

Nous avons vu dans la première partie de ce manuscrit que l'inflammation était une réaction nécessaire pour renseigner l'organisme de l'agression et de mettre en place par consécution, le début des proliférations cellulaires initiant la réparation tissulaire. Cette étape est évidemment cruciale pour le devenir cicatriciel et son arrêt, quelle qu'en soit la raison, serait délétère pour les suites de la cicatrisation.

En outre, la brûlure est une lésion évolutive en ce sens qu'elle progresse pendant plusieurs heures après son apparition i.e. que des destructions tissulaires surviennent encore bien après l'évènement lésionnel. Imaginons des cellules adjointes à ce moment précis, elles connaîtraient le même sort que le tissu qui les accueille. De surcroît, au vu des mécanismes mis en œuvre dans l'inflammation, une injection de cellules à cet instant serait manifestement préjudiciable pour le substrat cellulaire de thérapie en ce sens que le mécanisme de détersion inflammatoire pourrait également détruire les « cellules-médicaments » administrées.

Considérant les deux remarques précédentes, nous avons voulu vérifier si l'adjonction des cellules humaines après le début de l'initiation inflammatoire pouvait concourir à atténuer la cicatrisation des brûlures profondes chez la souris.

1. Matériel et méthodes

Le protocole de lésion et d'adjonction des cellules souches/stromales mésenchymateuses du tissu adipeux fut le même que pour les expériences précédentes. En revanche, l'administration des cellules humaines a été effectuée à 72 heures après la brûlure de sorte que la stabilisation de la brûlure soit opérée.

2. Résultats

Les résultats obtenus mettaient en évidence dans les deux conditions thérapeutiques, hASC ou contrôle, une étape de contraction de la blessure au jour 10 ainsi qu'une cicatrice relativement

hypertrophique en ce sens que la trace cicatricielle apparaissait sous une forme bombée et boursoufflée, au jour 21 (Figure 63). En outre, bien que cela n'ait pas été finement calculé, il semblerait que le processus de réépithérialisation soit plus rapide chez les contrôles que chez les souris traitées (Figure 63, jour 7 et 10). Enfin, l'aspect macroscopique des cicatrices fut comparable entre les conditions traitées ou contrôles (Figure 63, jour 21).

Manifestement, dans ces conditions, les hASC n'améliorent pas visuellement la cicatrisation des brûlures profondes. Toutefois sachons raison garder, car une étude approfondie des caractéristiques matriciels et tissulaires des cicatrices, quelles que soient les conditions, n'a point été menée à son terme.

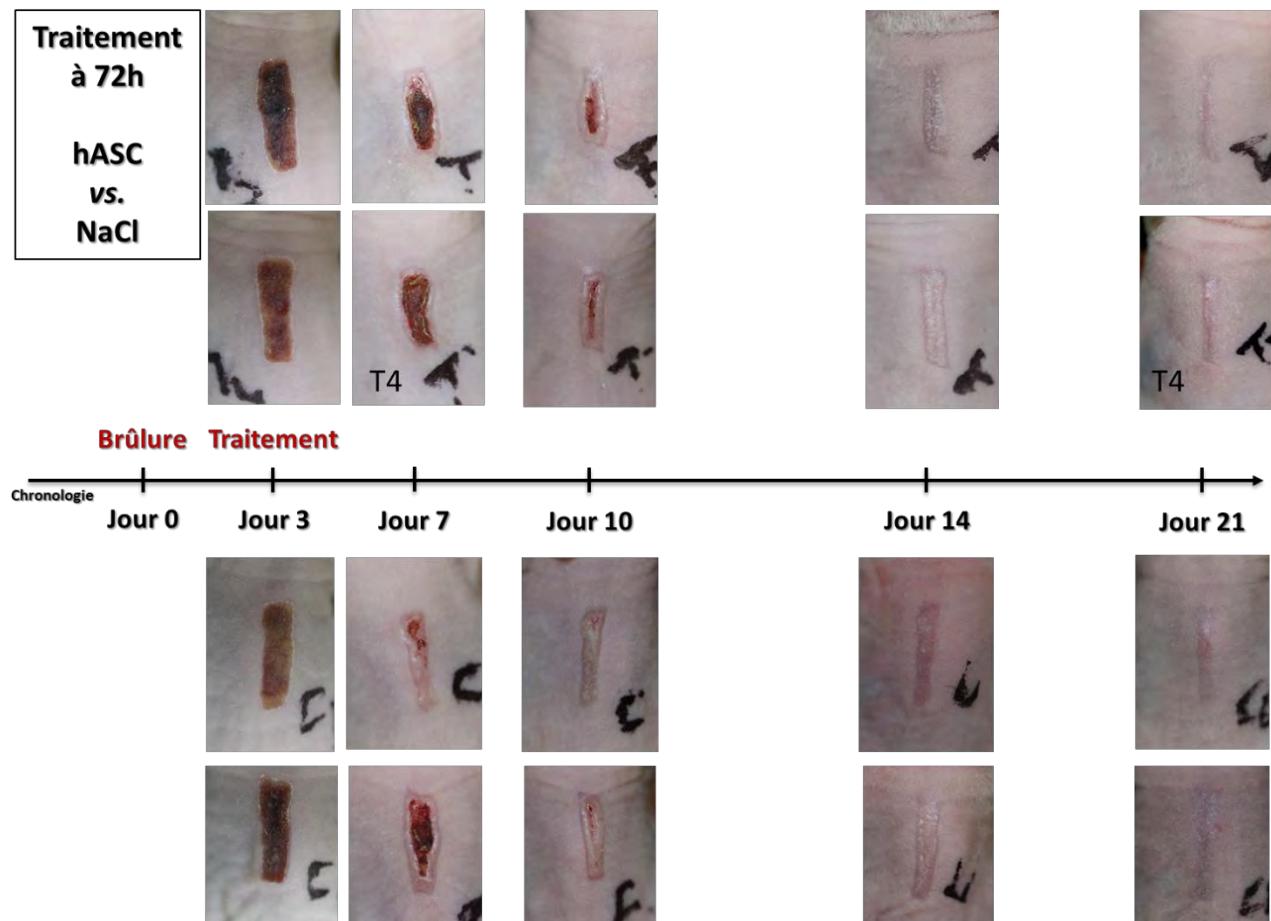


Figure 63 : Les hASC ne possèdent pas macroscopiquement d'effets bénéfiques sur la cicatrisation des brûlures du second degré profond.

Les conditions au-dessus de la flèche chronologie sont celles avec l'adjonction des hASC ; en dessous, celles avec la solution isotonique de NaCl. N = 8.

H. Conclusions sur l'utilisation de cellules mésenchymateuses en vue d'une amélioration de la cicatrisation.

Les études décrites dans ce manuscrit considéraient un cas particulier de cicatrisation. En effet, la cicatrisation de brûlures profondes propose, dans de nombreux cas, une hypertrophie. L'hypertrophie cicatricielle ne peut se classer parmi les situations cicatricielles dans lesquelles des situations inflammatoires chroniques sont observées (les ulcères ou les arthrites) en ce sens que la cicatrisation hypertrophique a terminé l'inflammation lésionnelle de façon certaine ; et en outre, elle ne peut se définir comme une chéloïde qui semble se développer en terrain génétique favorable. La cicatrisation hypertrophique est, semblerait-il, même si cela reste à démontrer fermement, une anomalie amplificatrice de la phase cicatricielle i.e. de la phase d'immunité Th2 de la cicatrisation. Il s'agit d'un excès, fut-ce transitoire, de la contraction mais surtout du dépôt de collagène de type I. En tout état de cause, elle semble consécutive à une inflammation massive mais non itérative ; la quantité de tissus subissant l'inflammation étant importante, la phase de dépôt matricielle en devient probablement exagérée. La brûlure en provoquant une destruction massive de tissus et donc une forte inflammation est propice à se réparer selon une telle anormalité cicatricielle.

Dans cette exagération cicatricielle, les résultats obtenus avec les hASC se sont montrés contradictoires en ceci qu'il a été observé une amélioration de la cicatrisation avec l'administration des hASC sur un protocole de brûlures profondes d'architecture polygonale régulière, avec injection des cellules à une demi-heure après traumatisme, mais une absence d'effet sur un même protocole dans lequel en revanche, l'architecture lésionnelle était de forme rectangulaire.

Au vu des expériences menées dans ce manuscrit et des techniques employées, il semblerait que les hASC ne montrent aucun bénéfice quant à l'orientation cicatricielle de brûlures de second profond d'architecture rectangulaire. En effet, bien que les cicatrices retrouvées chez les animaux traités semblent de moindre surface, leur aspect macroscopique témoigne d'évènements certains de rétraction et, présente un aspect superficiel irrégulier non retrouvé chez les contrôles ; en outre, les colorations histologiques, certes sur un nombre réduit d'animaux (3 animaux), montrent que la cicatrice fibreuse chez les animaux traités est plus épaisse et plus compacte que chez les contrôles. Néanmoins, des expériences complémentaires doivent être réalisées pour clarifier ces données et caractériser le plus

finement possible les cicatrices constituées dans les deux conditions expérimentales, à savoir pour les souris traitées avec les hASC et les souris traitées avec une solution de *NaCl*.

Bien que les résultats ne soient pas ceux espérés, plusieurs stratégies expérimentales ont été réalisées sur cette première étude ; les stratégies ont été ourdies, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* dans le but de comprendre l'apport biologique des hASC.

In vitro, nous avons choisi de caractériser les interactions entre les cellules humaines et les macrophages murins. Les macrophages étant des cellules immunes primordiales quant aux mécanismes qui gouvernent la cicatrisation, nous avons pensé que l'étude de ce type cellulaire serait une piste prometteuse [cf. Partie I, chapitre II].

Nous avons pu mettre en évidence à l'aide de systèmes de co-cultures hASC/macrophages qu'une communication par contact, à ce jour de nature non caractérisée, s'établissait entre ces deux entités cellulaires. La co-culture par contact entraîna une diminution numérique de macrophages stimulés IFN γ /LPS exprimant le phénotype membranaire d'origine. Autrement dit, la part de macrophages présentant un phénotype inflammatoire fut diminuée par contact des ASC humaines.

In vivo, en revanche, la faiblesse de la surface cicatricielle, reflet d'une contraction, et l'épaisseur conséquente de la cicatrice avec un réseau dense de collagène nous interroge sur un effet possiblement délétère. Ces assertions restent, néanmoins, en débat dans mon unité de recherche.

Pour amener un linéament d'exégèse, nous devrions nous attarder sur la nature des cellules mésenchymateuses. Lorsque nous récoltons ces cellules, quels que soient les tissus originaires, la sélection se fait par adhérence au plastique. Considérant que seules les cellules du conjonctif adhèrent aux plastiques, nous pouvons décentrement émettre l'hypothèse que les fibroblastes constituent une large partie de cette composante cellulaire. Or, lors de la cicatrisation et à plus forte raison, lors d'une hypertrophie cicatricielle, ce sont les fibroblastes qui sécrètent la matrice extracellulaire et en l'occurrence, le collagène. Si nous ajoutons d'autres fibroblastes par la présente thérapie cellulaire, il est concevable que l'effet obtenu soit un renforcement de la sécrétion matricielle donc une cicatrice plus hypertrophique. Bien que le nombre apporté soit négligeable (1 million de cellules), les cellules peuvent vraisemblablement par leurs sécrétions amplifier la réaction fibrotique. Ces hypothèses reflètent mon propre sentiment ; des expériences pourraient être menées en ce sens pour les rejeter ou les valider.

Toutefois, il s'avère que les ASC ne s'établissent point, pour majorité, durablement dans les tissus hôtes. Ce défaut de repeuplement durable est inexpliqué. Plusieurs interrogations restent en suspens : l'injection n'est-elle pas traumatisante pour les cellules ? La zone lésionnelle est-elle agressive pour les cellules injectées ? La zone lésionnelle peut-elle amener assez de nutriments aux cellules rajoutées ? En ce sens, des expériences préliminaires ont été intentées ; les cellules ont été adjointes à la zone à l'aide d'un biomatériau organique (feuilles de plasma sanguin coagulé) (données non montrées). Dans cette situation, les cicatrices observées se sont révélées – bien qu'il faut émettre beaucoup de prudence dans nos propos – de surfaces et d'épaisseurs moindres ; par contre, les apports du plasma sanguin et des ASC n'ont pu être discriminés.

Bien que les cellules mésenchymateuses semblent avoir un effet bénéfique sur les situations inflammatoires chroniques⁴³, elles n'ont pas visiblement d'effets sur les anomalies que sont les cicatrisations excessives.

En revanche, il ne faut pas oublier que nous étions dans une situation *xénogénique*. Les RT-qPCR semblaient montrer un emballement des réactions immunologiques au niveau de la blessure. Le rejet de greffe est vraisemblablement la possibilité la plus probable en ceci qu'il a été constaté dans les tentatives d'humanisation de la souris *Nude* (données non montrées). Mais, au regard de la littérature actuelle, de nombreuses zones d'ombre subsistent quant à l'incidence d'un tel rejet sur le devenir cicatriciel. Nonobstant, dans notre étude, les manipulations en allogénique, voire en *syngénique* ne démontrent pas d'amélioration de la cicatrisation.

L'utilisation de cellules mésenchymateuses n'a pas, dans l'étude présentée dans ce manuscrit, prouvée d'efficacité bénéfique dans la prise en charge de cicatrisation de brûlures.

Il a par conséquent été entrepris de réorienter la réflexion uniquement autour de l'inflammation qui reste, à ce jour, une cause présumée de l'hypertrophie ou du moins, d'une réaction cicatricielle importante mais vers la physiopathologie de l'exubérant dépôt matriciel. La nouvelle thérapie proposée vous sera proposée en seconde partie de l'étude expérimentale. En substance, la blessure sera traitée après initiation de l'inflammation en vue de s'appuyer sur les effets prolifératifs de cette réaction immunitaire ; enfin, le dessein du traitement sera

⁴³ Intellectuellement, cet état de chose peut s'expliquer en considérant que les cellules mésenchymateuses participent à une phase de type 2 i.e. antinomique de l'inflammation. Leur rôle « immunomodulateur » aussi bien retrouvé chez les fibroblastes de derme [229] peut se voir selon l'angle de l'immunité de type Th2 en ceci qu'ils sont partie prenante dans la constitution de la cicatrice et donc, contraires à une inflammation de type Th1. Aptitude probablement efficace dans une inflammation chronique en ce sens qu'elles orienteraient présumément l'inflammation délétère vers une cicatrisation.

d'atténuer ou plutôt d'inhiber la phase de dépôt matriciel de la cicatrisation et ce, afin d'observer les mécanismes réparateurs qui se substituent.

Le traitement sera basé sur l'utilisation d'un plasma froid atmosphérique porté conjointement par de l'hélium à hauteur de 100 % (2 slm) et de l'oxygène à hauteur de 0,1 % (0.2 slm).

V- Plasma froid atmosphérique pour la réparation cutanée : une nouvelle étape vers la régénération mammalienne ?

La majeure partie des résultats sont présentés dans la publication non finalisée du paragraphe A. Aussi, dans un paragraphe B, seuls seront exhaustivement décrits, la mise en place du procédé et les résultats non commentés dans la publication.

Pour cette seconde partie expérimentale, nous avons voulu, pour élaborer une thérapeutique « régénérative », intégrer les nouvelles connaissances délivrées par la littérature sur la régénération et la cicatrisation.

Pour ce qui avait attiré à la régénération, une constance reste récurrente ; le système immunitaire est permis [cf. Partie I, chapitre I, sous-chapitre A]. En somme, la régénération chez les vertébrés semble dépendante de la tolérance périphérique. La tolérance périphérique chez les mammifères est connue et permet d'inhiber les réactions auto-immunes induites par des lymphocytes auto-réactifs ayant échappé à l'élimination centrale [230] ; mais, est-elle inductible ?

La cicatrisation quant à elle fait appel dans sa phase de dépôt matriciel à l'immunité de type Th2 [cf. Partie I, chapitre I, sous-chapitre B]. En effet, l'apparition des cytokines IL-4, IL-13 et TGF- β 1 orientent les phénotypes cellulaires vers une nature cicatrisante ; à savoir, les macrophages vers un type « cicatrisant » et les fibroblastes vers les myofibroblastes. La question est de savoir si, étant une réaction immunitaire, la réaction de dépôt matriciel de la cicatrisation peut être circonscrite.

Dans les deux cas précités, la mort cellulaire programmée, l'apoptose, détient une place particulière. En ce qui concerne la régénération, elle est massivement retrouvée avant la mise en place des processus régénératifs chez l'hydre, la planaire et l'amphibien.

Chez le mammifère, l'apoptose ponctue les différentes phases de la cicatrisation. En effet, la mort des neutrophiles par l'apoptose provoque, si la plaie n'est pas infectée, l'arrêt de l'inflammation post-lésionnelle et favorise l'apparition des mécanismes cicatrisants proprement dit. En outre, l'apoptose des myofibroblastes vient mettre fin à la phase de dépôt matriciel.

Enfin, nous savons que le phénomène par lequel les macrophages prélevent les corps apoptotiques, l'efférocytose, induit une permutation phénotypique chez ces derniers vers un sous-type dit « régulateur » dont l'action est dirigée vers une immunosuppression. Or,

l'immunosuppression est capable de stopper les immunités Th1 et Th2 c'est-à-dire l'inflammation post-lésionnelle et la réaction cicatrisante.

Si ces phénomènes sont avérés, l'apoptose pourrait répondre à l'une des causes présumées de l'hypertrophie, une inflammation prolongée tout en atténuant la physiopathologie de cette-ci, un dépôt matriciel exacerbé.

Le dessein de cette partie expérimentale était, au vu des précédentes hypothèses, de se servir de l'apoptose pour circonscrire la survenue d'une cicatrice, fût-ce hypertrophique, dans un modèle murin de brûlure profonde.

D'abord, il fut intégré la connaissance que les molécules inflammatoires sont en grande partie à l'origine des phénomènes prolifératifs post-lésionnels ; il a été donc choisi d'appliquer le traitement après que l'inflammation post-lésionnelle se soit mise en place.

Dans un deuxième temps, il était indispensable d'obtenir de l'apoptose de manière conséquente. Il était possible soit d'injecter des corps apoptotiques en nombre et uniquement apoptotiques aux abords de la plaie, soit de provoquer une vague apoptotique directement au niveau de la zone lésionnelle.

La seconde option a été préférée. Pour ce faire, nous avons utilisé un plasma froid atmosphérique pour essayer de reconstituer une vague apoptotique à l'orée de l'initiation de phase de dépôt matriciel du processus de cicatrisation. Bien que l'apoptose n'ait pu être qualitativement et quantitativement observée, le traitement basé sur l'utilisation d'un plasma froid atmosphérique a montré des résultats très encourageants quant à la cicatrisation de brûlures profondes dans notre modèle murin.

A- Publication

A single CAP exposure selectively affects cells involved skin wound healing and improves tissue reconstruction after burn

Guillaume Perez^{1,2,3,4}, Olivier Abbo^{1,2,3,4}, Anne-Laure Bulteau⁵, Marlène Dezest⁵, Jean-Pierre Cambus⁶, Ambre de Berail^{1,2,3,4}, Mireille André^{1,3,4}, Louis Casteilla^{1,2,3,4}, Franck Clément^{5*}, and Valérie Planat-Benard^{1,2,3,4,*}

1. CNRS UMR5273 STROMALab, BP 84225, F-31 432 Toulouse Cedex 4, France; 2. Université Paul Sabatier de Toulouse, BP 84225, F-31 432 Toulouse Cedex 4, France; 3. INSERM U1031, BP 84225, F-31 432 Toulouse Cedex 4, France; 4. EFS Pyrénées – Méditerranée BP 84225, F-31 432 Toulouse Cedex 4, France ; 5. Université de Pau et des Pays de l'Adour UPPA, IPREM UMR 5254, LCABIE, Plasmas and Applications, F-64 000 Pau, France. ; 6. Haematology Department, Rangueil Hospital, Toulouse, France.

*Co-corresponding author:

Dr. Valerie Planat-Benard

UMR 5273 CNRS, UPS, EFS, Inserm U1031

STROMALab

BP 84 225, 31 432 Toulouse, France

valerie.planat@inserm.fr

Dr. Franck Clément

UMR 5254 CNRS, UPPA

IPREM - LCABIE

2 avenue président Angot, 64 000 Pau, France

franck.clement@univ-pau.fr

Running title: CAPs in mouse wound healing

Keywords: Cold atmospheric plasmas, ionization waves, guided streamer, wound healing, dermal cells, inflammatory cells, skin burn.

Introduction

Skin wound healing is a complex dynamic process involving various subsets of resident and recruited cells, signaling factors, extracellular matrix deposition and fibrotic tissue remodeling [Gurtner, Nat 2008]. The immediate goal after injury is repair to rapidly restore tissue integrity and functional recovery even though this process is also associated with tissue organization modification with scar formation. One ultimate and challenging goal is regeneration to achieve functional recovery together with a tissue reconstruction identical to uninjured tissue. Accordingly, disruption of cellular events occurring in the skin repair process lead to significant healing complications ranging from chronic wounds that never heal to hypertrophic scar and fibrotic disease that substantially contribute to the global health burden. Indeed prolonged inflammation, fibro-proliferation and excessive matrix deposition have been incriminated in pathological wounds [Mantovani J.Pathol. 2013], [Arlett J.Pathol. 2013], [Kingberg J.Pathol. 2013] and represent determinant processes to target in view to gain significant insights for regenerative medicine.

Cold atmospheric plasmas (CAPs) refer to partially ionized gases produced by applying localized high electric fields to gaseous volumes at atmospheric pressure. By using specific dielectric materials and particular high power supplies, these CAPs can be produced directly on the substrate exposed as for instance the direct Dielectric Barrier Discharge (“direct DBD”) introduced by Kogelshatz et al. and applied for the first time by Fridman et al. [Kogelshatz J.Phys IV Fr. 1997],[Fridman Plasma Processes & Polymers 2008]. Along CAPs, one other specific type consists in the propagation of ionization waves guided by a dielectric tube induced preferentially in a noble gas. These ionization waves are called “guided streamer” and interact with the surrounding air atmosphere leading to the formation of Reactive Oxygen and Nitrogen Species (ROS/RNS) due to their multi-energy composition. Indeed and depending of the experimental conditions used, these CAPs processes are composed of numerous energetic components in variable proportions: electrical charges, electric fields, ROS/RNS, photons, temperature. Concerning the temperature, it is admitted that this last is closed to the room one and thus biologically compatible.

The recent use of CAPs at the clinical level in wound healing setting opened up to an increase of interest for wound treatments with promising breaking developments for various biomedical applications [Isbary Clin. Plasma Med. 2013]. In the treatment of chronic skin wound infections CAPs are proposed to simultaneously kill bacteria and promote wound healing. However the underlying mechanisms of action at the cellular and molecular level are still poorly understood. At the cell level, exposures to CAPs have been demonstrated to target

cell membrane integrity, protein function and to generate DNA damages with consequences on cell signaling, proliferation and survival [Dobrynin New J. Physics 2009]. In response to CAPs short exposures *in vitro*, cell proliferation is observed, while longer exposures rather promote apoptosis in various cell types including skin cells [Kalghatgi Ann. Biomed. Eng. 2010], [Fridman Plasma Chem. Plasma Process 2007], [Kalghatgi PLoS ONE 2011], [Liebmann Nitric Oxid 2011]. Experiment on breast epithelial cell lines demonstrates that CAPs exposures cause cell growth arrest with replication stop due to DNA damage induced by reactive species such as amino acid peroxidation within the liquid medium and to intracellular reactive oxygen species (ROS) production [Kalghatgi PLoS ONE 2011]. HaCaT keratinocytes exposed to a direct dielectric-barrier discharge (DBD) argon and air plasma, demonstrated that plasma affected integrin expression through induction of ROS causing cells to enter apoptosis [Haertel BioMed. Res. Int 2013]. In addition to oxygen species, reactive nitrogen species (RNS) may be responsible of biological effects of CAPs as demonstrated in primary endothelial cells and keratinocytes [Liebmann Nitric Oxid 2011]. At the tissue level, intact skin exposure to CAP can cause epidermal to dermis deep damage depending on the power and duration of CAP exposure as reported in pig [Wu J. Surg. Res. 2013] and nude mice [Duval PLoS ONE 2013]. In wound healing models where skin was injured by incision or punch, CAPs treatment allowed a rapid coagulation and an acceleration of the wound closure [Garcia-Alcantara Arch. Med. Res. 2013] possibly by modification of inflammatory cells recruitment and cytokines production [Arndt PLoS ONE 2013]. Taken together these studies relay promising hopes in CAPs medicine to improve wound healing and skin tissue regeneration. However only limited and cautious conclusions can be hypothesized on CAPs mechanisms of action as distinct device and gas compositions were tested that may generate diverging and incomparable results.

In the present study we performed an original model of skin burn by scalding reproducing a deep partial skin burn model relevant in human burn care. A single CAP treatment issued from ionization waves in Helium/Oxygen gas mixture was performed after the initial inflammatory phase taking place in the healing process (3 days post-scalding) and local skin tissue reaction was analyzed. We obtained a remarkable wound closure with minimal scarring. We also brought evidences that immune cells were sensitive to CAP treatment resulting in a better resolution of the inflammatory process in the early phase, while skin cells such as dermal fibroblasts and mesenchymal stromal cells were more resistant to CAP treatment, and acted to improve tissue reconstruction with limited scar formation in the later remodeling phase.

Materials and Methods

Plasma Device

The plasma process is composed of three important elements. Firstly the reactor is a dielectric tube in alumina in which a tungsten filament is inserted and high-voltage powered. A metallic cylinder is fixed around the dielectric tube and grounded, thus allowing the application of high electric fields between the tungsten filament and this metallic cylinder. This DBD configuration allows limiting the current and avoids the formation of an electrical arc. Due to the very thin diameter of the tungsten filament, a point effect induces the formation of specific ionization waves, which are guided by the dielectric tube and propagate in the surrounding air until several centimeters.

Secondly the High-Voltage power supply delivers periodic high-voltage pulses of short durations and low frequency, so that the pulse duration is largely shorter than the period of the signal. This way the system produces pulsed CAPs, which considerably limit the gas temperature, closed to the room temperature. For this purpose, electrical conditions are fixed: pulses frequency = 10 kHz, high voltage amplitude = 5 kV, duty cycle = 1%.

Finally the third element is the gas used. Helium noble gas has been chosen due to its lower breakdown voltage and to the fact that the propagation of ionization waves is easier with this gas. A low percentage (1%) of molecular oxygen is added in helium leading to a lower concentration of the gaseous ROS produced inside the guided streamer but also considerably annihilating the production of UV photons. Total gas flow is fixed at 2slm so that the hydrodynamic flow is laminar and not turbulent, which could interfere with the ionization waves produced [Papadopoulos Phys. D Applied Physics 2014].

Mouse model of skin wound healing

Experiments were performed on 6- to 8- week-old female athymic *Nude* mice (Harlan Laboratories). Animals were housed in a controlled environment (12-hour light/dark cycles at 21°C) with unrestricted access to water and standard chow diet. All experimental procedures were done in compliance with French Ministry of Agriculture regulations for animal experimentation. Mice were initially ovariectomized at 4-week-old before undergoing wound healing experiments 2 weeks later. For scald burn mice were anesthetized with an injection of Xylazine 50 mg/kg, Kétamine 10 mg/kg prior to surgery. Mice were wrapped into an adhesive isolating dressing (Algoplaque® DuoDERM®) opened by a 0.5cm x 2cm window to delimitate a 1 cm² area of dorsal skin. The skin was then exposed to 70°C water for 10 sec to

generate a partial thickness deep burn and the dressing was removed. Post-lesional sedation was provided for the first 7 days with Tramadol hydrochloride (Grunenthal Lab.) added to the drinking water at the dose of 4.3 mg / kg / day. Mice were weighed and wounds inspected daily for signs of infection. CAP treatment procedure was performed 3 days after scalding. Mice were anesthetized with an injection of Xylazine 50 mg/kg, Ketamine 10 mg/kg and placed under CAP device. Mouse skin was exposed in one point for 1 min to CAP (voltage amplitude = 5kV, pulses frequency = 10 kHz, duty cycle = 1%, total gas flow = 2slm, gas mixture of He/1% O₂, distance from the tip of the dielectric tube to the mouse target = 2cm). Sham animals were submitted to similar procedure with exposition to the same gas flow but non-ionized like CAPs. Time course analysis of wound healing was evaluated by macroscopic wound closure measurement (canon EOS 1100D camera) and by analyzes of skin tissue samples. Before removal of skin tissues, mice were killed by cervical dislocation according to ethical approved procedure.

Histological analysis

After anesthesia the dorsal skin tissue was removed from mice and was cut in the lengthwise in 5µm sections after formalin-fixation and paraffin-embedment. Hemalun-eosin coloration and Masson's trichrome coloration consisting in Weigert's hematoxylin step, a fuschinponceau step, an Orange G step and a light green coloration were performed according to standard practices. Slides were observed under a Leica DMRB microscope (Leica DMRB type 301-371, 010).

Immunofluorescence experiments were carried out on paraffin sections. After rehydration, an antigen retrieval step was performed with a citrate buffer and a microwave cooking (2x5min). The primary antibodies used were anti-CD45 (Santa Cruz sc-53665), anti-CD3 (BD 555273), and anti-GR1 (eBioscience 14-5931-85). The fluorescence was then analyzed under a Leica DMRB microscope (Leica DMRB type 301-371, 010). Data acquisition was made on *Image J* software.

Skin tissue mRNA isolation and quantitative RT-PCR analysis

RNA was isolated from skin mouse with the RNeasy Mini kit (Qiagen). Reverse transcription was performed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Power SYBR Green Master Mix, Fast SYBR Green Master Mix or TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) was used for PCR amplification, and samples were run on a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Relative gene

expression was calculated by the $\Delta\Delta CT$ method and normalized to rplp0. The primer sets for each gene are listed in Supplementary Table 1.

Cells isolation for in vitro experiments

Various subsets of cell were prepared from ovariectomized *Nude* mice tissue samples.

Adipose mesenchymal stromal cells (ASC): ASC were prepared from subcutaneous adipose tissue. Adipose tissue were dissected and mechanically dissociated before digestion at 37°C with collagenase NB4 (SERVA electrophoresis) for 30 minutes. After removal of undigested fragments by filtration (25 μ m) cells were collected by centrifugation at 630g for 10 minutes. The pellet was incubated for 5 minutes in hemolysis buffer (StemCell Technologies, Canada) to eliminate red blood cells and washed by centrifugation in PBS. Cells were counted and plated in DMEM-F12 medium containing 10% of newborn calf serum.

Dermal cells: briefly, dermal cells were isolated by mechanical digestion then enzymatic digestion using collagenase NB4 (SERVA electrophoresis) and dispase II (Roche). Centrifugations and filtrations allowed to isolate dermal cells that were seeded at 9,000 cells/cm² in DMEM F-12 culture medium (Invitrogen) supplemented with 10% Newborn Calf Serum, 100 μ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, 25 μ g/ml amphotericin (Invitrogen). Adherent cells were cultured for 5 days at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ until they reached 50% of confluence.

Macrophages: resident macrophages were harvested by washing the peritoneal cavity with sterile NaCl 0.9%. Collected cells were centrifuged and the cell pellet was washed in PBS. Macrophages were then seeded in DMEM-F12 medium (Invitrogen) supplemented with 5% Newborn Calf Serum, 100 μ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin and 25 μ g/ml amphotericin (Invitrogen). Cells were allowed to adhere for 2 h at 37°C, 5% CO₂. Non-adherent cells were then removed by washing with PBS and adherent macrophages were maintained in culture for 5 days before use.

T cells: after mechanical digestion of the spleen, T cells were isolated by Pan T Cell Isolation Kit II, mouse (Miltenyi Biotec). Then, T cells were activated with T Cell Activation/Expansion Kit (Miltenyi Biotec) before flow cytometry analysis.

Proteasome activity measurement

Peptidase activities of the proteasome were assayed with fluorogenic peptides. Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-amidomethylcoumarin (LLVY-AMC) as previously described (Bulteau et al, 2007). The mixture, containing 20 μ g of cytosolic total protein in 25 mM Tris, pH 7.5, was

incubated at 37°C with the appropriate peptide substrate (25 μ M LLVY-AMC) in a final volume of 200 μ l. Enzymatic kinetics were monitored in a temperature-controlled microplate fluorimetric reader (Fluostar Galaxy; bMG, Stuttgart, Germany). Excitation/emission wavelengths were 350 nm/440 nm.

Statistical analysis

Quantitative results were expressed as means \pm SEM from at least 3 individual experiments. Comparisons between control and CAP treated groups were made with the unpaired t-test using Prism 5 software (GraphPad). Significance was defined as * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.001$.

Results

Mouse model of scald burn

We developed an original mouse model of scald to generate a reproducible deep partial thickness wound. A delimitated 1cm² dorsal skin area was immersed in 70°C hot water for 10 seconds and the skin wound was analyzed after 48 hours (figure 1a). Histological analysis of the skin showed the absence of epidermis and confirmed that the lesion extended to the deepest layer of the dermis without affecting hypodermis 48 hours after scalding (figure 1d). Compare to normal skin (figure 1c), burned skin thickness is reduced to 60% (Figure 1b, 1d).

CAP characteristics and treatment

We then set up a procedure to treat the deep partial thickness wound consisting in a single CAP exposure 3 days after burn (figure 2a). Mice were then exposed to CAP for 1 min on a single point in the top of the wound at a distance of 2 cm from the source. CAP device as indicated in figure 2b consists in the formation of a guided streamer with a luminous activity of several centimeters in length. Gas mixture (He/1% O₂) is introduced in the cylindrical dielectric tube and adjusted by using mass-flow controllers. High-Voltage power supply is connected to the inner filament inserted in the tube, thus leading to the superposition of an ionization wave coupled with the hydrodynamic laminar gas flow.

CAP composition was defined according to *in vitro* results. We first tested various gas mixture composed of He or He/1% O₂ and performed spectral analysis (Optical Emission Spectroscopy) of the main reactive gaseous species produced along the guided streamer at a distance of 2cm from the top of the reactor. Figure 2c thus indicates the relative

concentrations of the main atomic and molecular emissions due to specific gaseous excited species containing oxygen and nitrogen.

Single CAP treatment improve burn skin wound healing

Mice were burned by scalding and treated by CAP exposure three days later. The three days delay let the initial phases of inflammation required for wound healing process taking place. This delay also allows the stabilization of the lesion in agreement with conventional burn care in clinic, where further treatment decisions are made 48 to 72 hours after the scald and immediate medical care. At day three after burn, we confirmed that lesions were homogeneous (figure 3a and 3b first panels) and animals were divided into two groups, one receiving CAP treatment and one treated by the same gas flow but non-ionized and referred as the sham group. The time course of skin wound healing was macroscopically analyzed 5 hours after treatment then 4, 11 and 18 days after CAP treatment (figure 3b) and in the sham group (figure 3a). Results highlighted that wound closure was slightly faster in CAP treated animals, but the main effects were in the size and the appearance of the scar. At the endpoint of the experiment, CAP treated animals had a reduced scar surface with limited skin retraction and the remaining scar is less visible. These observations were sustained by histological measurement revealing a significant reduction of the area and the volume of the scar with no difference in skin thickness (figure 3c). In addition, tissue sections showed a clear recovery of skin tissue structure and organization close to normal control skin with limited sign of fibrosis in the dermis layer compare to sham animals (figure 3d). A panel reconstruction to image the whole skin structure on its total length of 2 cm was performed at the endpoint of the with three enlarged views: (i) part in contact with the CAP streamer, (ii) part in middle of the wound (iii) part distal to CAP treated point (supplementary figure 1). Global analysis of the wound showed that sham treated animal developed a fibrotic scar with a massive collagen deposition with the total loss of the adipocytes of the hypodermis (supplementary figure 1a). On the opposite, CAP treated animals displayed a remarkable skin tissue reconstruction with skin appendage recovery under epidermis and with the presence of adipocytes in the deep layer. Sign of fibrosis were just identified around the point of impact of the CAP stream (supplementary figure 1b).

CAP treatment promotes resolution of inflammation and reduces extracellular matrix formation

In order to identify molecular event supporting histological observations we first compared the level of expression of various tissue components decisive for the skin reconstruction. During wound healing, appropriate transition are required to progress properly from one phase to the following one without disrupting the tightly regulated healing process. Indeed the inflammatory early phase is a prerequisite but need to be resolved to undergo the proliferative healing phase. We showed that CAP treatment was associated with a significant decrease in pro-inflammatory cytokines expression level, i.e. IL-1 β , TNF- α , as soon as 5 hours post CAP treatment to reach uninjured skin level of expression within few days (figure 4), suggesting that CAP exposure may enhance a more rapid extinction of the inflammatory phase. Only the expression level of IL-6 is not significantly decreased and the expression level of the anti-inflammatory cytokine IL-10 remained unchanged. In addition we found that CAP treatment was highly effective in the remodeling phase, by reducing the expression level of various extracellular matrix components involved in fibrosis such as the matrix metalloproteinase and protease inhibitor (MMP9/TIMP1), smooth muscle actin (α SMA) inducting contraction of the wound and collagen I known to provide strength to extracellular matrix (figure 4).

In correlation to factors we looked at cell markers level of expression. We evidenced that the pan-hematopoietic cell marker CD45 was drastically down-regulated from 5 hours after CAP treatment, suggesting that there was decrease in the recruitment or at least the presence of immune cells in the wound, without affecting the macrophage sub-population CD11b as there was no differences between sham and treated tissue (figure 4). This result was sustained by immunofluorescence experiments (figure 5). The presence of the CD45 positive hematopoietic cells decreased from $51.9\% \pm 2.5$ in Sham to $28.8\% \pm 1.9$ in CAP treated animals as soon as 5 hours after treatment. Similarly, CD3 lymphocytes reduced from $43.1\% \pm 1.7$ to $22.9\% \pm 1.6$, as well as the amount of Gr-1 positive myeloid cells (essentially neutrophils and also macrophages and dendritic cells) that decrease from $31.6\% \pm 4.3$ to $14.4\% \pm 0.8$ after treatment (figure 5). When looking at the stromal cell markers CD73 expressed by dermal fibroblast, there was also a reduction 4 days after CAP treatment that may be relative to a less proliferative activity (figure 4). Finally we looked at the endothelial marker CD34 expression that was increased after CAP treatment suggesting that neoangiogenesis may be improved in treated animals (figure 4b).

Taken together these data gave strong insights to propose that CAP treatment can promote inflammation resolution while limiting fibrotic scar formation.

Skin cell sub-populations display differential sensitivity to CAP treatment *in vitro*

In order to verify if modification in some cell marker expression can be explained by a selective effect of CAP treatment depending on the cell type targeted, we isolated tissue cells and plated them in primary culture. As hematopoietic and dermis cells types seemed to be affected, we prepared macrophages and lymphocytes as well as dermal fibroblasts and adipose mesenchymal stromal cells present in the deep layer of the skin. Each cell subset was exposed to CAP and proteasome activity was assessed. Proteasome represents major machinery for eliminating oxidized proteins. Impairment in proteasome activity accounts for alteration of protein and redox homeostasis, compromising in term cell survival. Results showed that the proteasome activity of dermal fibroblasts and ASC was not affected by a CAP exposition in similar condition to animal treatment (1 min, CAP He-1%O₂), whereas macrophages and lymphocytes appeared to be highly sensitive (figure 6). In comparison all cell type except ASC were even more sensitive to a 1 min exposure to He CAP known to generate higher amount of reactive species (figure 2c). Taken together our results brought to the conclusion that the differential sensitivity to CAP observed *in vitro*, depending on the cell type, may occur in the tissue context which could at least partially explain our observations.

Discussion

In this paper, we demonstrated that following deep partial skin burn a single CAP treatment, performed after the initiation of the inflammatory phase of the wound-healing process, allowed a remarkable skin tissue recovery with very limited scar formation. This tissue reconstruction was associated with a powerful resolution of inflammation, due to selective sensitivity of tissue cells to CAP, leading to a reduction of the fibrotic event taking place in the later phase of the wound healing process.

The expression level of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF α were rapidly decreased after CAP treatment, while IL-6 and IL-10 expression were maintained similar to untreated animals. Even though IL-6 is commonly associated with pro-inflammatory events, it is more likely a pleiotropic cytokine that may also elicit anti-inflammatory effects depending on the micro-environment context [Kamimura 2003]. In addition IL-6 has been reported as a myogenic factor produced by fibrocyte/adipose progenitors in response to muscle regeneration [Joe Nat. Cell Biol. 2010] as well as a hepatoprotective cytokine promoting liver regeneration with the support of IL-10 [Gao J. Gastroenterol. Hepatol. 2012]. Our findings suggest that inflammatory cytokines production were reduced shortly after CAP exposure that may result in a strong decrease in neutrophil inflammatory cells recruitment as assessed by

CD45 and Gr-1 labeling within tissue, while cytokines known to participate in tissue reconstruction remained unchanged. In addition to a less efficient mobilization, this decrease of immune cell number in injured tissue may be due to a higher sensitivity to CAP exposure as suggested by our *in vitro* results in comparison to stromal or dermal fibroblasts. From this perspective it has been shown that CAP exposure can selectively ablate cancer cell without damaging normal mesenchymal stromal cells *in vitro* [Keidar Br. J. Cancer 2011] [Wang PLoS ONE 2013]. However cell truly affected *in vivo* and targeted in tumor regression remains to be identified as potential effects on micro-environment cells is not excluded.

The recruitment of inflammatory cells to the wound is necessary for normal healing progress and a successful outcome of the healing response. Among them macrophages exhibit extensive heterogeneity and plasticity, to orchestrate the different stages of the tissue repair processes [Novak J. Leuk. Biol. 2013]. In our burn model CAP treatment was dispensed after the initial inflammatory phase took place, thus targeting the resolution of inflammation phase necessary to switch to tissue reconstruction. CAP treatment was associated to a drastic reduction of the hematopoietic marker CD45 expression and cell number in skin tissue within few hours while macrophage CD11b marker tended to increase. It is described that at day 5 the most prominent cell type present in the wound is M2 type macrophages that suppress inflammatory response and promote a Th2 response, angiogenesis, tissue remodeling and repair [Mahdavian Delavary Immunobiol. 2013]. They induce the release of epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF), which growth factors further promote cell proliferation and induce the recruitment, maturation and proliferation of fibroblasts, fibrocytes and myofibroblasts resulting in the secretion of high levels of collagens and extracellular matrix molecules. In our conditions there was no significant variation of growth factors expression (i.e. KGF, IGF-1, HGF, data not shown) with CAP treatment. However we reported a specific reduced expression of MMP-9, α SMA and collagen type 1 together with a decrease in T-lymphocyte CD3, that could together account for the limited tissue contraction and fibrotic scar formation observed. Athymic mice are unable to raise mature T-lymphocyte which make them immune-deficient even though they still maintain functional NK cell and $\gamma\delta$ -lymphocytes (data not shown) that are important sources of chemokines following burn [Schwacha Burns 2009]. Here our results are in favor of a high sensitivity of lymphocytes to CAP exposure and a decrease of their number at the healing site, even though the precise phenotype of macrophages and CD3 positive cells in the CAP treated skin remains to be characterized in our experimental model.

Finally the outcome of the healing process following CAP exposure is remarkable and close to regeneration when looking at skin structure and appearance. Indeed histology analyses evidenced numerous regenerative follicles and glands present at the wound edge and restitution of the different skin layers. In untreated animals the issue of the process lead to a thick fibrotic derm formation and the loss of hypoderm. Both layers were correctly recovered following CAP exposure in the wound bed and could be compared to the skin regeneration potential reported in the African spiny mice Acomys. Such animals are able to maintain an active dermal cell proliferation and appendage formation that antagonize stratification and differentiation of the epidermis and collagen type I formation, thus allowing appropriate tissue reconstruction in a pro-regenerative environment [Seifert AW. *Nature* 2012]. Proliferation was not assessed in our work but reduction in collagen type I and α SMA expression was observed suggesting that the extra cellular matrix deposition represents a common process in both models to ultimately reduce scar formation.

Conclusion

In conclusion the present study clearly identified new and precise targets affected by CAP treatment to promote tissue regeneration. A deeper analysis of the molecular and cell pathways is now necessary to demonstrate their level of implication and to address how pro-regenerative process occurs in our experimental animal model. Our findings open up to new perspectives in the understanding of CAP effect on living tissue in response to injury that should in close future provide insights into intrinsic restorative pathways in skin for structural and functional restitution.

Finally evolving concepts in cutaneous wound healing may bring significant understanding in fundamental regenerative processes that may occur in higher vertebrates and may also develop into innovative therapies to and propose solutions for abnormal or pathologic wound healing such as prolonged inflammation in non-healing wounds or dysregulation of the wound healing process at either the proliferative or remodeling stages.

Supporting information

Figure S1. Histologic analysis of the skin tissue 18 days after scalding in CAP treated versus untreated animals. Skin tissue samples representing the total length of the wound were stained using Masson trichrome. Tissue sample were collected in animals untreated (Sham) or treated (CAP) at the endpoint of the experiment (18 days). The black arrow represents the impact point of CAP on the skin surface.

Acknowledgements

We thank Pascale Guillou for technical assistance regarding to animal models and tissue sampling.

Author Contributions

Conceived and designed experiments: GP, FC, ALB, and VP. Performed the experiments: GP, ALB, MA, and JPC. Analyzed the experiments: GP, VP, FC, ALB, and LC. Wrote the manuscript: VP, GP, and FC. Provided and develop CAPs device: FC. Develop and perform mouse model: AdB, OA, and GP.

References

1. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT (2008) Wound repair and regeneration. *Nature* 453:314-321.
2. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M (2013) Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling. *J. Pathol.* 229:176-185.
3. Artlett CM (2013) Inflammasomes in wound healing and fibrosis. *J. Pathol.* 229:157-167.
4. Klingberg F, Hinz B, White ES (2013) The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J. Pathol.* 229:298-309.
5. Kogelschatz U, Eliasson B, Egli W, (1997) Dielectric Barrier Discharges. Principles and Applications. *J. Phys IV France*, 7, C4-47/C4-66
6. Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN et al. (2008) Applied Plasma Medicine. *Plasma Processes and Polymers*, 5, 31pp
7. Isbary G, Zimmermann JL, Shimizu T, Li YF, Morfill GE et al. (2013) Non-thermal plasma—more than five years of clinical experience. *Clinical Plasma Medicine* 1:19-23.
8. Dobrynin D, Fridman G, Friedman G, Fridman A (2009) Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J. Phys.* 11:115020.
9. Kalghatgi S, Friedman G, Fridman A, Clyne AM (2010) Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Ann. Biomed. Eng.* 38:748-757.
10. Fridman G, Shereshevsky A, Jost M, Brooks AD, Fridman A et al. (2007) Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines. *Plasma Chem. Plasma Proc.* 27:163-176.

11. Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Friedman A, Friedman G, Azizkhan-Clifford J (2011) Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PLoS One*. 6:e16270.
12. Liebmann J, Scherer J, Bibinov N, Rajasekaran P, Kovacs R, et al. (2011) Biological effects of nitric oxide generated by an atmospheric pressure gas-plasma on human skin cells. *Nitric Oxide*. 24:8-16.
13. Haertel B, Straßenburg S, Oehmigen K, Wende K, von Woedtke T et al. (2013) Differential influence of components resulting from atmospheric-pressure plasma on integrin expression of human HaCaT keratinocytes. *Biomed. Res. Int.* 2013:761451.
14. Wu AS, Kalghatgi S, Dobrynnin D, Sensenig R, Cerchar E et al. (2013) Porcine intact and wounded skin responses to atmospheric nonthermal plasma. *J. Surg. Res.* 179:e1-e12.
15. Duval A, Marinov I, Bousquet G, Gapihan G, Starikovskaia SM (2013) Cell death induced on cell cultures and nude mouse skin by non-thermal, nanosecond-pulsed generated plasma. *PLoS One*. 8:e83001.
16. García-Alcantara E, López-Callejas R, Morales-Ramírez PR, Peña-Eguiluz R, Fajardo-Muñoz R et al. (2013) Accelerated mice skin acute wound healing in vivo by combined treatment of argon and helium plasma needle. *Arch. Med. Res.* 44:169-177.
17. Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J et al. (2013) Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo. *PLoS One*. 8:e79325.
18. Papadopoulos PK, Vafeas P, Svarnas P, Gazeli K, Hatzikonstantinou PM et al. (2014) Interpretation of the gas flow field modification induced by guided streamer ('plasma bullet') propagation. *J. Physics D: Applied Physics* 47:425203.
19. Kamimura D, Ishihara K, Hirano T (2003) IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 149:1-38.
20. Joe AW, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L et al. (2010) Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* 12:153-63.
21. Gao B (2013) Hepatoprotective and anti-inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 27(S2):89-93.
22. Keidar M, Walk R, Shashurin A, Srinivasan P, Sandler A et al. (2011) Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *Br. J. Cancer*. 105:1295-1301.
23. Wang M, Holmes B, Cheng X, Zhu W, Keidar M et al. (2013) Cold atmospheric plasma for selectively ablating metastatic breast cancer cells. *PLoS One*. 8:e73741.

24. Novak ML, Koh TJ (2013) Macrophage phenotypes during tissue repair. *J. Leukoc. Biol.* 93:875-881.
25. Mahdavian Delavary B, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH (2013) Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiol.* 216:753-762.
26. Schwacha MG (2009) Gammadelta T-cells: potential regulators of the post-burn inflammatory response. *Burns* 35:318-326.
27. Seifert AW, Kiama SG, Seifert MG, Goheen JR, Palmer TM et al. (2012) Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). *Nature* 489: 561–565.

Figure legends

Figure 1. Characterization of the mouse skin burn model. (a) Scald burn appearance on dorsal skin of nude mice 48 hours after immersion of 1 cm² area seconds (0.5 x 2 cm) in 70°C hot water for 10 sec to generate the skin burn. (b) After 48 hours skin thickness was measured on tissue sections. (c) Representative normal skin layers in unburned animals and (d) in a 48 hours scald wound after hematoxylin staining of tissue sections.

Figure 2. Plasma procedure and device to treat scald burn. (a) Schema of the animal experimental procedure consisting in generating scald burn (Day 0) and treat the wound 3 days later (Day 3) by CAP exposure in comparison to sham procedure where animals were just submitted to the same gas flow but non-ionized. (b) Experimental set-up and device circuit description. (c) Relative concentrations of the main emissive species in the guided streamer.

Figure 3. Time course of burn skin recovery after a single CAP treatment. Mice were burned by scalding and 3 days later were treated by CAP (b) or not (a) and the skin wound healing process was examined at indicated time after treatment. (c) Skin recovery was estimated by measuring skin thickness, scar area and volume. (d) Masson trichrome stained skin tissue sections from uninjured animal (normal skin) in comparison to burned animals untreated (sham) or treated (CAP) at the endpoint of the experiment (18 days) showing the different skin layers.

Figure 4. Modification of protein and cell marker expressions following CAP treatment in skin tissue. mRNA expression level analysis of various factors such as (a) cytokines, i.e. IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, (b) extra cellular matrix components, i.e. MMP-9, TIMP-1, α SMA, collagen type I, and (c) cell markers, i.e. CD45, CD11b, CD73, CD34 were performed on skin tissue sample in the time course of the healing process in animals submitted (CAP treated) or not (Sham treated) to CAP exposure.

Figure 5. Immune cells identification in skin tissue 5 hours after CAP treatment. Hematopoietic CD45 cells (green), T lymphocytes CD3 (red) and Gr-1 neutrophils (red) were quantified using immunofluorescence in skin tissue section performed 3 days after burn (D3) without or after sham treatment (D3 + 5hrs Sham) or CAP treatment (D3 + 5hrs CAP). The percentage of positive cells among total cell number is calculated from the number of total Dapi stained nuclei (blue).

Figure 6. Differential cell sensitivity to CAP exposure. Selective effect of CAP treatment *in vitro* on dermal fibroblasts, adipose stromal cells macrophages and lymphocytes maintained in primary culture was assessed by proteasome activity on cytosolic extract;

Table

Table 1. Primers for RT-qPCR

	Forward primer	Reverse primer
Rplp0	AGTCGGAGGAATCAGATG AGGAT	GGCTGACTTGGTTGCTTG G
IL1 β	TGCCACCTTTGACAGTGA TG	TTGGAAGCAGCCCTTCATC TT
TNF α	GCAGTCTGTGCTGCTGGC AT	CGCAGAACGGGATGAAGC
IL6	ACACATGTTCTCTGGGAAA TCGT	CAAGTCCATCATCGTTGTT CATAC
IL10		AOD ref. Mm 00439616-m1 Applied Biosystems
MMP9	GCTGACTACGATAAGGAC GGCA	TAGTGGTGCAGGCAGAGT AGGA
TIMP1	TCTTGGTTCCCTGGCGTAC TCT	GTGAGTGTCACTCTCCAGT TTGC
α SMA	TGCTGACAGAGGCACCAC TGAA	CAGTTGTACGTCCAGAGGC ATAG
COL1a1	GGACCCATTGGACCTGAA CC	CCCAATCGTGAGACGTGG AA
CD45	CTTCAGTGGTCCCATTGTG GT	TCAGACACGTCTGTCGCCT TA
CD11b	TACTTCGGGCAGTCTCTGA GTG	ATGGTTGCCTCCAGTCTCA GCA
CD73	CATCGCTATGCCAGTCCA C	CTCTGTTCCAGGGCTTCG G
CD34	GGAGTTCTGCTGCCATCT T	ATAAGGGTCTTCACCCAGC C

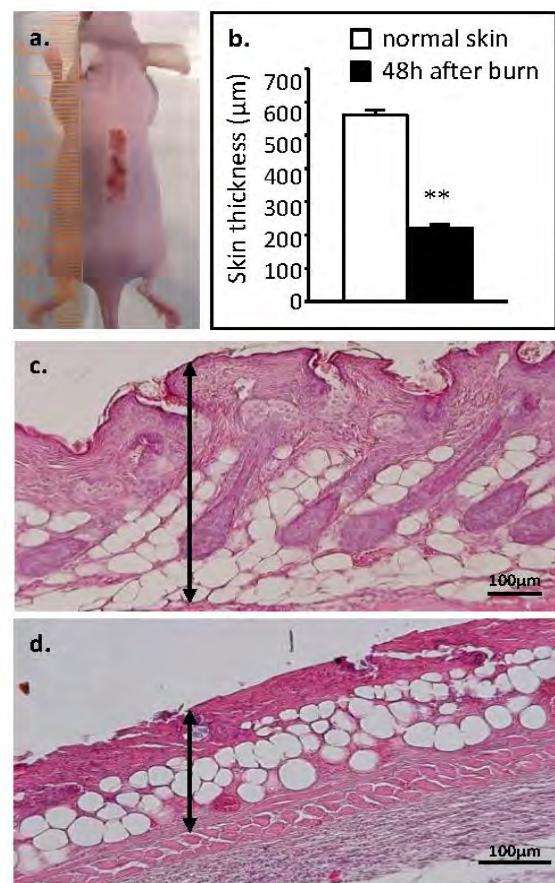


Figure 1

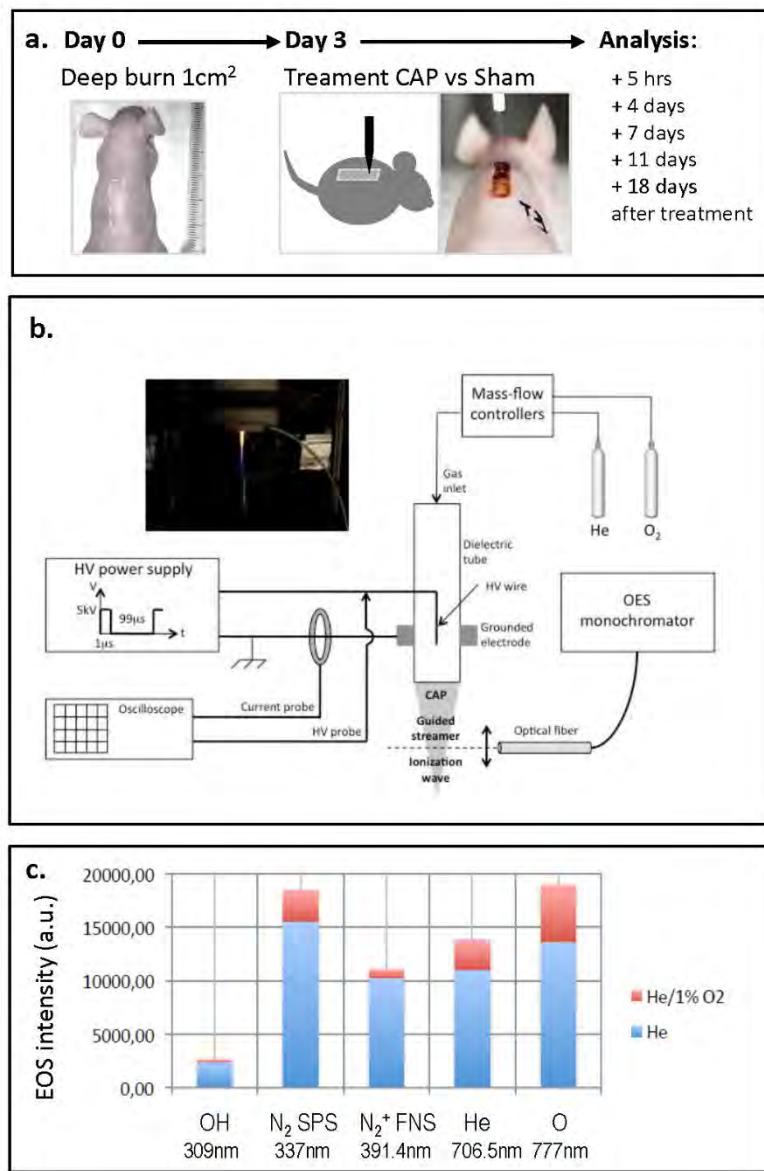


Figure 2

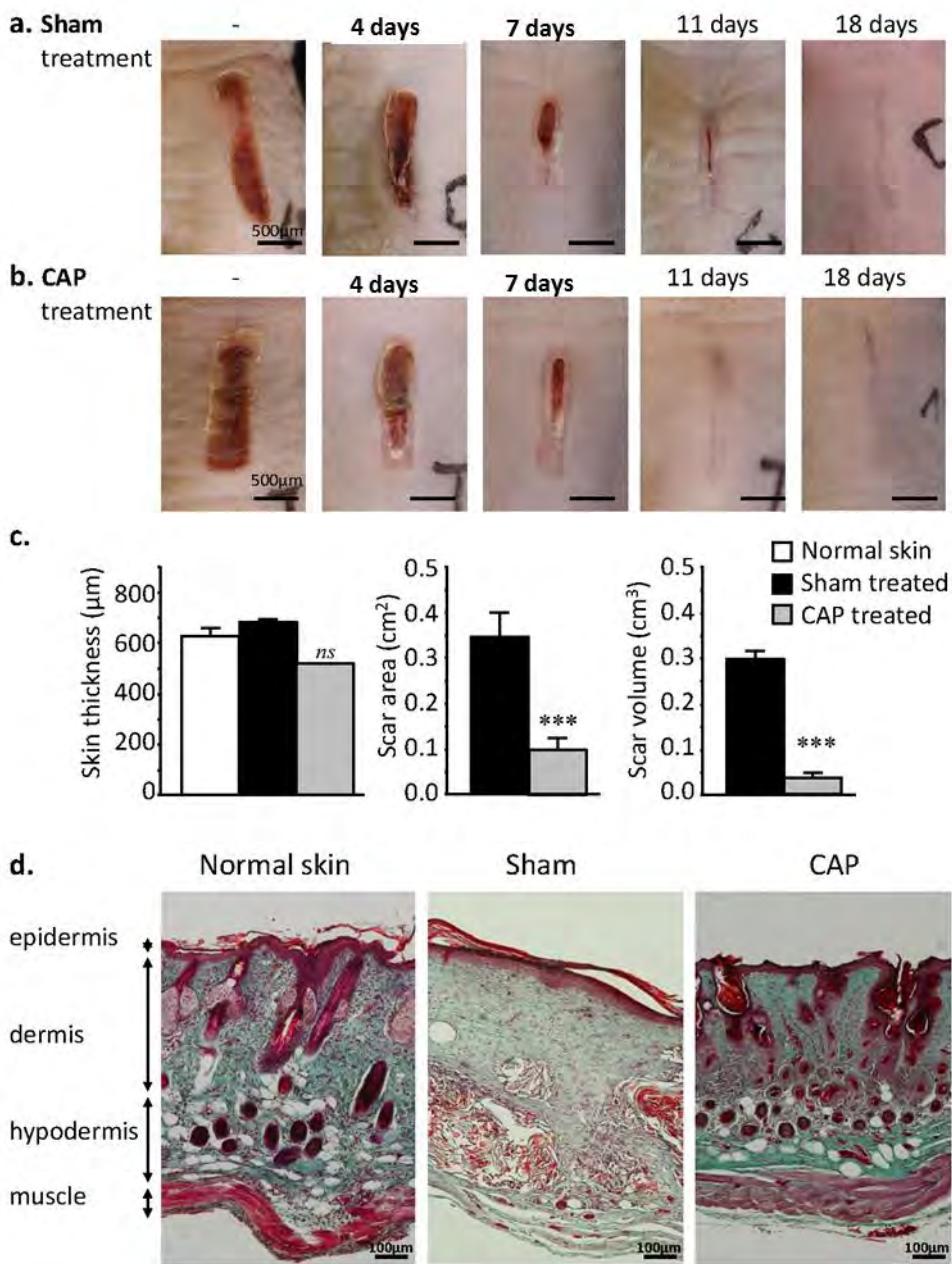


Figure 3

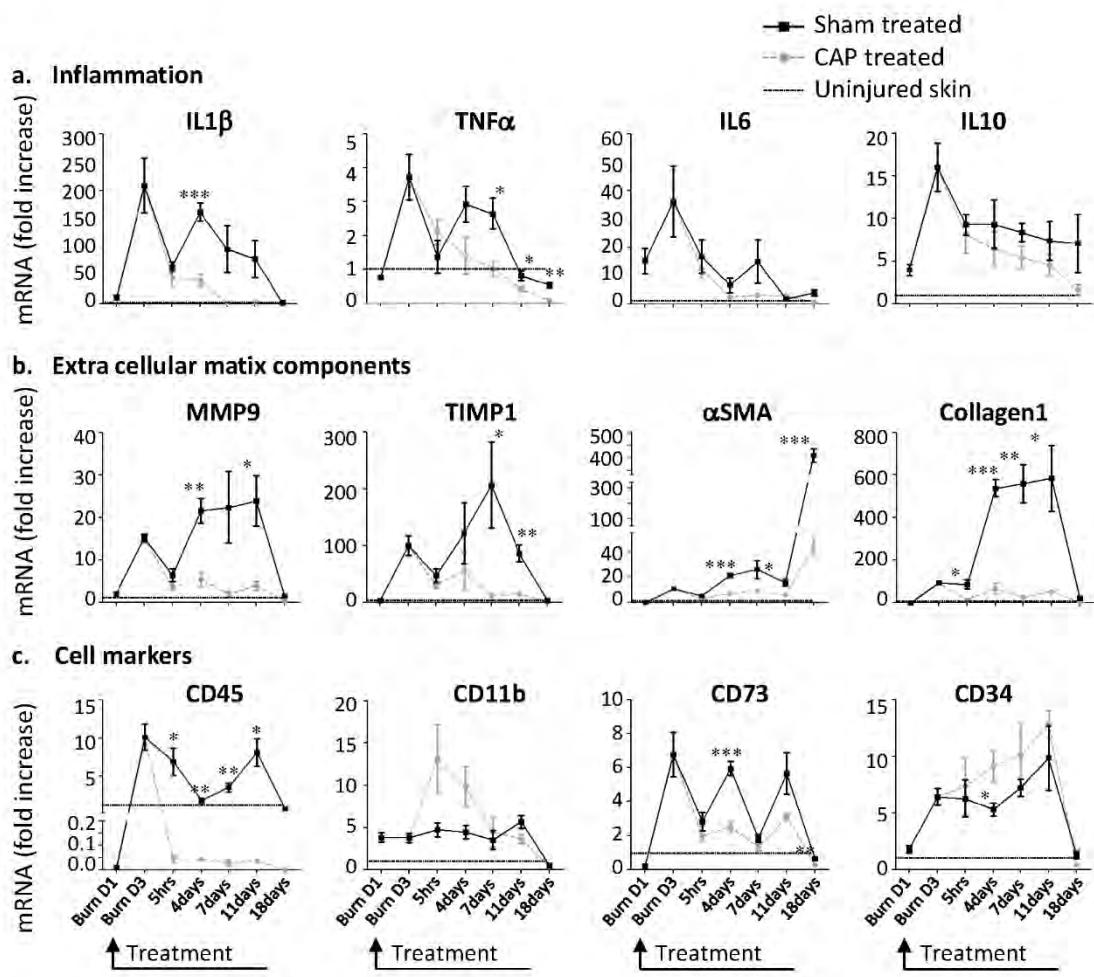


Figure 4

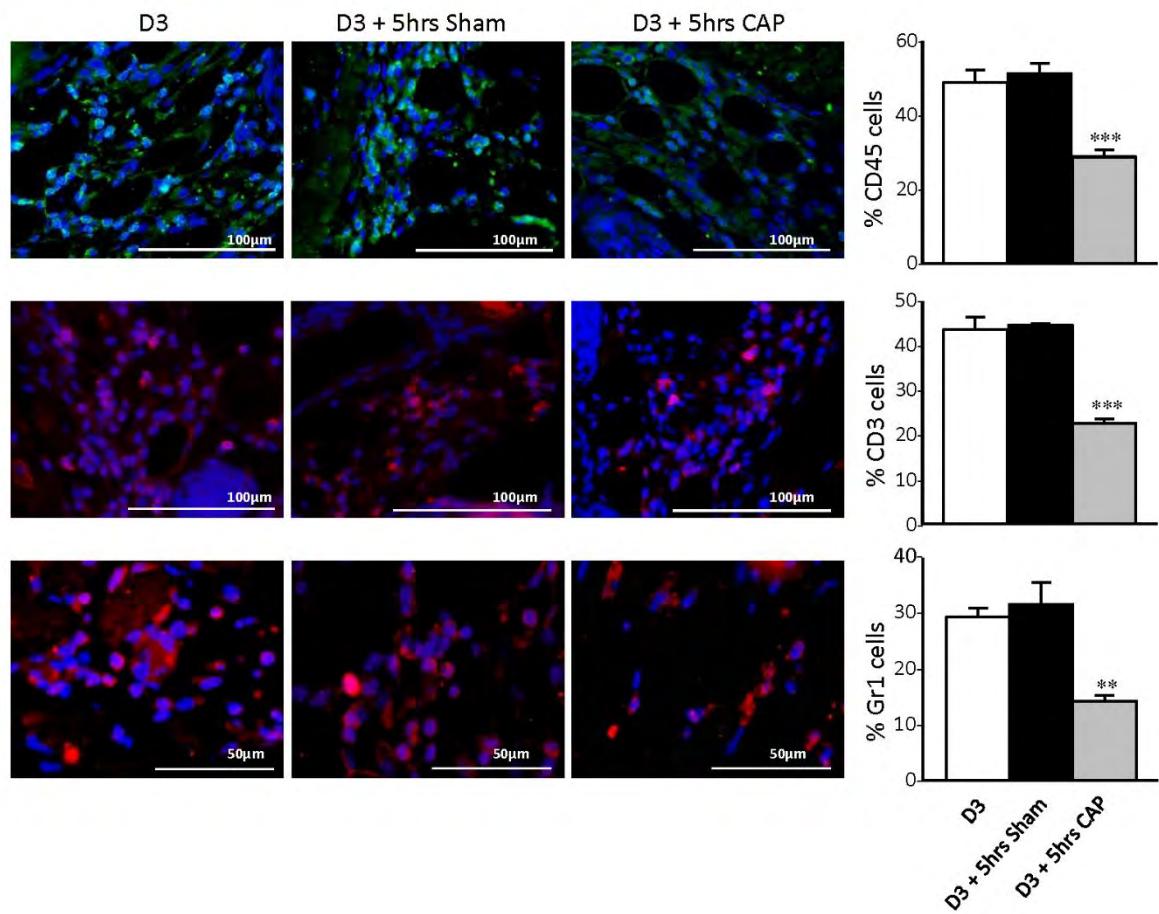


Figure 5

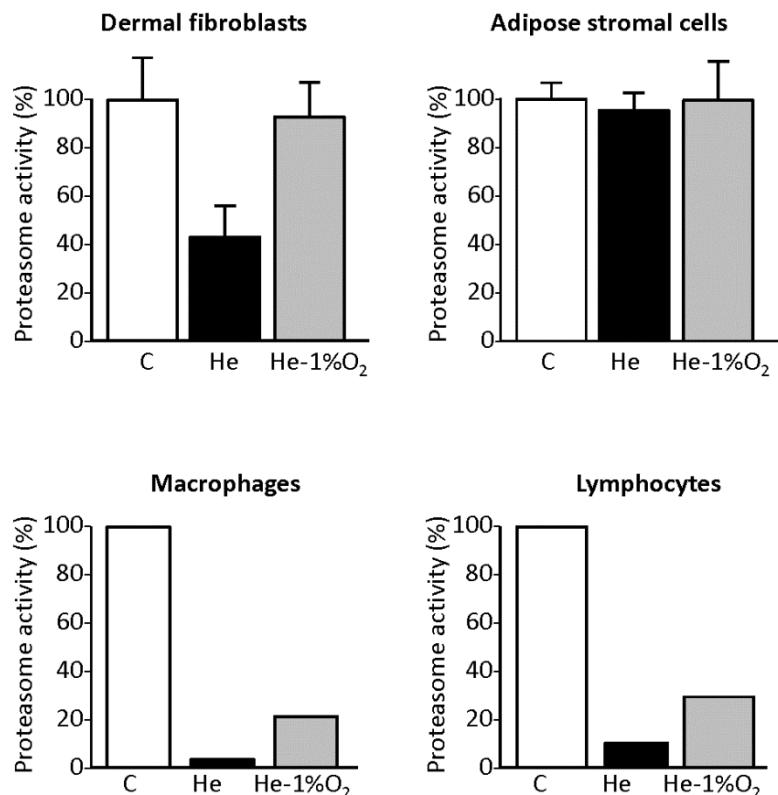
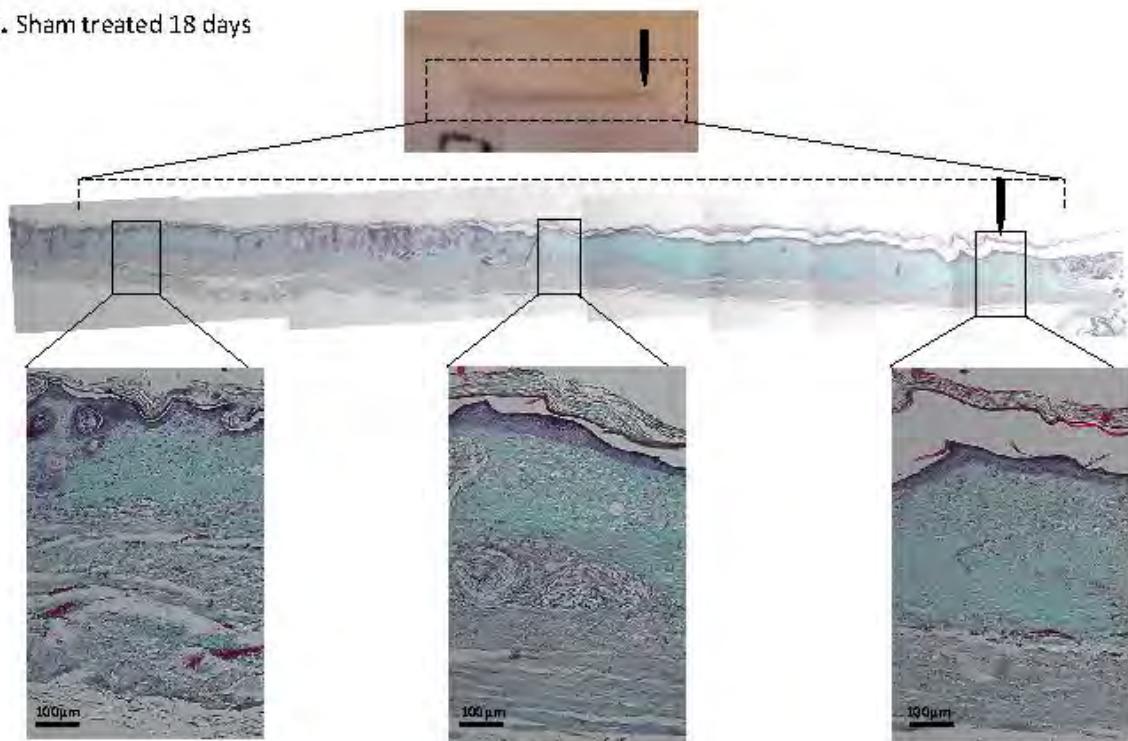
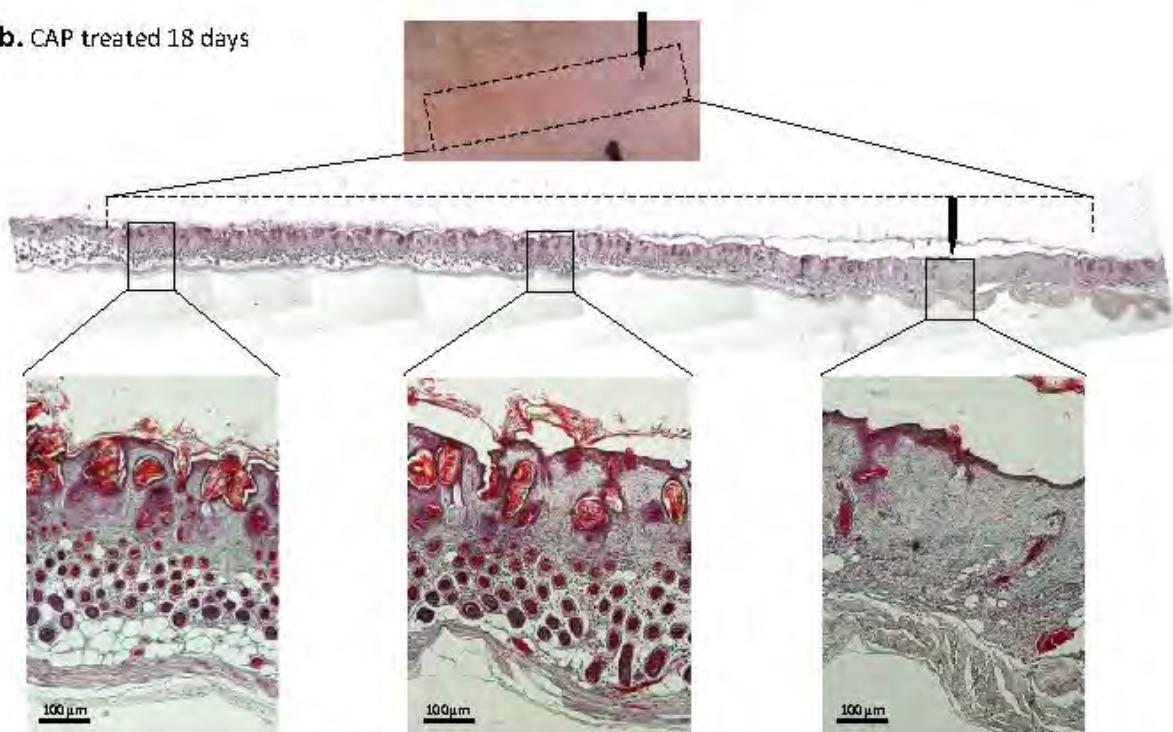


Figure 6

a. Sham treated 18 days



b. CAP treated 18 days



Supplementary Figure 1

B- Le plasma froid atmosphérique et ses effets sur la cicatrisation des brûlures profondes

La difficulté première était d'obtenir à coup sur de l'apoptose tout en évitant la mort nécrotique. En effet, la nécrose est une mort accidentelle⁴⁴, saisie par l'organisme comme une agression entraînant en conséquence une inflammation.

La deuxième difficulté était de retrouver une apoptose au lieu de la blessure et uniquement, à cet endroit-ci.

Pour résoudre le caractère local, deux possibilités pouvaient être retenues soit l'injection locale de cellules apoptotiques, soit l'induction de l'apoptose au lieu précis de la blessure ; tout en gardant à l'esprit que les événements se devaient d'être conséquents quantitativement.

1- Obtention de l'apoptose par une technique commune en laboratoire de biologie

Notre première idée pour parvenir améliorer la cicatrisation des brûlures était d'injecter des cellules apoptotiques aux abords de la brûlure chez la souris *Nude* et ce, circonstance impérieuse, après l'initiation de l'inflammation. La mise en place d'une inflammation « physiologique » était, pour notre part et d'après sa signification, le pré-requis pour initier la régénération ou du moins, parvenir à retrouver une cicatrisation adéquate.

Le type cellulaire choisi fut les cellules souches/stromales mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux. Elles furent choisies pour diverses raisons : en premier lieu, pour leur accessibilité et la facilité avec laquelle il est possible d'en disposer en grand nombre ; en outre, les cellules souches/stromales mésenchymateuses partagent beaucoup de similarités avec les fibroblastes, cellules stromales indispensables dans les processus de cicatrisation et l'homéostasie du derme.

Nous avons orienté notre attention sur une entité chimique, la *staurosporine*, régulièrement utilisée en laboratoire pour obtenir des événements de mort cellulaire programmée ; toutefois, en gardant à l'esprit que l'administration d'un tel produit directement dans l'animal était bannie, puisque toxique pour les tissus et l'animal.

⁴⁴ Il existe une nécrose induite dénommée la *nécroptose* [231]. L'accident n'est donc plus un élément de définition de la nécrose.

a- Matériel et méthodes

Après récupération de leur tissu d'origine et culture en boîte 6 puits (TPP®), des cellules souches/mésenchymateuses issues du tissu adipeux ont été traitées avec de la *staurosporine*⁴⁵ (Sigma-Aldrich®). Le traitement consistait à cultiver un million de cellules dans un milieu αMEM (Gibco®) dont la teneur en *staurosporine* était équivalente à 10 ng/ml et ce, durant 6 heures.

Après 6 heures, le milieu et les cellules adhérentes ont été prises en charge selon les recommandations du fournisseur à l'aide d'un kit *FITC Annexin V Detection Apoptosis* (BD Pharmingen™). Les cellules ainsi marquées ont été analysées par la suite en cytométrie en flux (FACSCantoII, Becton Dickinson). L'acquisition des données et les analyses ont été réalisées sur le logiciel *BDFACSDiva* (Becton Dickinson).

b- Résultats

Les résultats se sont montrés très décevants en ceci que bien que nous retrouvions une proportion assez conséquente d'apoptose (autour de 45 % en moyenne), nous observions aussi une quantité non négligeable de nécrose soit environ 25 % (Figure 64, page suivante). Les 30 % des cellules restantes présentèrent en cytométrie un phénotype de cellules viables.

La nécrose étant formellement proscrite, nous ne pouvions utiliser cette technique pour l'injection de corps apoptotiques. La part particulièrement conséquente de nécrose observée nous a conduit, au lieu d'affiner le protocole basée sur la *staurosporine*, à envisager une autre méthode pour l'obtention de cellules apoptotiques.

Nous avons envisagé, au lieu de rechercher une autre molécule chimique, d'utiliser un procédé physique pour produire des corps apoptotiques.

En outre et en vue d'une utilisation directe sur l'animal, un tel procédé pouvait être à la fois extrêmement précis, de durée maîtrisable et pouvait engendrer une forte réactivité sur le vivant. Bien que la réactivité d'une entité chimique peut être comparable, une injection impliquait l'utilisation d'une solution qui pouvait se répandre hors des limites de la lésion ; cas de figure qui devait être absolument évité avec un produit inducteur de l'apoptose car, par définition toxique.

⁴⁵ La *staurosporine* est un alcaloïde provenant de bactéries GRAM+. Elle est inhibitrice des protéines kinases et ces propriétés apoptotiques découlent vraisemblablement d'une activation des caspases (Chae HJ, pharm. Res, 2000).

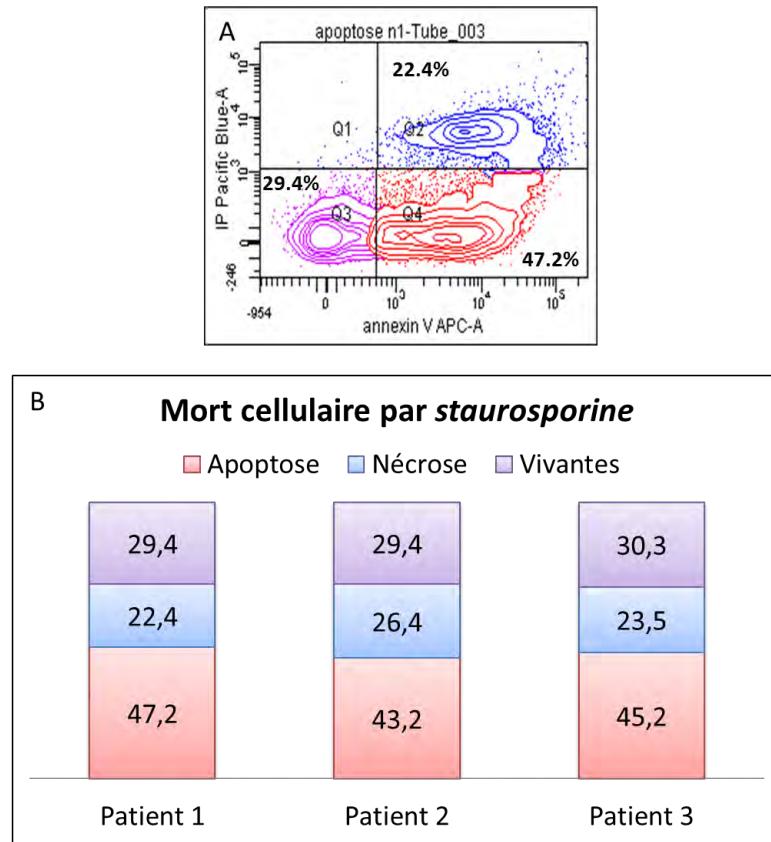


Figure 64 : Induction de morts cellulaires chez les ASC avec la *staurosporine*.

A. Dot plot avec les cellules souches/stromales mésenchymateuses du patient n°1. **B.** Part des morts cellulaires de cellules souches/stromales mésenchymateuses chez trois patients.

2- Le plasma froid atmosphérique, ses effets sur les cellules souches/stromales mésenchymateuses et la cicatrisation de brûlures profondes

Le plasma, 4^{ème} état de la matière, paraît être un candidat singulièrement approprié comme traitement des cicatrisations cutanées, qu'elles soient saine ou anormales. D'une part, il possède des propriétés désinfectantes qui seraient d'un aide certaine pour les plaies. D'un autre, il a été montré que son application prolongée sur des cellules mammifères entraînait leur apoptose [232].

La formation en pression atmosphérique est particulièrement intéressante en ceci que les animaux ou les cellules pourront être traités sans l'utilisation d'enceintes à atmosphère contrôlée. La nature froide est indispensable car il y a de grandes possibilités pour que son utilisation ne surajoute pas de lésions.

Au de ces dernières précisions, le plasma froid atmosphérique a donc retenu toute notre attention dans la recherche de l'outil qui pouvait permettre d'induire de l'apoptose de manière régulée dans le temps et l'espace.

Il semble donc être l'outil idéal pour la manipulation que nous voulions mettre en œuvre pour améliorer la cicatrisation des mammifères.

a- Effet du plasma froid atmosphérique (*streamer guidé*) sur les cellules souches/stromales mésenchymateuses du tissu adipeux

Avant toute application sur l'animal, nous avons voulu vérifier les effets du plasma froid que nous avions à disposition sur cellules stromales mésenchymateuses et plus précisément, nous voulions savoir si le plasma froid induisait bien préférentiellement de l'apoptose.

Pour cette partie expérimentale *in vitro*, la diligence du Dr. Philippe Kémoun, maître de conférences en Odontologie à la faculté de Toulouse, a été d'une aide inestimable.

Le dispositif plasma présente plusieurs paramètres modulables par l'expérimentateur ; de ces réglages, il eut fallu déterminer les paramètres pour lesquels le plasma serait le plus apte à produire une mort cellulaire programmée des cellules mammifères tout en évitant des phénomènes de nécrose.

- **Matériel et méthodes**

Cellules stromales mésenchymateuses du tissu adipeux humain

Cf. Matériel et méthodes de la première étude expérimentale [Partie III, chapitre I].

Induction de l'apoptose par plasma froid atmosphérique

Le dispositif plasma utilisé pour les expériences est décrit dans le matériel et méthodes [cf. Partie III, Chapitre II, sous-chapitre A].

Les cellules obtenues ont été cultivées jusqu'à 50 % de confluence dans un milieu αMEM supplémentée en antibiotiques et en concentrés plaquettaires à hauteur de 10 %.

24h avant l'application du plasma, le milieu des cellules a été changée par du milieu αMEM supplémenté en antibiotiques et en concentrés plaquettaires à hauteur de 0,5%.

Lors de l'application du plasma sur les cellules, le milieu a été retiré puis réintroduit après application.

- **Résultats**

Pour cette manipulation, il était question de rechercher les paramètres du dispositif délivrant le plasma pour lesquels les événements apoptotiques seraient quasi-exclusifs.

Pour ce faire, nous avons conduit plusieurs manipulations tout en modulant ou modifiant les paramètres de dispositif plasma ; à savoir, les paramètres que nous nommerons « physiques » et les paramètres dits « biologiques ».

D'abord en ce qui concerne les paramètres « physiques » de l'appareillage délivrant le plasma ; chaque paramètre pouvait produire un plasma, que nous pourrions qualifier de différent. Les paramètres modifiables étaient :

- La tension appliquée au gaz porteur ;
- la nature du gaz ou des gaz porteurs du plasma.

Ensuite, en ce qui concerne des paramètres plus conventionnels en biologie, ils étaient répertoriés selon deux ordres :

- Le temps d'exposition du plasma sur les cellules ;
- la distance des cellules de la source du plasma.

Après plusieurs essais sur les cellules parodontales puis sur les cellules mésenchymateuses du tissu adipeux, nous avons convenu que le plasma devait être porté par un mélange gazeux composé à 99 % d'hélium + 1% d'oxygène, que la tension appliquée pour produire le plasma devrait être de 5 kV, que le temps d'exposition optimale serait de 60 secondes et enfin, que les cellules devaient se trouver à 2 centimètres de la source.

A ces conditions précises, lorsque nous traitions des cellules mésenchymateuses du tissu adipeux, 65 % à 75 % d'entre elles entraient en apoptose, seules 2 à 3 % connaissaient des évènements de nécrose et enfin, les cellules restantes étaient viables (Figure 65).

En conséquence, les paramètres établis par les présentes manipulations furent conservés en vue d'une application sur l'animal vivant.

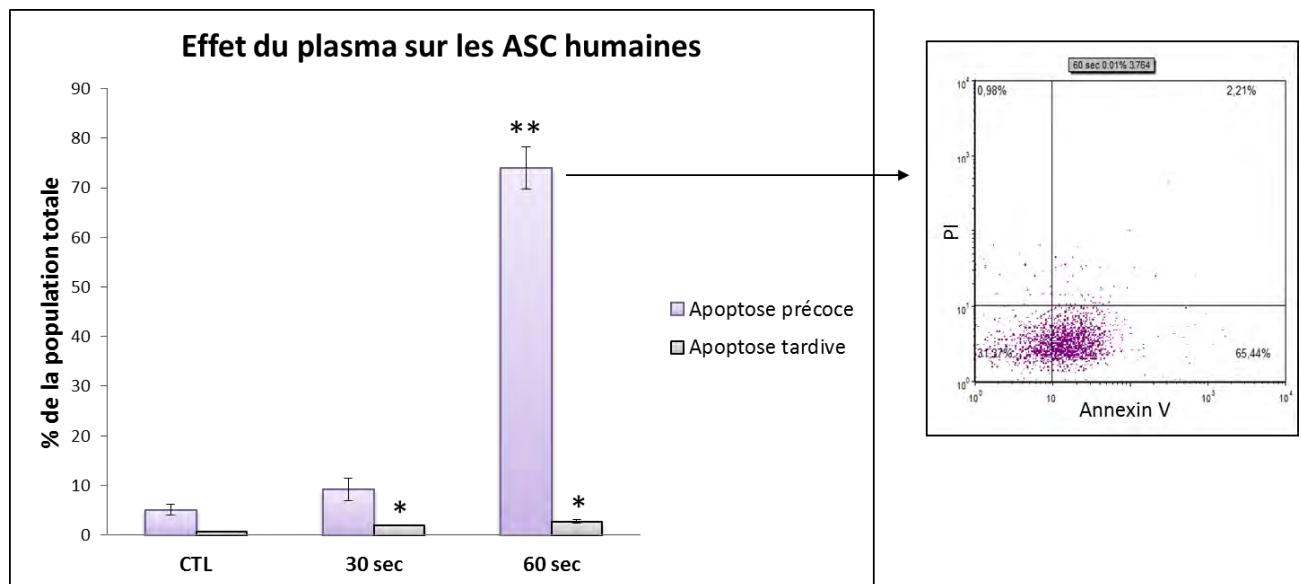


Figure 65 : Le plasma froid induit principalement l'apoptose des cellules mésenchymateuses

Ces résultats ont été obtenus par l'utilisation d'un plasma porté par le mélange gazeux He 99 %/ O₂ 1% et des cellules placées à 2 centimètres de la source. A 6 heures après induction de la mort cellulaire, une apoptose précoce i.e. cellules AnnexinV+ / PI- indique une apoptose certaine ; une apoptose tardive i.e. cellules Annexin V+ / PI+ désigne une nécrose. N = 3.

b- Stratégie de médecine « régénérative » basée sur l'utilisation d'un plasma froid atmosphérique dans une modèle murin de brûlure profonde

Dans les paragraphes à venir, nous traiterons des résultats non présentés dans l'article précédent ; toutefois, quelques compléments d'informations vous seront délivrés tout au long de ces dernières pages.

Le matériel et méthodes ne sera pas repris et est consultable dans l'article.

- Le plasma froid atmosphérique propose une « régénération apparente » des brûlures du second degré profond**

Avec les manipulations précédentes, nous avions mis en place le protocole plasma que nous allons appliquer sur l'animal ; à savoir, un plasma porté par l'hélium et l'oxygène, produit par des tensions de 5 kV et un substrat à traiter placé à 2 cm de la source qui délivre le plasma.

Les souris *Nude* ont été lésées par ébouillantement. Nous avons laissé 72 heures avant de procéder à tout traitement afin que l'inflammation consécutive à la blessure ait le temps de s'initier mais également, de commencer à produire ses effets sur l'environnement lésionnel. Enfin, nous avons traité directement les brûlures avec le plasma atmosphérique froid (Protocole éthique n°CEEA-122 2014-42).

Plusieurs précisions doivent être émises :

- L'application du plasma pendant l'inflammation a été testée également à 24 heures et 48 heures après la blessure ;
- L'application du plasma a été procédée soit sur un point de la blessure, soit sur trois points qui balayaient l'ensemble de la surface lésionnelle.

Les résultats ont montré qu'à l'inverse des traitements à 24 heures ou à 48 heures, les traitements à 72 heures amélioraient considérablement la cicatrisation (Figure 66B). En effet, les brûlures traitées avec le plasma à 72h ne présentaient qu'une partielle cicatrice voire qu'une décoloration cutanée à 21 jours après la brûlure soit à 18 jours après le traitement. La seconde remarque est que le traitement en un point sur la partie supérieure de la brûlure semblait plus efficace que les traitements balayant l'ensemble de la zone meurtrie (Figure 66C). La souris traitée sur l'ensemble de la brûlure bien qu'elle présenta une cicatrisation remarquable laissait apparaître toujours une cicatrice tangible (Figure 66C).

Le traitement pour poursuivre les expériences a été par conséquent :

- Un plasma froid atmosphérique porté par un mélange gazeux de 99 % d'He et 1 % d'O₂ ;
- une exposition de 60 secondes à une distance de 2 cm de la source du plasma ;
- une application à 72 heures après la brûlure ;
- une application locale en un point au niveau de la partie supérieure de la lésion.

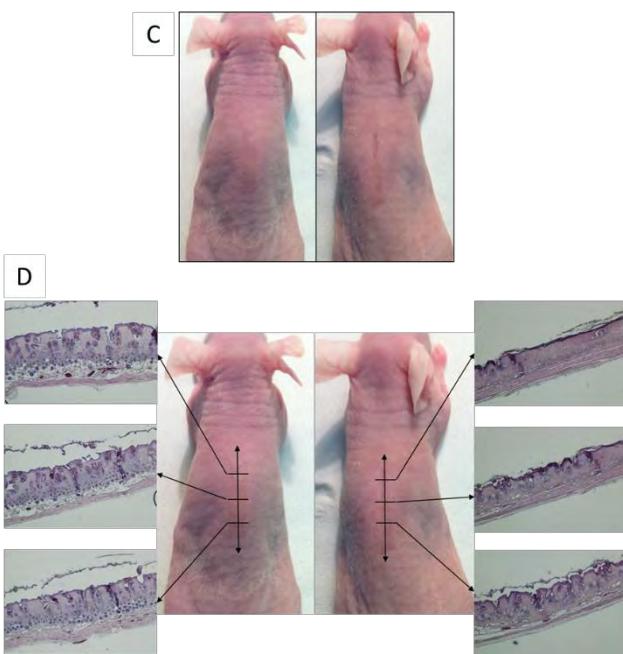
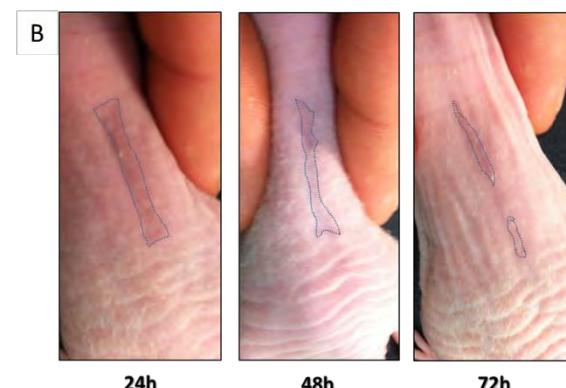
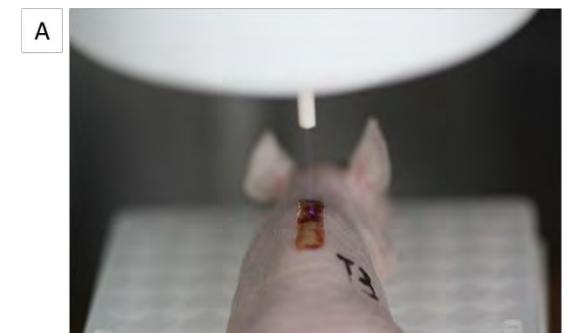


Figure 66 : Mise en place du protocole définitif du traitement des brûlures par plasma froid

A. La souris brûlée est traitée par jet de plasma à 2 cm de la source. **B.** Cicatrice retrouvée à 21 jours après brûlure avec un traitement plasma soit 24 h, soit 48 h ou soit 72 h après brûlure. **C.** Souris traitées par plasma 72 heures après brûlures. Les cicatrices montrées sont à 21 jours après brûlures. La souris de gauche a été traitée en un point supérieur sur la surface lésionnelle ; la souris de droite a été traitée en trois points, un supérieur, un médian et un inférieur sur la surface lésionnelle. Voir figure 66 supplémentaire en fin de chapitre.

En tout, neuf animaux repartis en trois groupes ont été traités par le plasma et huit animaux repartis également en trois groupes ont servi de contrôle. Les animaux contrôles étaient des animaux brûlés dont la blessure a reçu pour tout traitement l'application du gaz porteur du plasma mais sans l'application des tensions électriques génératrices ; autrement dit, le traitement contrôle pouvait être assimilé à un souffle gazeux sur la brûlure. Les groupes d'animaux figuraient de commandes disparates afin que les effets observés ne soient pas fonction de la portée murine traitée.

Sur les neuf animaux traités au plasma froid, six animaux soit 66,7 % présentaient à 21 jours de la blessure (soit à 18 jours du traitement), une « régénération apparente » en ce sens que la cicatrice n'était imaginable qu'à travers une décoloration de la peau. Toutefois, nous pouvons mesurer nos propos par le fait qu'une légère cicatrice était presque systématiquement retrouvée au point d'impact du plasma (Figure 67A et 67B ; Figure 3 article). Les trois autres animaux présentaient quant à eux une cicatrice d'aspect assez remarquable puisqu'elle consistait macroscopiquement en une ligne de cicatrice non hypertrophique (Figure 67B). A l'inverse, tous les animaux contrôles laissaient apparaître à 21 jours une cicatrice plus ou moins marquée selon l'animal (Figure 67B).

De surcroît, à l'inverse des contrôles, peu d'évènements de contraction des berges de la blessure au jour 10 (jour 7 après traitement) et au jour 14 (jour 11 après traitement) ont été aperçus chez les animaux traités par le plasma froid.

Enfin, une expérience de cicatrisation a été menée jusqu'à 9 semaines après cicatrisation. Tandis que les animaux contrôles présentaient une cicatrice, fut-ce d'excellente qualité, les animaux traités présentaient une peau reconstituée qui ne laissaient entrevoir qu'une légère décoloration (Figure 67C).

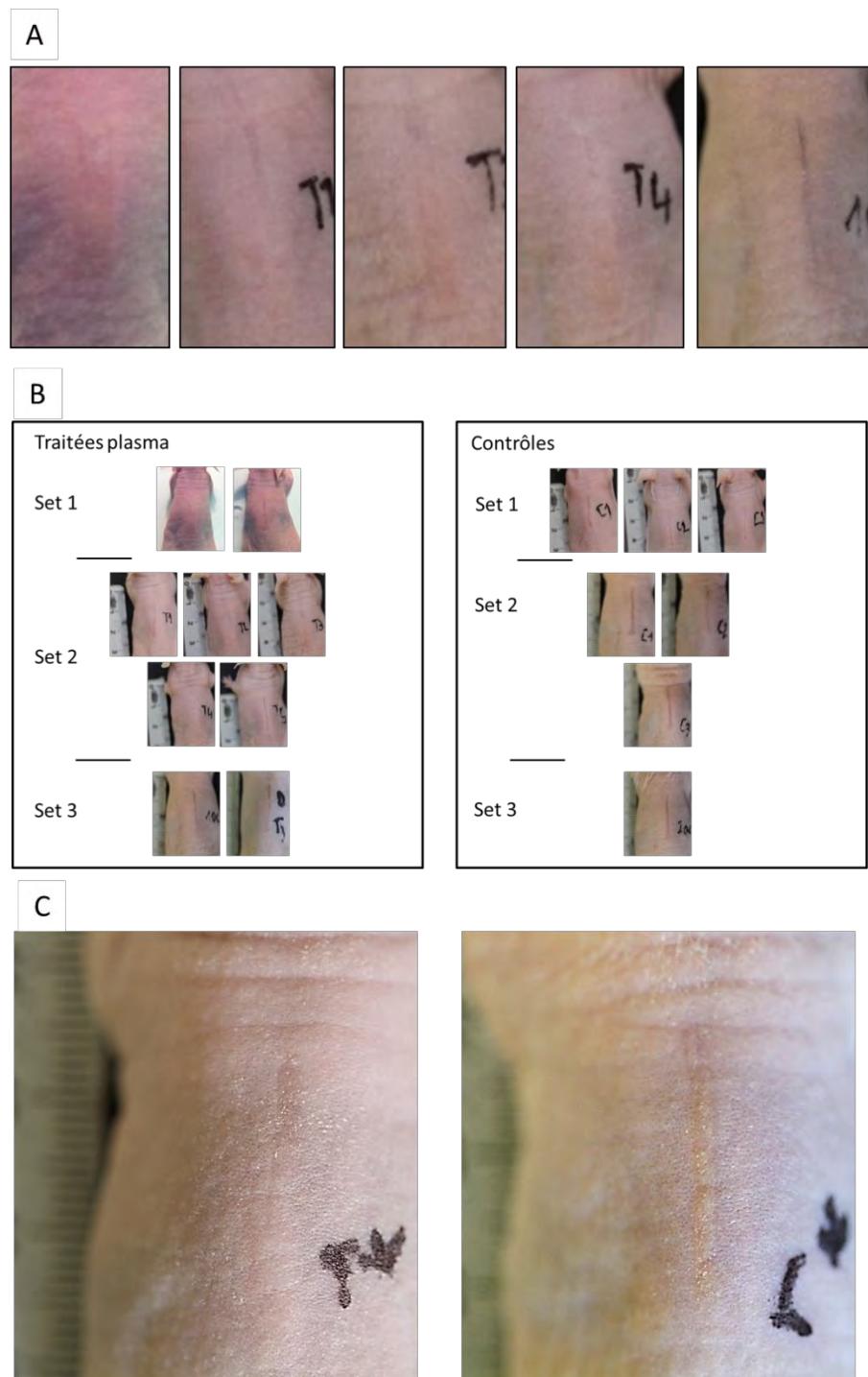


Figure 67 : Les souris traitées par plasma présentent une excellente cicatrisation voire une régénération apparente

A. Cicatrisations remarquables sur les 3 groupes d'animaux traités (jour 21 après brûlure). B. Ensemble des animaux traités et contrôles sacrifiés à 21 jours après brûlure ou 18 jours après traitement. C. Aspect des réparations cutanées après 9 semaines ; souris traitée plasma à gauche, souris contrôle à droite. Voir figure 67 supplémentaire en fin de chapitre.

Après 21 jours ou 18 jours si le référentiel était le traitement par plasma froid, la plupart des animaux ont été sacrifiés, les peaux ont été incluses en paraffine et enfin, colorées par un trichrome de Masson.

L'étude histologique révéla que les souris traitées recouvaient toutes les couches cutanées et en particulier, l'hypoderme. Bien qu'altérées, les structures du derme et de l'épiderme semblaient très proches des structures observées sur une peau saine (Figure 68 ; Figure 3 article). *A contrario*, les souris contrôles ne recouvaient point d'hypoderme et présentaient une fibrose au sein de leur derme (Figure 3 article).

Les reconstitutions de l'ensemble de la cicatrice montrèrent que les peaux traitées plasma possédaient cependant une fibrose au niveau du point d'impact du plasma (Figure supplémentaire 1 article). Cependant, nous pouvions discerner qu'elle restait très *cellularisée* et que des adipocytes avaient fait leur apparition à l'emplacement de l'hypoderme originel. La *cellularisation* de cette trace cicatricielle pourrait indiquer la tenue d'un processus dynamique non terminé.

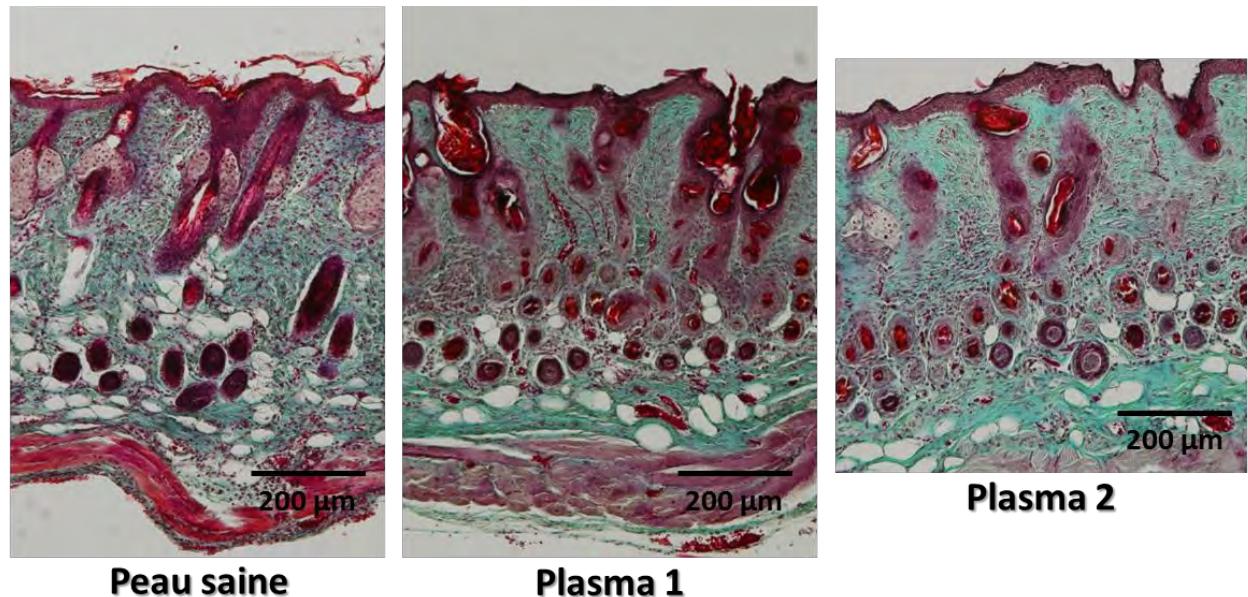


Figure 68: Les peaux traitées plasma recouvrent l'hypoderme et possèdent une architecture similaire à la peau saine.

Plasma 1 : une souris ; Plasma 2 : une autre souris.

De toute évidence, que ce soit aux travers des photographies macroscopiques ou des coupes histologiques, nous remarquions que le traitement par jet de plasma froid à 72 heures après la brûlure amélioraient très efficacement la cicatrisation, si ce n'était dans certains cas,

concouraient à un linéament de régénération. En effet, la structure du derme retrouvé était très proche de la structure du derme d'une peau saine. En outre, de nombreux follicules de régénération pouvaient être relevés ; ce phénomène dynamique a été retrouvé chez un muridé d'Afrique, *Acomys* qui a la particularité de régénérer sa peau [233]. Cependant, les annexes cutanées n'étaient pas observées ; néanmoins, la coloration histologique laissa transparaître un processus inachevé. En conséquence, des coupes histologiques devraient être entreprises à des temps plus tardifs afin de pouvoir conclure sur l'absence des annexes.

Le plus surprenant resta le recouvrement de l'hypoderme en ceci que cette couche cutanée était irrémédiablement perdue lors d'une cicatrisation d'une blessure profonde.

- **L'amélioration cicatricielle consécutive au traitement par plasma semble être le résultat de l'extinction de l'inflammation post-lésionnelle et de l'absence d'une réaction cicatricielle.**

Cette partie est détaillée dans l'article mais nous pouvons émettre quelques mots à son propos. Lorsque nous regardons le contenu en ARN des tissus prélevés au niveau de la blessure, nous remarquons que les niveaux des ARN de facteurs inflammatoires sont fortement diminués après le traitement (Figure 4a article). Ceci peut être corrélé à la diminution conséquente de l'expression de marqueurs de cellules hématopoïétiques et donc, immunitaires (Figure 4c article). En outre, les expériences réalisées *in situ* confirment les résultats de RT-qPCR, à savoir une diminution du nombre des cellules CD45 positives après 5 heures traitement et en particulier, des cellules Gr1 positives et des lymphocytes (Figure 5 article). Dans les heures qui suivent son application, le plasma semble atténuer voire stopper l'inflammation par un effet délétère, bien que ce phénomène mérite d'être clarifié expressément, sur les cellules de l'immunité.

De surcroît, le niveau des ARN de facteurs impliqués dans la constitution de la chape fibreuse n'augmente peu ou pas après application du plasma. Ces observations peuvent être corrélées avec le peu ou l'absence de cicatrice retrouvée par les photographies macroscopiques ou les coupes histologiques.

Plusieurs questions se posent à ce niveau de l'expérience :

- Est-ce l'action anti-inflammatoire du plasma qui concourt à l'atténuation du processus fibrotique de la cicatrisation ?
- Est-ce l'action délétère du plasma sur les cellules de l'immunité qui empêche la réaction fibrotique d'avoir lieu ?

Le plus probable est que la combinaison d'une action anti-inflammatoire et de la disparition des cellules immunitaires soit à l'origine de l'atténuation de la réaction fibrotique subséquente. En l'état, une réponse préemptoire à ces questions reste inenvisageable.

- **L'expression de Nanog, facteur de *pluripotence*, est augmentée dans les tissus ayant traité par le plasma froid**

Nanog est un facteur de transcription important dans le maintien de la *pluripotence* des cellules souches embryonnaires [234]. Des expériences de fusion cellulaires ont montré que ce facteur de transcription a le potentiel de conférer une qualité de *pluripotence* à des cellules somatiques ; toutefois la présence des facteurs Oct 4 et Sox 2 est requise pour affirmer le caractère pluripotent des cellules [235]. De manière surprenante, lorsque nous interrogeons les niveaux d'ARN messager de Nanog après le traitement par jet de plasma, nous retrouvons une quantité considérablement augmentée au niveau des tissus lésés et ce, dès les premières heures après traitement (Figure 69). En outre, ces niveaux élevés restent relativement stable dans le temps. Avant d'émettre une conclusion hâtive, la recherche de la protéine reste requise.

De surcroît, il est indispensable de corrélérer l'expression de Nanog avec l'expression génique et l'apparition protéique d'autres facteurs de transcription impliqués dans la *pluripotence* tels que, Oct4 et Sox2.

Dans tous les cas, l'apparition inattendue de Nanog laisse envisager un autre effet du plasma. En effet, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, le plasma semble avoir des effets délétères sur les cellules immunitaires et non, sur les cellules constitutives du tissu conjonctif (Figure 5 et 6 article). Il serait indispensable de caractériser les effets du plasma sur les cellules stromales au premier rang desquelles les fibroblastes, d'éviter ou de confirmer l'apparition des facteurs de *pluripotence* et donc, de caractériser, si possible, des événements de dédifférenciation. Si une dédifférenciation est observable, alors la recherche de mécanismes régénératifs serait envisageable.

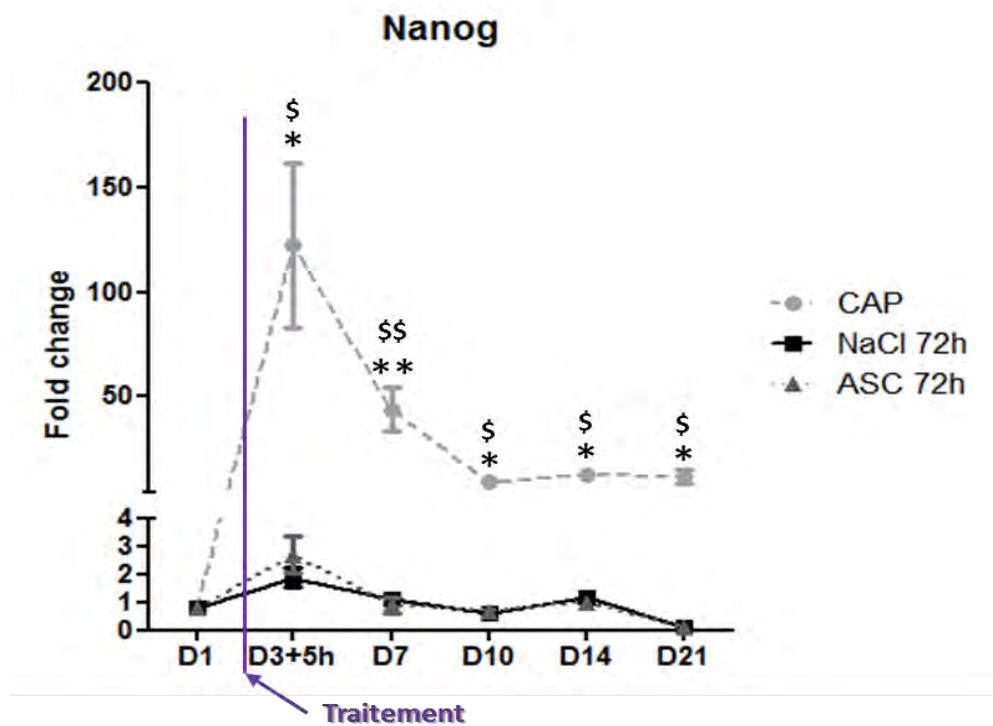


Figure 69 : Quantité d'ARN de Nanog dans les tissus traitées Plasma, ASC ou NaCl à 72 heures.

CAP = Cold atmospheric plasma à 72h.

Séquence des amorces de Nanog: For: GAACGCCTCATCAATGCCTGCA; rev: GAATCAGGGCTGCCTTGAAGAG.

- **Le plasma a un effet différentiel *in vitro* selon le type cellulaire envisagé**

Dans la publication (sous-chapitre A), l'application du plasma sur des cellules en culture produit des effets différents selon le type cellulaire envisagé. Tandis que les types immunitaires semblent particulièrement sensibles au plasma, les cellules mésenchymateuses ne montrent que peu ou prou d'altération de l'activité du *protéasome* (Figure 6 publication). Pour autant ces résultats semblent en contradiction avec les manipulations *in vitro* réalisées concernant la mise en place des paramètres de l'appareillage délivrant le plasma. Cependant, les deux expériences n'ont pas été conçues avec le même protocole. L'expérience *in vitro* de réglages a été conçue pour que le plasma touche directement les cellules sans l'intermédiaire de milieu de culture. A l'inverse, les expériences *in vitro* de la publication ont été conçues dans le souci de se rapprocher au plus près des conditions retrouvées sur l'animal. En effet, lorsque nous « shootons » la blessure, le plasma doit, si toutefois il y arrive, traverser au

moins l'épiderme pour atteindre les cellules d'intérêt. Considérant cela, nous avons essayé retranscrire la barrière épidermique en culture par la présence du milieu de culture.

En ce qui concerne les cellules mésenchymateuses, lorsque nous les appliquons directement avec le plasma froid porté par de l'hélium et de l'oxygène, elles rentrent en apoptose ; par contre, la présence du milieu, en quelque sorte, inhibe ce processus.

Si elles n'entrent pas en mort cellulaire, que leur arrivent-t-elles ? Changent-elles de phénotype ? Sont-elles totalement insensibles ? Toutes ces questions doivent trouver les réponses dans la mise en place de nouvelles expérimentations ; à savoir, au travers de l'interrogation de leur prolifération ou de leur immaturité voire comme discuté plus ultérieurement, de leur dédifférenciation.

- **Conclusion sur l'utilisation de traitement par jets de plasma froid à pression atmosphérique sur un modèle murin de brûlures de second degré profond**

Le plasma froid atmosphérique lorsqu'il est appliqué après l'initiation de l'inflammation permet une remarquable amélioration de la cicatrisation des brûlures profondes chez la souris *Nude*. Remarquable par le fait que toutes les couches cutanées sont recouvrées (hypoderme compris) mais également parce que, dans près de 70 % des cas, une cicatrice est très difficilement visible voire absente. L'histologie du derme laisse entrevoir un derme en reconstitution avec l'absence en son sein d'une cicatrice fibreuse. Une telle réparation s'apparente plus à une régénération qu'à une cicatrisation ; ces éléments concourent à introduire le terme de « régénération apparente » après traitement au plasma froid atmosphérique.

Le traitement après initiation de l'inflammation semble par contre nécessaire. Les résultats sont fonction de cette circonstance ; en effet, un traitement pré-inflammation ne circonscrit pas la formation d'une cicatrice. Rare dans la littérature scientifique que cette circonstance soit explorée.

Considérant les expériences présentement menées à leur terme, cette amélioration peut s'expliquer par le fait que le plasma semble avoir un effet délétère de préférence sur les cellules immunitaires. Par conséquent, nous nous retrouvons dans une situation où l'inflammation est atténuée. En outre et de manière plus surprenante, il semblerait que la phase cicatricielle subséquente ne puisse s'initier et se développer convenablement. Ceci est résumé par la figure 70 suivante.

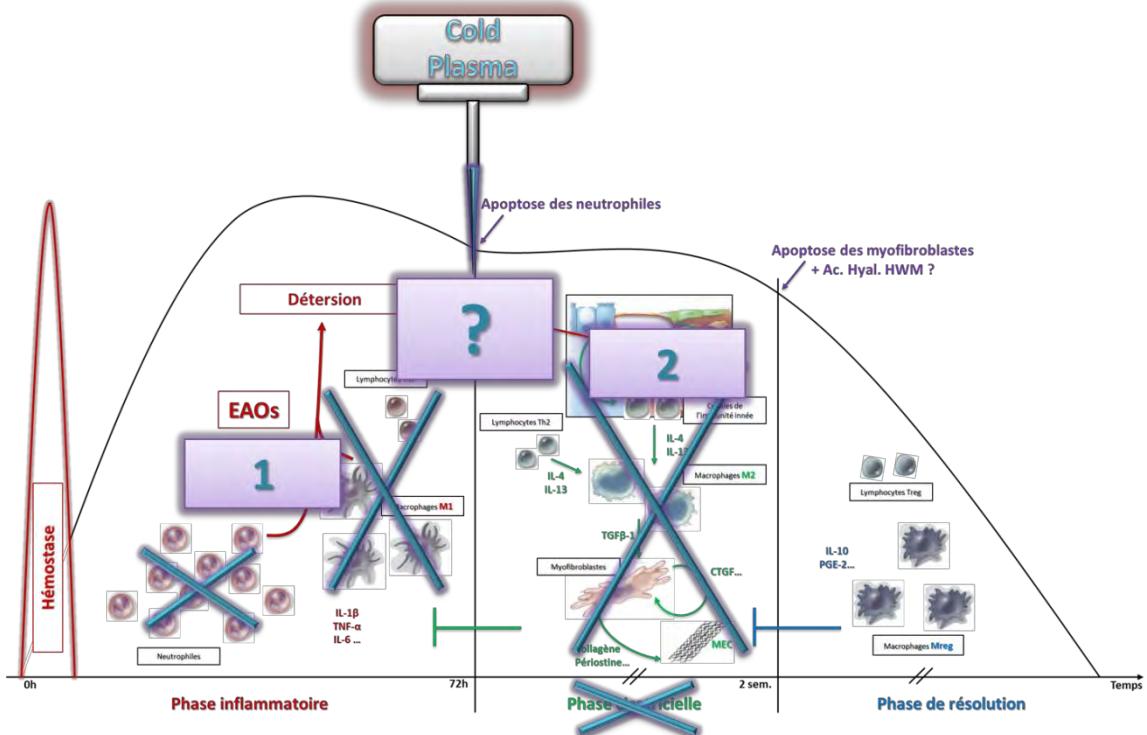


Figure 70 : Effets du plasma froid pressentis suite à l'étude menée dans cette thèse

1. Les nombres de cellules immunitaires durant la phase inflammatoire diminuent drastiquement.
2. Une absence de phase cicatricielle est décelée.
- ?. Par quels moyens le plasma produit-il ces effets ?

Cela pourrait signifier deux choses :

- Ce sont les cellules immunitaires présentes pendant l'inflammation qui participent à la mise en place de la phase de dépôt de matrice extracellulaire et non pas des cellules provenant du compartiment sanguin ;
- Ou, une immunosuppression se développe évitant ainsi la mise en place de l'immunité de type Th2 responsable de la mécanique de dépôt matriciel.

La première batterie de manipulations à réaliser est de caractériser au mieux le type de réparation à laquelle nous faisons face.

18 jours après le traitement, il n'y a manifestement plus de cicatrice ou lorsqu'il y a une cicatrice, la fibrose retrouvée est richement *cellularisée*, des annexes cutanées se laissent apercevoir et des adipocytes sont présents (Figure 71) ; ce qui suggère que le processus n'est pas encore achevé.

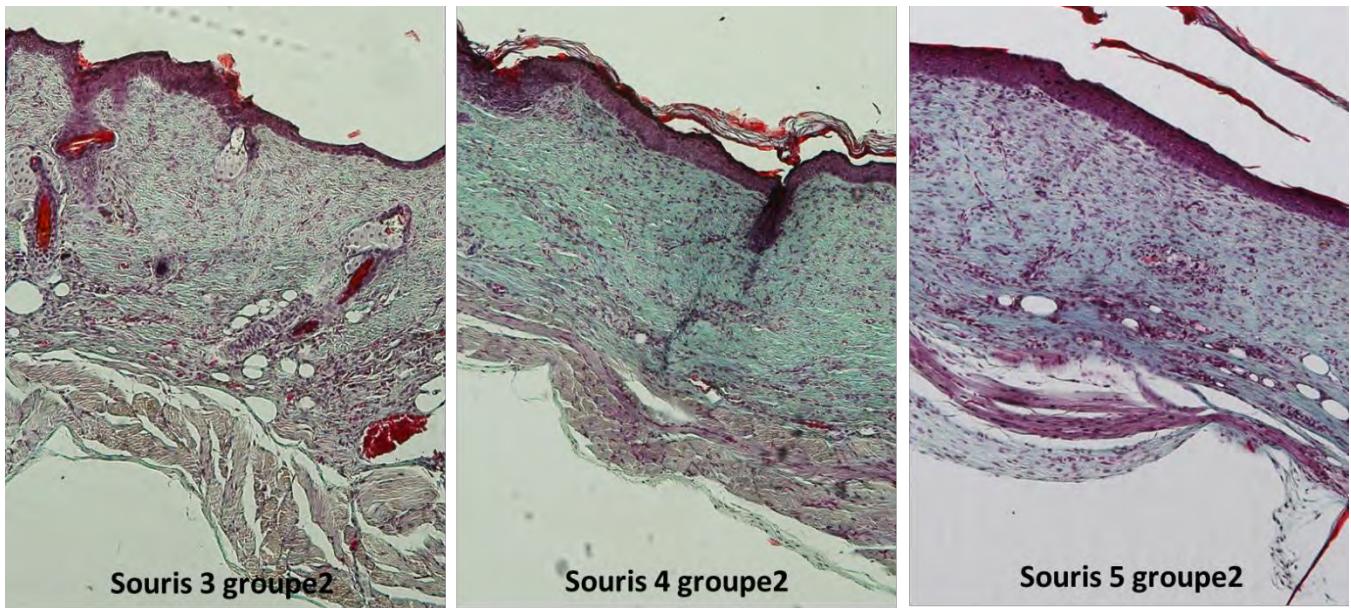


Figure 71 : Aspect de la cicatrice lorsqu'elle est présente (grossissement x10)

Pour préciser le type de réparation rencontrée ici, il serait judicieux en ce qui concerne la régénération :

- De rendre compte de la prolifération par marquage au Ki67⁴⁶ ;
- de préciser les types de collagène observés i.e. rechercher les niveaux de collagène III ;
- de déterminer la composition de la substance fondamentale au travers de l'observation de la fibronectine et de la *ténascine-C* ;
- de relever la formation d'une membrane basale achevée durant le processus de réparation par le marquage du collagène IV ; s'il n'y a pas de basale expressément définie, alors il y a de forte chance que cela soit une régénération ;
- de marquer les cellules épidermiques des follicules en formation par l'intermédiaire d'anticorps anti-kératine 17⁴⁷.

Par la suite, il serait impérieux de préciser la hausse de l'expression de *Nanog*. Il faudrait rechercher quels types cellulaires l'expriment, si une co-expression avec *Oct4* et *Sox 2* existe. L'expression de tels facteurs par des cellules stromales laisserait présager la présence de cellules pseudo-embryonnaires ; cellules qui préfigurent de la formation d'un blastème. Cette manipulation pourrait être augmentée par des études *in vitro* sur les effets de « notre » plasma sur les cellules de type fibroblastiques. En effet, il a été remarqué dans les expériences *in vitro* que le plasma froid a des effets différentiels selon les types cellulaires. Les cellules

⁴⁶ L'antigène Ki67 est présent sur une protéine nucléaire retrouvée lors de la prolifération.

⁴⁷ La kératine 17 est le sous-type de kératine observée lors du développement d'annexes cutanées pendant l'embryogenèse.

immunitaires ont tendance à être plus sensibles que les cellules du conjonctifs. De surcroît, une expression remarquable de *Nanog* a été perçue dans les tissus. Il serait intéressant de voir *in vitro* si le plasma est capable d'induire l'expression de facteurs de *pluripotence* et si ceci est effectivement le cas, en questionner la fonctionnalité. Mais également, de vérifier la survenue de telles cellules directement dans les tissus afin d'éluder la question de dédifférenciation ou d'apparition de cellules à potentialité multiple. En revanche, il est important de garder à l'esprit que la présence de cellules pluripotentes n'est pas indispensable pour la réparation de la peau.

En ce qui concerne la cicatrisation, les expériences devraient avoir attrait à l'observation de l'immunité de type Th2. Il serait important de savoir si une immunité de type Th2 peut se développer, notamment à travers la recherche de l'expression de cytokines pro-Th2 telles que l'IL4, l'IL-13 ou le TGF- β 1. L'absence de cette phase signifierait l'absence de la mise en œuvre du processus fibrotique de la cicatrisation. Ces manipulations devraient être augmentées par la recherche de myofibroblastes α SMA positifs *in situ*. Cependant, les quantités d'ARN d' α SMA retrouvées dans cette étude sont infimes (Figure 4b article).

En tout état de cause, si l'immunité de type Th2 ne se développe pas, si la présence de kératine 17 est confirmée, si une membrane basale est juste ébauchée et enfin, si des cellules présentent des facteurs de *pluripotence* alors il n'y a de forte chance pour que la réparation proposée par le plasma soit une régénération. En dernier recours et pour confirmation, des expériences de réparations de perforations auriculaires ou d'amputations de phalanges pourraient être diligentées.

La recherche des effets cellulaires et moléculaires *in situ* du plasma devrait être, dans un second temps, entreprise par l'expérience.

En premier lieu, il serait indispensable de vérifier que le plasma fasse ce à quoi il était destiné au départ c'est à dire déclencher l'apoptose.

Des expériences de TUNEL et d'activation de caspases devraient être menées. Si les évènements apoptotiques sont validés, il serait judicieux de déterminer quels types cellulaires les subissent mais également, quels mécanismes concourent à l'apoptose. Et dans tous les cas, il faudrait procéder à la vérification que les effets du plasma sur la cicatrisation perdurent suite à l'inhibition des phénomènes d'apoptose. Si, toutefois, nous voulons lier les phénomènes de morts cellulaires aux bénéfices cicatriciels du dispositif « Plasma ».

Les études antérieures qu’elles soient *in vitro* ou *in vivo* montraient que les effets apoptotiques du plasma étaient principalement fonction de l’apparition d’espèces actives. Attendu que les mêmes mécanismes se mettent en place dans les tissus de notre modèle, nous pourrions mener des expériences soit avec des sondes fluorescentes sensibles à l’oxydation par injection en systémique, soit avec des animaux transgéniques exprimant le senseur bactérien OxyR. L’apparition des espèces actives de l’oxygène et principalement, du peroxyde d’hydrogène pourrait être observée par microscopie *biphotonique intravitale*. Pour éluder la question des espèces actives comme déclencheurs de l’apoptose, nous pourrions traiter les souris à l’aide d’antioxydants puis sonder les tissus à la recherche d’évènements de mort cellulaire. Bien sûr, pour déterminer les relations de cause à effet, il serait nécessaire de vérifier que suite à ces expériences d’inhibitions, les effets bénéfiques du plasma sur la cicatrisation perdurent.

Nous avons également observé dans cette étude que l’application du plasma diminue l’expression de cytokines pro-inflammatoires et concourt également à la disparition d’une partie des cellules immunitaires au niveau de la lésion. De plus, une immunomodulation d’une immunité de type Th1 vers une immunité de type Th2 ne s’est vraisemblablement pas produite puisque la réaction fibrotique consécutive ne semble se dérouler. Le plus probable, en effet, est que l’application du plasma entraîne l’apparition d’un environnant immunosuppresseur. L’immunosuppression sera apte à empêcher le déclenchement de la phase fibrotique de la cicatrisation. Tout d’abord, par des expériences de qPCR et d’immunofluorescence, nous pourrions interroger la présence de cellules régulatrices afin de confirmer ou d’invalider la mise en place d’une immunosuppression. Il a déjà été entrepris des expériences avec des immunosuppresseurs en vue d’améliorer la cicatrisation [236]. Cependant, le *timing* utilisé dans cette étude, i.e. le traitement appliqué après l’initiation de l’inflammation, ne faisait pas partie des protocoles. En conséquence, l’administration de glucocorticoïdes après 72 heures pourrait nous renseigner sur les bénéfices de l’immunosuppression sur la cicatrisation. Enfin, nous pourrions également réaliser des expériences de déplétion de cellules immunitaires soit de manière générale, soit de manière différentielle et ce, dans un temps circonstancié, en l’occurrence à 72 heures après la blessure, afin de déterminer quels types cellulaires sont à incriminer dans la constitution d’une cicatrice ou dans l’inhibition de la mise en place d’une « régénération apparente ».

Les interrogations précédentes sont résumées dans le schéma suivant (Figure 72) :

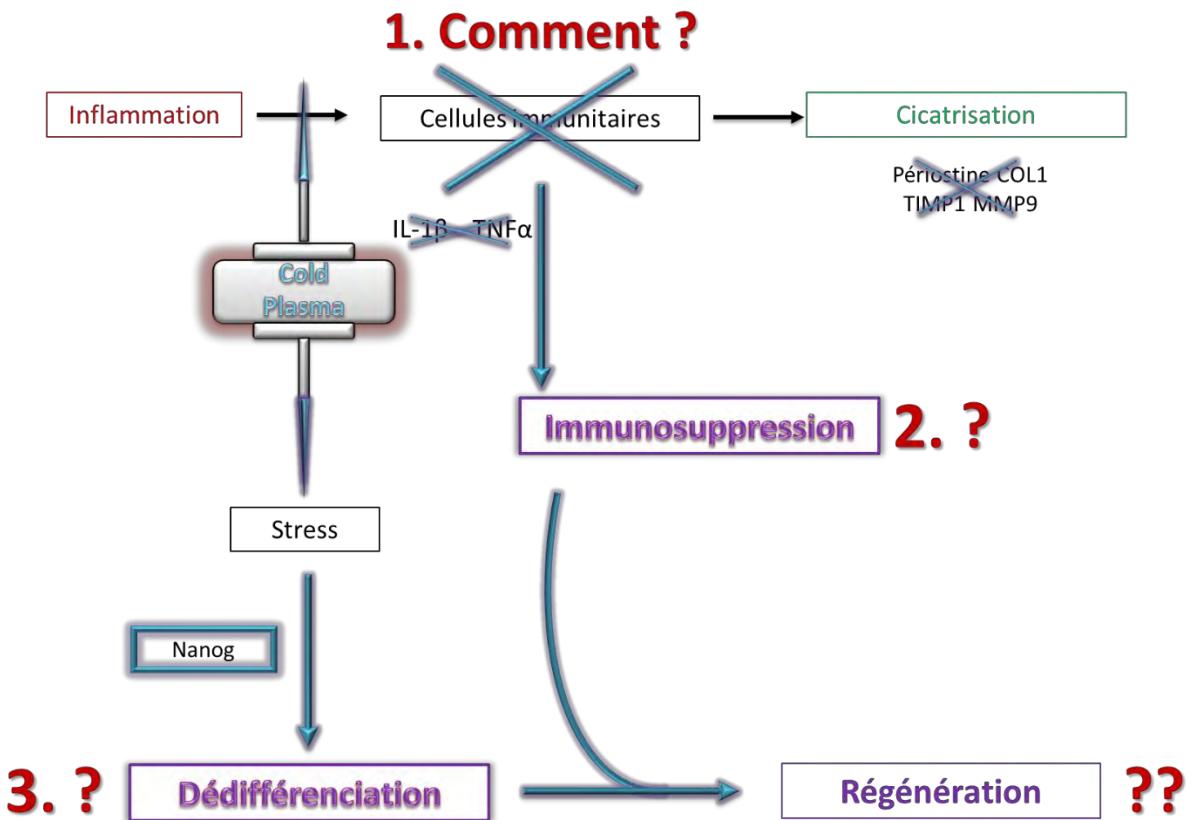


Figure 72 : Hypothèses de travail sur le long terme, considérant qu'une régénération soit caractérisée

La première question est bien entendu comment le plasma produit-il ses effets sur les cellules immunitaires ?

La deuxième question une immunosuppression est-elle à l'origine de l'infime réponse cicatricielle observée ?

La troisième question est d'interroger la présence de Nanog et de déterminer des évènements de dédifférenciation.

Enfin si ces questions sont validées, il faudrait interroger la pertinence d'une régénération ou d'une cicatrisation exceptionnelle.

L'application espérée en clinique pose quelques questions, certes moins prégnantes qu'avec la thérapie cellulaire. Le plasma lorsqu'il entre en contact avec l'atmosphère et l'environnement produit des espèces actives mais également, des entités qui pourraient s'avérer toxiques ou tumorales pour le vivant ; je pense principalement à la formation de l'ozone⁴⁸ mais surtout, à l'apparition d'ultra-violets. Les UV sont des cancérogènes avérés pour la peau. Un suivi des animaux sur le long-terme en tenant compte de potentiels évènements tumoraux serait donc nécessaire avant toute transposition en clinique. Toutefois, l'utilisation d'oxygène comme gaz porteur du plasma atténue fortement l'apparition d'UV.

⁴⁸ Que j'ai pu sentir durant les expérimentations.

Le plasma fait l'objet de recherche en cancérologie. Il a été montré que le plasma pouvait induire l'apoptose des cellules tumorales aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* [237]. Il devient par les présentes désigné comme futur traitement de choix pour les pathologies cancéreuses en complément ou en remplacement de la chimiothérapie. Cependant, l'apoptose peut être à l'origine d'une immunosuppression ou d'un effet anti-inflammatoire. L'application d'un traitement immunosuppresseur est, à mon sens, très dangereux en cancérologie en ceci que, même si un premier effet serait la mort cellulaire de certaines cellules tumorales, un deuxième effet aurait comme conséquence de laisser les cellules tumorales non détruites invisibles à la surveillance du système immunitaire. Il s'en suivrait vraisemblablement en conséquence une reprise tumorale probablement plus agressive qu'à l'origine.

Finalement, si les mécanismes bénéfiques sont dûment expliqués donc convenablement prouvés et l'innocuité avérée, le plasma deviendrait un outil thérapeutique de choix pour la prise en charge de la cicatrisation.

En outre avec ce dispositif et à l'inverse de la thérapie cellulaire, le traitement peut être effectué dès lors que la blessure est constatée ou que le traitement doit être entrepris. En effet, la thérapie cellulaire nécessite la récupération et l'expansion des cellules « thérapeutiques » dans des conditions de « bonnes pratiques de laboratoire ». Le délai d'expansion cellulaire nous empêche de prendre en charge le patient dans, ce qui pourrait être, le meilleur *timing* pour profiter pleinement des effets bénéfiques supposés. D'ailleurs, si les aptitudes prolifératives des cellules sont dopées en culture, une véritable épée de Damoclès peut refaire son apparition en ceci que la survenue d'une instabilité génétique deviendrait statistiquement probable. Certes, plusieurs études cliniques ont posé la faisabilité de telles thérapies cellulaires et ont éludé le problème d'une instabilité génétique [171]. Les propos restent à pondérer car de nouvelles études pointent à nouveau la transformation des cellules pendant l'expansion cellulaire [238]. De surcroît, des études sur le long terme sont à entreprendre pour définitivement attester de l'innocuité du substrat lors de thérapies cellulaires. L'instabilité génétique est certes non retrouvée dans la boîte de culture mais quand est-il des cellules se retrouvant dans un nouvel environnement qui, cette fois-ci, est vivant ?

Ces véritables nœuds gordiens vont, ce me semble, se défaire par un traitement basé sur l'utilisation de plasmas atmosphériques froids. En revanche, si le plasma arrive à induire des dédifférenciations et garantir une immunosuppression, il est indispensable de pouvoir rejeter des évènements tumoraux.

Enfin, un dispositif plasma froid atmosphérique pourrait être miniaturisé. Et, qui sait ? A très long terme, le plasma pourrait devenir un traitement individuel voire domestique à l'instar de l'eau oxygénée.

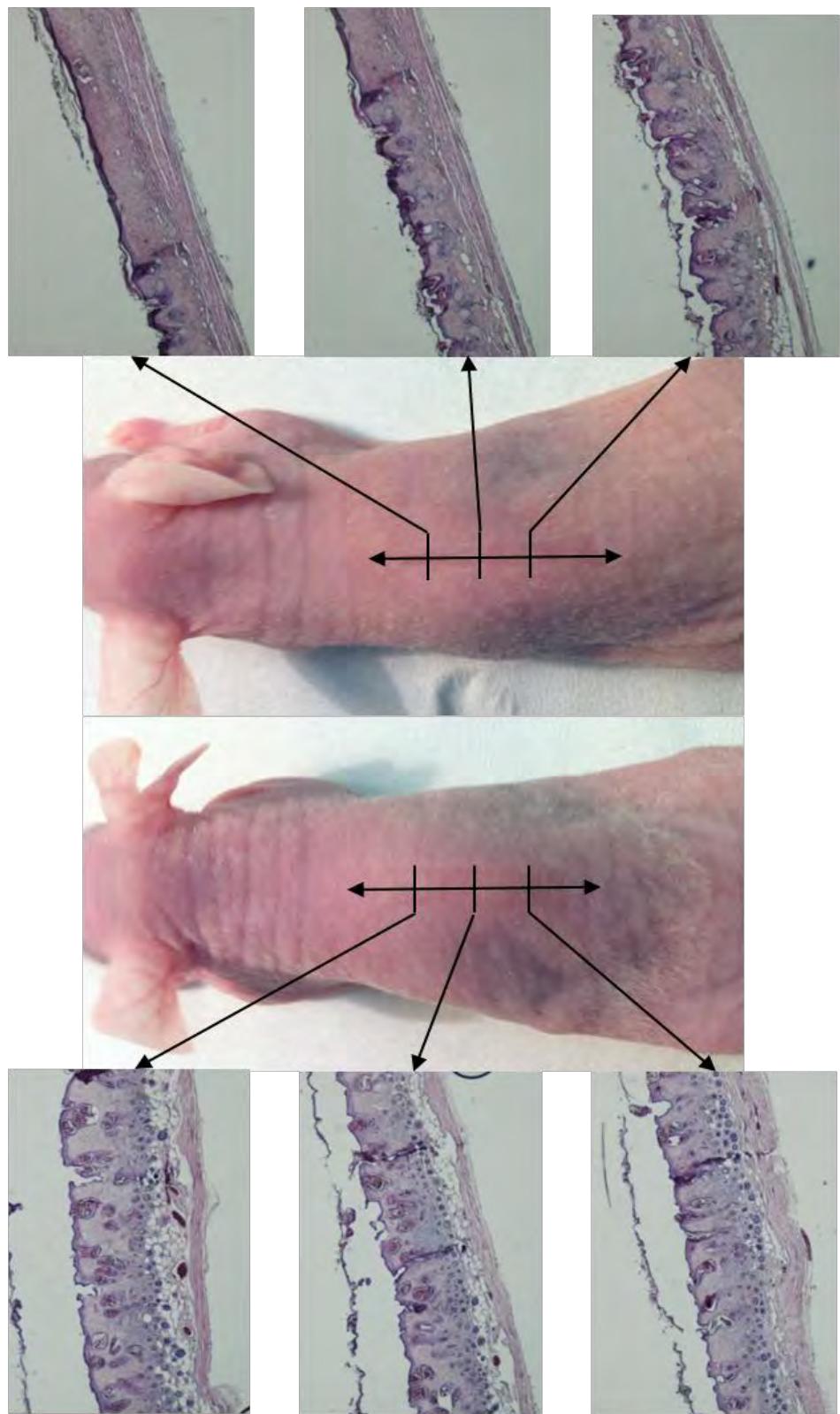


Figure 66 supplémentaire : D. Souris traitées Plasma avec coupes histologiques correspondantes (Grossissement x 2.5).

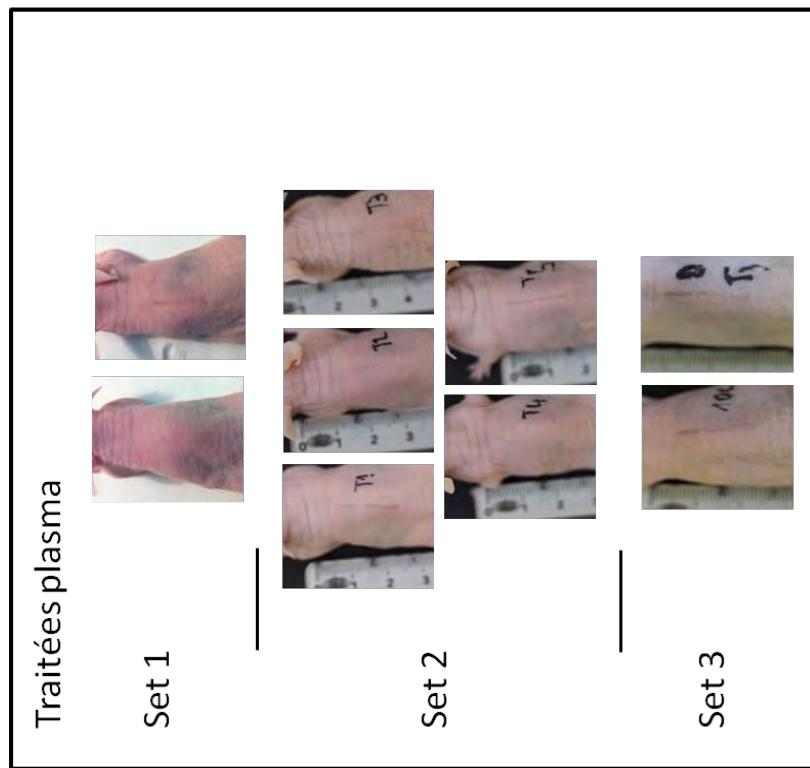
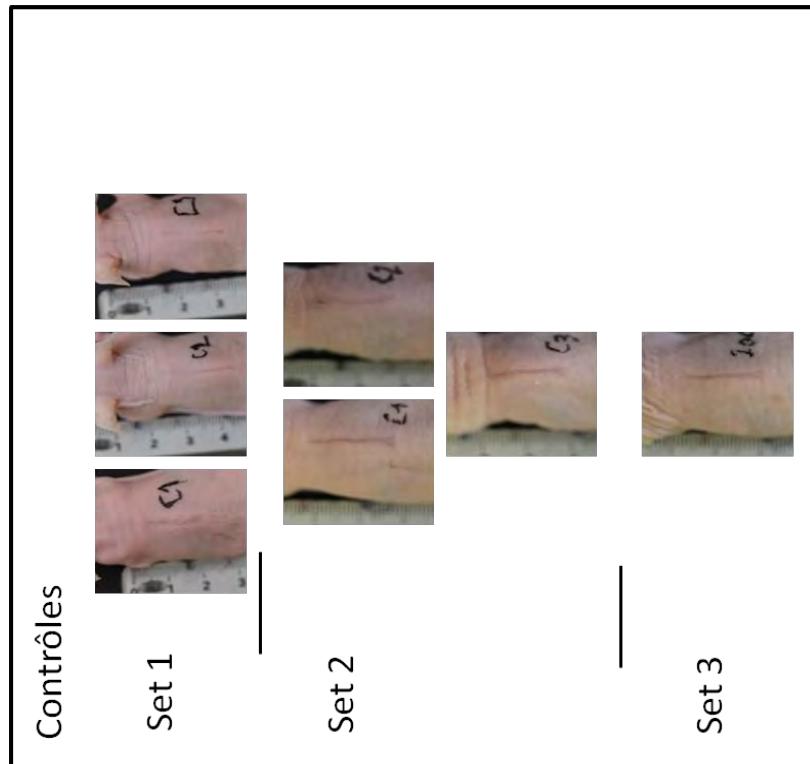


Figure 67 supplémentaire : B. Ensemble des animaux traités et contrôles sacrifiés à 21 jours après brûlures ou 18 jours après traitement.

Péroration

Deux réparations dans le règne animal ; chacune avec ses propres avantages. Une régénération qui permet la récupération d'un tissu ou d'un organe parfaitement opérationnel. Une cicatrisation qui, par son efficience, permet une réappropriation rapide du milieu.

L'artifice dans lequel vit l'espèce humaine tend hardiment à rejeter l'une de ces réparations, qui l'a pourtant aidé à survivre jusqu'à présent, pour préférer l'autre virtuellement mieux adaptée aux nouveaux modes de vie.

Depuis plus d'un siècle, la recherche biomédicale s'attelle à fomenter des thérapeutiques dans le but de rapprocher la cicatrisation de la régénération. Les découvertes successives de différentes cellules « souches » ont permis d'entrevoir des possibilités jusqu'alors inespérées. Cependant, aucune thérapeutique n'a réussi, bien qu'en circonscrivant modestement la cicatrisation, à approcher la régénération.

Dans cette étude, nous avons pris l'initiative de calmer la réaction cicatricielle des brûlures profondes par une approche de thérapie cellulaire basée sur l'utilisation des cellules mésenchymateuses du tissu adipeux.

Les premiers résultats semblaient encourageants en ceci que la réaction fibrotique était visiblement atténuée par la présence des ASC. Malencontreusement, cette amélioration ne put être retrouvée et rééditée dans un modèle adapté de cicatrisation de brûlures profondes rectangulaires.

Au-devant de ce constat, nous avons décidé de réorienter la thérapeutique vers non pas un acte dont le dessein serait de diminuer les processus cicatriciel mais vers un acte qui se devait d'atteindre l'éminente régénération.

La nouvelle stratégie se devait de mettre à l'écart les protocoles de « médecine régénérative » connus et par conséquent, de plonger dans l'inconnu.

La première mesure fut, au lieu de réduire l'inflammation dans les plus brefs délais, de prendre appui sur celle-ci. La deuxième fut d'arrêter la réaction fibrotique dans son ensemble. Et enfin, la dernière fut d'espérer que par consécution des mécanismes régénératrices s'organisent pour reformer les tissus détruits.

Le protocole retenu fut donc de traiter les brûlures après l'initiation de l'inflammation, d'essayer d'induire une mort cellulaire immunosuppressive et régénératrice à l'aide d'un état de la matière obscur pour le vivant, le plasma.

21 jours après le prologue de la mécanique réparatrice, les souris *Nude*, profondément brûlées, traitées par jets de plasma froid, recouvriraient une peau dont les traces cicatricielles, si tant est

qu'elles soient présentes, affichaient une architecture, somme toute, saine pour la gravité de la blessure qui a été engagée. De surcroît, une couche cutanée, l'hypoderme, irrémisiblement perdue lors de phénomènes cicatriciels, se laissait entrevoir.

Les annexes cutanées, follicules pileux en tête, s'observaient en nombre et enfin, le derme fraîchement reformé présenta une santé visuellement vigoureuse.

Le plasma froid a su agir en priorité sur la composante biologique qui coordonne les réparations, l'immunité ; et, par la présente, nous a proposé un fait analeptique à mi-chemin entre la cicatrisation et la régénération.

La nature de la réparation ourdie par l'intermédiaire d'une matière physique, en l'occurrence le plasma, doit toutefois être mise à nue par l'expérience. Toutes les mécaniques se doivent d'être décortiquées, l'innocuité du procédé thérapeutique doit être défiée consciencieusement et objectivement. Ce cahier des charges ainsi rempli devrait aboutir à la proposition d'une nouvelle médecine « régénérative ».

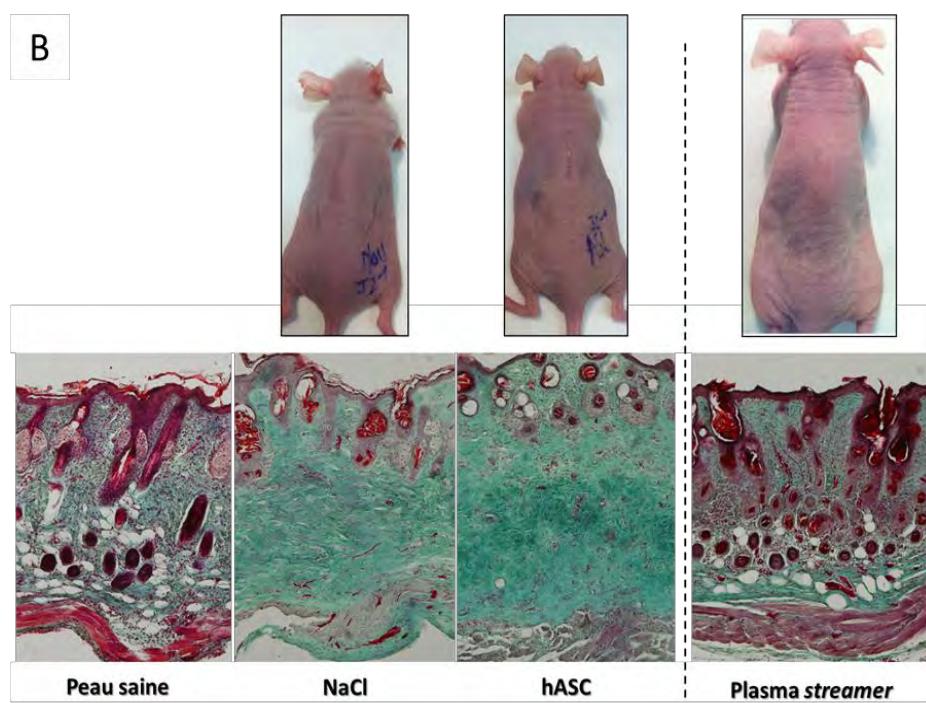
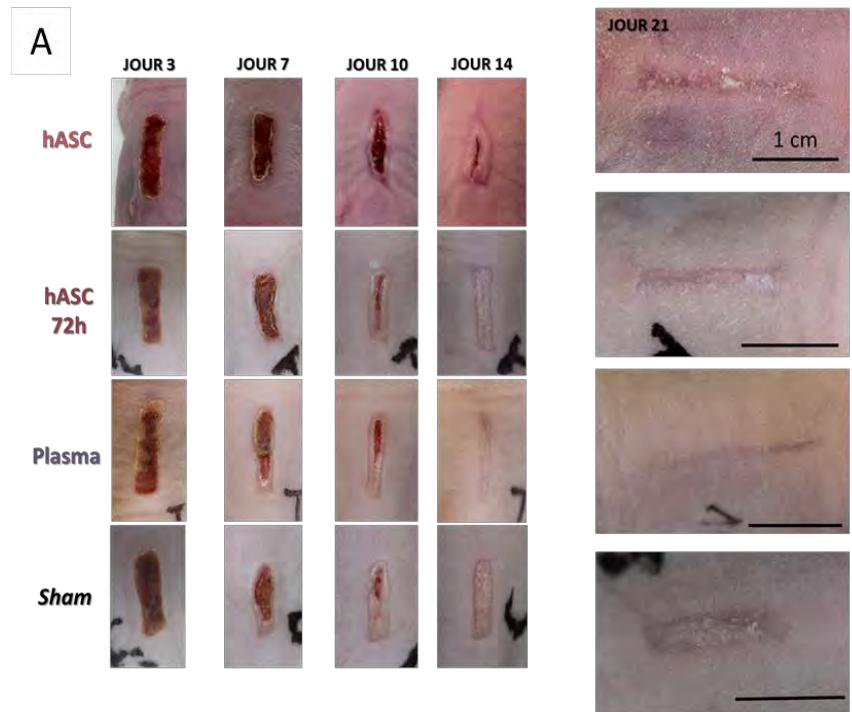


Figure 73 : Figure récapitulative des stratégies thérapeutiques décrites dans ce manuscrit.

A. Aspect macroscopique des cicatrices. **B.** Architecture histologique des cicatrices

Annexe

Annexe

De la rencontre des deux : régénération versus cicatrisation

« La régénération semble (...) un trait archaïque du monde animal qui aurait été conservé chez certains organismes métazoaires et perdu secondairement chez les autres, pour des raisons inconnues. La régénération devrait être considérée de façon légitime comme un fait biologique de base des organismes pluricellulaires (...). » Alejandro Sanchez Alvarado [239]

Le discours du Dr. Alvarado pose une des deux doctrines admises par les spécialistes de la régénération : les animaux qui cicatrisent ont perdu la capacité de régénération. Autrement dit, la régénération est un fait de base et suite à la pression du milieu, elle fut rejetée en faveur d'une cicatrisation mieux adaptée. Cependant, cela reste une allégation dont les fondements attendent démonstration. A l'opposé, le *Pr. Brockes*, spécialiste de la régénération des urodèles, semble séduit par l'hypothèse selon laquelle la régénération chez la salamandre est une mécanique active qui aurait écarté la cicatrisation au profit de la régénération [240]. A cet égard, faut-il rappeler, que les urodèles sont des vertébrés dont l'appartenance au séraï des animaux régénératifs apparaît comme un pied de nez à l'histoire de l'évolution. Nonobstant, celui qui détient la vérité possède nécessairement une des précieuses clés ouvrant la porte à la régénération mammalienne.

Au travers des paragraphes précédents, nous avons pu décrire les deux types de réparations observés dans le règne animal. Les propos ont été abordés selon un véritable schisme fort pratique, pour apposer leur description à la lumière de leurs dissemblances.

Cependant, les différences ne sont pas aussi marquées qu'elles n'y paraissent. L'authentique différence revêtant une signification entre les animaux qui régénèrent et les animaux qui cicatrisent est que les seconds ne régénèrent pas ! L'étape de constitution d'un blastème qu'il soit soutenu par une dédifférenciation ou par la présence de cellules pluripotentes ne survient aucunement chez les organismes complexes ayant adopté une unique cicatrisation pour se réparer. L'ensemble de ces affirmations suggèrent que quelque chose empêche les organismes complexes de régénérer.

Reste la question de savoir pour quelles raisons les uns régénèrent et les autres n'en éprouvent pas la nécessité.

Pour développer un embryon de réponse, nous allons, premièrement, constater que les animaux qui régénèrent et ceux qui cicatrisent, n'évoluent pas dans des milieux semblables (1 et 2).

En second lieu, nous remarquerons que ces capacités réparatrices peuvent être analysées à la lumière de l'évolution du système immunitaire (3).

1- Du milieu aquatique, un environnement séant à la régénération

Lorsque nous nous interrogeons sur la nature des animaux qui régénèrent, nous observons qu'ils évoluent préférentiellement dans un milieu aquatique. Effectivement, la planaire, l'hydre, l'axolotl, les salamandres et les tritons sont des animaux aquatiques, bien qu'amphibiens pour ces derniers. D'ailleurs, il est fort intéressant de remarquer que lorsque les anoures sortent de l'eau après leur métamorphose, ils perdent leur capacité de régénération⁴⁹. Bien que ce dernier phénomène puisse s'apprécier eu égard à la mise en place de tissus adultes, l'eau reste une condition récurrente dans laquelle la régénération exprime tout son potentiel. Plusieurs supputations peuvent être émises pour questionner l'importance de l'eau. La première, qui restera laconiquement évoquée, est que les forces de tensions appliquées sur les tissus dans l'eau ne sont pas les mêmes que celles rencontrées dans l'air. Nous avons vu, en effet, que la modification des forces de tensions exercées sur une plaie parvient à orienter favorablement le devenir cicatriciel.

La seconde est d'une pertinence « darwinienne » en sorte qu'elle fait appel à une réflexion sur la pression du milieu et la sélection naturelle. D'un point de vue de survie de l'espèce, les animaux aquatiques même privés d'un membre ou frappés d'une blessure handicapante ont toujours la capacité, dans l'eau, de se mouvoir pour continuer à se nourrir. A contrario, un mammifère, quant à lui, sera grandement handicapé par une amputation dans une recherche nourricière. L'impossibilité de mouvement s'accompagnera d'une privation de nourriture qui sera fatale pour l'animal blessé.

En définitive, cela voudrait dire que la durée prolongée d'une régénération ne gêne point la survie des animaux aquatiques mais perturbe la vie des animaux terrestres.

L'eau semble être donc, un milieu idoine à la régénération ; cette clarification devrait posée afin que nous puissions disposer de nouvelles connaissances sur l'origine de la régénération.

⁴⁹ A l'inverse des grenouilles et crapauds adultes, les têtards sont des êtres doués de régénération.

2- De l'avantage cicatriciel pour la survie des animaux terrestres.

Nous avons précédemment discuté de la place des milieux aquatiques dans le monde de la régénération. En effet, il est évident que la survie d'animaux aquatiques⁵⁰ ne soit pas, dans l'absolu, conditionnée par le déplacement. Par contre, le milieu terrestre quant à lui nécessite, pour y prospérer, que les animaux, qui le peuplent, soient munis par un appareil locomoteur efficient. Si la recherche de nourriture et par conséquent, la survie dans le milieu aquatique n'est pas conditionnée par le déplacement ; en milieu terrestre, au contraire, le mouvement est crucial en ceci qu'aucun courant ne pourra transporter l'animal vers un lieu nourricier. Ce phénomène est d'ailleurs bien plus marqué chez les carnivores dont la survie dépend de leur capacité à se déplacer avec célérité pour se nourrir. La vitesse de déplacement d'un herbivore n'a que peu d'importance pour dénicher une végétation qui pourrait convenir à ses besoins quotidiens de nourriture. Il est vrai que nous pourrions imaginer qu'un déplacement rapide est nécessaire pour échapper à un prédateur. Cependant, il n'a jamais été observé dans l'histoire zoologique, qu'une espèce ait été décimée par un appétit vorace de prédateurs. L'exemple de l'extinction d'espèces due à la présence de l'Homme est à traiter avec parcimonie puisque sans l'appui de progrès technologiques, ces exterminations ne restaient qu'au stade d'histoires ou de mythes.

Imaginez, ne serait-ce qu'un instant, une lionne douée de régénération attendant plus d'un mois⁵¹ avant de retrouver l'usage de sa patte à l'ombre d'un acacia ; ses possibilités de survie seraient nulles. Premièrement, elle deviendrait une proie pour ses congénères ou pour une meute de hyènes affamées. Secondairement, ce premier péril passé, elle devrait attendre qu'une gazelle vienne se loger dans sa gueule pour pourvoir la sustenter des besoins caloriques nécessaires à sa survie. Au vu de ces précédentes raisons, il apparaît donc que si la régénération avait été choisie chez les prédateurs, ceux-ci n'auraient vécu que brièvement sur la terre ferme.

De ces précédentes démonstrations, il est aisément de pointer du doigt une dissemblance fondamentale entre la régénération et la cicatrisation : la dimension « temps ». Pour qui aime observer, la durée de cicatrisation chez l'homme ne devrait plus avoir de secret. Une entaille profonde met environ une vingtaine de jours pour être cicatrisée ; en tout cas, pour que le membre lésé puisse être opérationnel. Par contre, la fermeture de la plaie par régénération

⁵⁰ Du moins, pour les animaux dont la chasse ne présente que peu d'intérêt pour la recherche de nourriture.

⁵¹ Durée moyenne de régénération chez les vertébrés doués de régénération.

serait rallongée au moins du double. En tenant compte de ce paramètre temporel, nous mesurons parfaitement l'importance de la cicatrisation pour les animaux terrestres et à plus forte raison, pour les carnivores et les animaux pour lesquels le déplacement est d'une absolue nécessité pour se nourrir. Suite à cette affirmation, nous pouvons développer un exemple frappant de l'avantage temporel qu'a procuré la cicatrisation. Les théropodes étaient des carnassiers ayant peuplé la terre du Trias supérieur au Crétacé. Leur survie était bien évidemment fort dépendante de leur capacité à se mouvoir dans l'espace pour chasser ou dénicher des carcasses sustentatrices. D'étonnantes observations ont pu être réalisées sur les ossements retrouvés sur des sites paléontologiques. En effet, certains os portaient des traces de réparations qui pouvaient correspondre à d'anciennes blessures ayant cicatrisé⁵². La cicatrisation étant constatée, la survie des animaux blessés était donc attestée. L'élément frappant de la découverte est que l'architecture de la réparation osseuse ne laissait transparaître qu'une cicatrisation particulièrement véloce. Les théories développées par les paléontologues suite à ces illuminations est que les théropodes étaient doués d'une cicatrisation énergique permettant de contenir une infection et surtout, de rétablir hâtivement le carnassier pour qu'il puisse se sustenter de ses incommensurables besoins caloriques.

Sachant que les théropodes sont apparus au trias supérieur, il y a plus de 200 millions d'années, nous pouvons émettre l'hypothèse que la cicatrisation était déjà présente. D'ailleurs, au vu de son efficacité⁵³, nous pourrions imaginer que son apparition a été finalement bien antérieure à l'apparition de ces monstres sanguinaires. Sans répondre aux questions évolutionnistes posées, cet exemple démontre la complexité à situer la cicatrisation vis-à-vis de la régénération. Du moins, peut-il aider à la compréhension du choix cicatriciel chez les espèces. Espérant que des scientifiques puissent s'attarder sur la question, ceci afin de savoir si nous pouvons faire appel à des mécanismes régénérateurs en dormance chez les organismes mammifères.

⁵² Pour beaucoup d'auteurs, la réparation osseuse se fait par « régénération » ; nonobstant, la présence de traces après réparation met à mal leur argumentation et fait pencher la balance vers une cicatrisation.

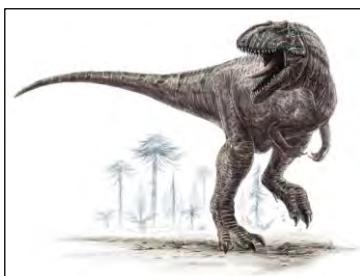
⁵³ Les théropodes ont vécu environ 145 millions d'années !

Cadre n°2 : La cicatrisation au secours de la paléontologie et de la phylogénie animale

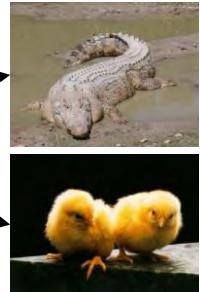
Il est étonnant également de remarquer que le phénomène cicatriciel a été un argument de choix pour discerner l'appartenance phylogénique de grands animaux éteints depuis 65 millions d'années. Deux prétendants étaient en lice pour représenter ces dinosauriens, les crocodiliens de taille honorable et d'aspect effrayant ou les oiseaux dont la relative fébrilité semble les éloigner en tout point d'un terrible carnassier de sept tonnes. Zoologistes et paléontologues ont travaillé de concert pour découvrir que la cicatrisation des oiseaux semblait similaire à celle des théropodes. La cicatrisation des oiseaux est bien rapide et extrêmement efficace à l'instar de celle des théropodes ; il s'agit sans aucun doute d'un atavisme. Par contre, la cicatrisation des crocodiliens est particulièrement lente et inadaptée à une vie exclusivement terrestre. Cette découverte a été l'un des éléments parmi d'autres qui ont permis de situer les oiseaux dans le clade des théropodes.

Finalement, il est à présent su qu'il existe une filiation entre ces trois espèces ; les crocodiliens sont les aïeuls des théropodes qui, eux, sont les aïeuls des oiseaux. Ceci étant dit, nous avons par conséquent un domaine d'étude pour l'évolution du processus cicatriciel en fonction du temps zoologique. La filiation de ces animaux permet d'observer l'évolution temporelle de l'efficience de la cicatrisation.

Question en paléontologie: spéciation des théropodes → oiseaux ou crocodiliens ?



Cicatrisation équivalente



Dans tous les cas, l'apparition de la cicatrisation ou tout du moins, son évolution a été d'une précieuse aide pour la survie des animaux terrestres ; Sa rapidité, nonobstant sa moindre qualité, semble avoir été un avantage pour la survie dans le milieu terrestre. Cependant, la réparation tissulaire étant souvent décrite, à raison, considérant l'immunité, il est judicieux d'émettre l'interrogation suivante : le milieu, au lieu d'avoir fait pression sur les processus réparateurs, n'eût-il pu faire pression préférentiellement sur le système immunitaire ? Autrement dit, un milieu aquatique requiert-il un système immunitaire semblable à celui d'un

milieu terrestre ? La réparation observée, dans telle ou telle espèce, n'est-elle pas conditionnée par le fait que le système immunitaire s'est développé dans un milieu aquatique ou dans un milieu en prise avec la composante aérienne de la planète ? L'étrange évolution concomitante d'un système immunitaire complexe et d'une cicatrisation efficiente rend ces questions pertinentes. Cette notion sera discutée dans le paragraphe suivant.

3- De l'immunité, pivot de la réparation

Nous avons vu que le milieu aquatique abritait la plupart des animaux doués de régénération au vu de deux raisons, de moindres forces physiques inhérent à la densité de l'eau et une capacité de déplacement peu altérée. Nous avons discuté de l'avantage que procure une cicatrisation rapide par rapport une régénération, par définition lente, dans un milieu terrestre dans lequel le déplacement est un élément indispensable pour la survie des espèces.

Nous pouvons discourir, à présent, des capacités régénératrices ou cicatricielles à l'aune du système immunitaire. En effet, nous avons précédemment discuté du rôle de l'immunité dans chacun des processus réparateurs, à savoir un système particulier pour la régénération et une immunité de type Th2 pour la cicatrisation. L'une des raisons pour lesquelles certains animaux régénèrent et d'autres non, se retrouve certainement dans la biologie de leur système immunitaire.

Les animaux dont la cicatrisation gouverne les réparations tissulaires sont des organismes complexes. En effet, un oiseau est plus complexe d'un point de vue biologique qu'un polype. Il convient de rendre compte par-là que cette complexité supérieure peut être appréciée en tenant compte du système immunitaire. Les animaux « cicatriciels » présentent à la différence d'un polype⁵⁴, un système immunitaire adaptatif compétent. Ce système adaptatif joue un rôle prégnant dans la survenue d'une immunité de type Th2, immunité qui, je le rappelle, est responsable du dépôt de matrice extracellulaire. Il est intéressant de remarquer que les animaux détenant un système adaptatif complexe, récent si nous considérons l'histoire de l'évolution, ont pour point commun une cicatrisation efficiente. Nonobstant, les urodèles, amphibiens à queue, détiennent un système immunitaire acquis mais régénèrent. Cependant, ils sont capables grâce à un système immunitaire particulier d'entretenir une immunotolérance ou une immunosuppression compatible avec la régénération, comme si la « volonté » de l'évolution soit que ces animaux régénèrent ! De surcroît, il est intéressant de remarquer que

⁵⁴ Le polype n'est rien d'autre que l'hydre. Le *polype d'eau douce* fut dénommé *hydre* car ses capacités régénératrices évoquaient le mythe de l'*Hydre de Lerne*.

le foie, seul organe régénératrice des mammifères, semble disposer d'un système immunitaire lymphoïde circonstancié permettant d'entretenir une immunotolérance [241].

Si nous partons du postulat d'Alvarado que la régénération est un fait biologique de base. Nous comprenons pourquoi les fœtus mammaliens se réparent sans cicatrice. Si la régénération est un ancêtre de la cicatrisation, l'ontogenèse récapitulative fait passer l'être en développement d'une aptitude à la régénération à une capacité de cicatrisation. Toutefois, il ne s'agit que d'une digression simpliste sur le sujet puisque l'ontogenèse récapitulative reste une théorie fantasque. Plus sérieusement, le fait que le fœtus passe d'une aptitude à « régénérer » à une propension à cicatriser peut s'expliquer eu égard à la maturation du système immunitaire. La cicatrisation fœtale, même chez les humains, présente une particularité : elle n'engendre pas de cicatrice [242]. Par exemple, au niveau de la peau, une cicatrice fœtale, si tant est qu'elle existe, possède une matrice extracellulaire semblable à une peau saine. En revanche, cette capacité de réparation sans cicatrice s'estompe avec l'âge du fœtus [243]. De manière étonnante, l'aptitude à constituer une cicatrice semble suivre le développement d'une immunité complexe. D'ailleurs à cet effet, nous pouvons observer qu'un nourrisson produit une cicatrice de meilleure qualité qu'un adulte⁵⁵. Nous savons qu'à la naissance, le système immunitaire adaptatif apparaît naïf puisqu'il a évolué jusqu'à présent dans l'environnement stérile placentaire. Lorsque celui-ci devient compétent suite à la rencontre à des pathogènes du milieu extérieur, les marques cicatricielles deviennent plus tenaces. Y-a-t-il corrélation ?

Un autre exemple patent est celui de la métamorphose chez les anoures, amphibiens sans queue. Le têtard de grenouille ou de crapaud possède une capacité de régénération similaire à leur cousin, les urodèles [16]. Malheureusement, cette aptitude est totalement abrogée après la métamorphose. Quelle en est la cause ? Un élément de réponse peut se trouver dans l'ontogenèse du système immunitaire chez *Xenopus laevis*. Egalement dans ce modèle, la perte de l'aptitude régénératrice est corrélée avec le développement d'un système immunitaire adaptatif compétent (Figure 74). Ici, l'exemple parle de lui-même c'est-à-dire sans système immunitaire compétent, il se produit une régénération. Par contre, la présence d'une immunité compétente entraîne la perte des capacités régénératrices. Il existe, semblerait-il, une corrélation particulièrement tenace entre immunité et réparation.

⁵⁵ Propos rapportés de chirurgiens pédiatriques.

Chaque modèle observé démontre pertinemment qu'un système adaptatif efficient est antinomique d'une régénération ; en outre, lorsqu'une immunité acquise est présente⁵⁶, un système immunotolérant ou immunosuppressif est discerné pour empêcher la mise en place de la réponse immunologique adaptative. A partir de ces constats, une conclusion irréfragable peut être émise : La capacité de régénération diminue avec la complexité de l'immunité, lorsque celle-ci ne participe pas directement à la régénération.

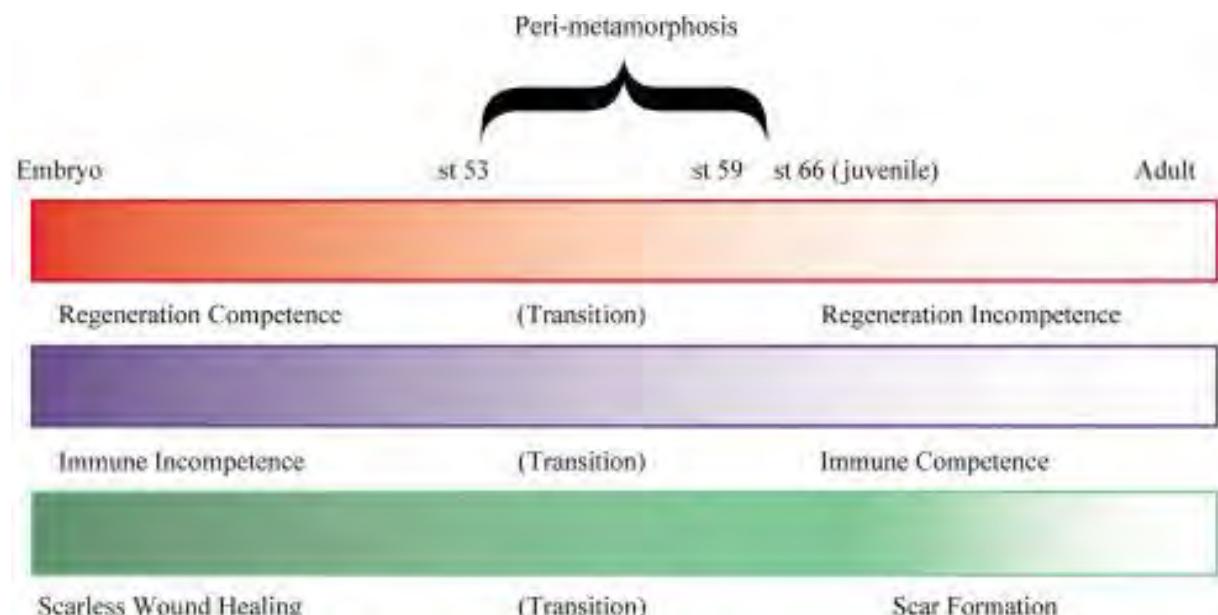


Figure 74 : Cinétique développementale du Xénope à ses capacités régénératrice et cicatricielle.
[D'après Yannas IV, 1996]

Ma doctrine m'instille la pensée selon laquelle la régénération est un trait archaïque de base de la réparation dans le règne animal et par conséquence, que la cicatrisation se soit fait connaître de la biologie ultérieurement.

Il est possible au vu des assertions et des réflexions précédentes que la cicatrisation soit apparue lorsque les animaux ont colonisé la terre ferme en ceci que la nature ait fait, en quelque sorte, pression pour que survivent des organismes dont la durée de réparation ne soit pas incompatible avec une nécessité de déplacement. En d'autres mots moins naïfs, les animaux équipés d'une cicatrisation étaient aptes à évoluer dans un environnement terrestre. De plus, il est intéressant de penser que cette sélection s'est faite au travers de l'acquisition d'un système immunitaire de plus en plus complexe. En effet, le système immunitaire dirige la réparation ; il est donc sensé d'imaginer que l'évolution de l'immunité soit une cause de la

⁵⁶ Chez les urodèles.

survie des espèces terrestres ; survie, elle-même, conditionnée par le déplacement donc par une réparation tissulaire véloce. De l'acquisition d'un système immunitaire complexe s'est produite l'apparition d'une réparation adaptée pour affronter les conditions de vie d'un milieu dans lequel le déplacement est une nécessité vitale.

Eu égard le mode de vie de l'espèce humaine dans nos sociétés modernes⁵⁷, le déplacement est devenu une qualité quasi-obsolète en vue d'une recherche de nourriture (Figure 75). La cicatrisation, sans parler des pathologies fibrotiques, est assimilée par les professionnels comme une maladie qui ne devrait exister. De surcroît, les cicatrices sont devenues des traces inesthétiques, si elles ne sont pas pour autant néfastes sur le plan physiologique, qui engendrent des handicaps sociaux et des pathologies phobiques instillées par une pression sociale de la perfection physique et morale^{58, 59}.

Tout cela pour dire que si la cicatrisation est devenue l'opprobre de l'espèce humaine ou du moins, a perdu toute signification vitale, pourquoi ne trouvons-nous pas un moyen de régénérer une fois pour toute ?



Figure 75 : Image tirée du film WALL-E, film d'animation Disney-Pixar.

Cette image fait référence au mode de vie sédentaire des sociétés humaines industrialisées. Remarquons que la nécessité de déplacement pour la survie est totalement obsolète...

⁵⁷ Par opposition aux sociétés dites « archaïques » persistantes. L'emploi de ce qualitatif a été voué aux gémomies par le *Pr. Lévi-Strauss*.

⁵⁸ Tout ce qui est laid est forcément mauvais ; nous pouvons à cet égard se référer aux films Disney...

⁵⁹ A l'opposé, dans les sociétés dites « archaïques », les cicatrices, à l'instar des tatouages, peuvent jouer le rôle de cohésion sociale en marquant l'appartenance à une tribu ou à une communauté.

Avant de pouvoir donner une prédisposition régénératrice à l'Homme, nous devons parvenir à instituer la régénération chez de petits mammifères. La cible immunitaire semble posséder toutes les qualités requises pour que les mythes deviennent réalité !

Références bibliographiques

1. Endo T , Bryant SV, Gardiner DM. A stepwise model system for limb regeneration. *Dev Biol.* 2004 Jun 1; 270(1):135-45.
2. Brockes JP , Kumar A. Comparative aspects of animal regeneration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2008. 24:525–49
3. Birnbaum KD, Sánchez Alvarado A. Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals. *Cell.* 2008 Feb 22; 132(4):697-710.
4. Tanaka EM, Drechse DN, Brockes JP. Thrombin regulates S-phase re-entry by cultured newt myotubes. 1999. *Curr. Biol.* 9:792–99
5. Nacu E, Tanaka EM. Limb regeneration: a new development? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011.27:409-440.
6. Eisenhoffer GT, Kang H, Sánchez Alvarado A. Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell.* 2008 Sep 11; 3(3):327-39.
7. Sánchez Alvarado A. Developmental biology: A cellular view of regeneration. *Nature.* 2009 Jul 2; 460(7251):39-40.
8. Kumar A, Godwin JW *et al.* Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science.* 2007 Nov 2; 318(5851):772-7.
9. Brockes JP, Kumar A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Aug; 3(8):566-74.
10. Auffray C, Fogg D, Garfa M, *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 2007 Aug 3; 317(5838):666-70.
11. Godwin JW, Brockes JP. Regeneration, tissue injury and the immune response. *J Anat.* 2006 Oct; 209(4):423-32.
12. Peiris TH, Hoyer KK, Oviedo NJ. Innate immune system and tissue regeneration in planarians: An area ripe for exploration. *Semin Immunol.* 2014 Aug; 26(4):295-302.
13. Knapp D, Tanaka EM. Regeneration and reprogramming. *Curr Opin Genet Dev.* 2012 Oct; 22(5):485-93.
14. Mathew LK, Sengupta S, Kawakami A, *et al.* Unraveling tissue regeneration pathways using chemical genetics. *J Biol Chem.* 2007 Nov 30; 282(48):35202-10.

- 15.** Huang WC, Yang CC, Chen IH, *et al.* Treatment of Glucocorticoids Inhibited Early Immune Responses and Impaired Cardiac Repair in Adult Zebrafish. *PLoS One*. 2013 Jun 21; 8(6).
- 16.** Mescher AL, Neff AW. Limb regeneration in amphibians: immunological considerations. *ScientificWorldJournal*. 2006 Feb 26; 6 Suppl 1:1-11.
- 17.** Stocum, D. (1995) Wound Repair, Regeneration and Artificial Tissues. R.G. Lander, Austin.
- 18.** Du Pasquier, L., Schwager, J., and Flajnik, M.F. The immune-system of *Xenopus*. *Ann. Rev. Immunol.* 1989; 7, 251–275.
- 19.** Tournefier A, Laurens V, Chapusot C, *et al.* Structure of MHC class I and class II cDNAs and possible immunodeficiency linked to class II expression in the Mexican axolotl. *Immunol Rev*. 1998 Dec; 166:259-77.
- 20.** Cohen N. Amphibian transplantation reactions; a review. *Am. Zool*. 1971; 11, 193-205.
- 21.** Ferguson TA, Griffith TS. A vision of cell death: insights into immune privilege. *Immunol Rev*. 1997 Apr; 156:167-84.
- 22.** Kanao T, Miyachi Y. Lymphangiogenesis promotes lens destruction and subsequent lens regeneration in the newt eyeball, and both processes can be accelerated by transplantation of dendritic cells. *Dev Biol*. 2006 Feb 1; 290(1):118-24. Epub 2005 Dec 15.
- 23.** Sophie Vriz, Silke Reiter, Brigitte Galliot. Current Topics in Developmental Biology, Volume 108, 2014.
- 24.** Chera S, Ghila L, Dobretz K, *et al.* Apoptotic Cells Provide an Unexpected Source of Wnt3 Signaling to Drive *Hydra* Head Regeneration. *Dev Cell*. 2009 Aug; 17(2):279-89.
- 25.** Pellettieri J, Fitzgerald P, Watanabe S, *et al.* Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. *Dev Biol*. 2010 Feb 1; 338(1):76-85.
- 26.** Wenemoser D, Reddien PW. Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. *Dev Biol*. 2010 Aug 15; 344(2):979-91.
- 27.** Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*. 2000 Nov; 5(5):415-8.
- 28.** Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*. 2009 Jun 18; 459(7249):996-9.
- 29.** Gauron C, Rampon C, Bouzaffour M, *et al.* Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. *Sci Rep*. 2013; 3:2084.

- 30.** Love NR, Chen Y, Ishibashi S, *et al.* Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nat Cell Biol.* 2013 Feb; 15(2):222-8.
- 31.** Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008 Dec; 8(12):958-69.
- 32.** Li F, Huang Q, Chen J, *et al.* Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci Signal.* 2010 Feb 23; 3(110):ra13.
- 33.** Kondo S. Altruistic cell suicide in relation to radiation hormesis. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1988 Jan; 53(1):95-102.
- 34.** Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol.* 2012 Jan 1; 188(1):21-8.
- 35.** Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.* 2011 Oct 19; 12(11):1035-44.
- 36.** Pollard TD, Earnshaw WC, Biologie cellulaire. Elsevier. Campus reference. 2004.
- 37.** Lawrence WT. Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg.* 1998 Jul; 25(3):321-40.
- 38.** Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999 Sep 2; 341(10):738-46.
- 39.** Waldorf H, Fewkes J. Wound healing. *Adv Dermatol.* 1995; 10:77-96
- 40.** Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003 Jul; 83(3):835-70.
- 41.** Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008 May 15; 453(7193):314-21.
- 42.** Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011 Oct 14; 11(11):723-37.
- 43.** Fleming BD, Mosser DM. Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. *Eur J Immunol.* 2011 Sep; 41(9):2498-502.
- 44.** Jameson J, Havran WL. Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol Rev.* 2007 Feb; 215:114-22.
- 45.** Crispe IN. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jan; 3(1):51-62.
- 46.** Martino G, Pluchino S, Bonfanti L, Schwartz M. Brain regeneration in physiology and pathology. *Physiol Rev* 91. 1281-1304. 2011.

- 47.** Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, *et al.* Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol.* 2003 Jun; 73(6):713-21.
- 48.** Van der Veer WM, Bloemen MC, Ulrich MM, *et al.* Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation. *Burns.* 2009 Feb; 35(1):15-29.
- 49.** Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 2007 Mar; 127(3):526-37.
- 50.** Gause WC, Wynn TA, Allen JE. Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminthes. *Nat Rev Immunol.* 2013 Aug; 13(8):607-14.
- 51.** Ferguson MW, O'Kane S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004 May 29; 359(1445):839-50.
- 52.** Allen JE, Wynn TA. Evolution of Th2 Immunity: A Rapid Repair Response to Tissue Destructive Pathogens. *PLoS Pathog.* 2011 May; 7(5):e1002003.
- 53.** Allison Nauta, Barrett Larson, Michael T. Longaker, H. Peter Lorenz. 2011 Chapter 6 - Scarless Wound Healing, Pages 103-127. *Principles of Regenerative Medicine.*
- 54.** Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012 Jul 6; 18(7):1028-40.
- 55.** Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in Tissue Injury and Repair. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23:435-61.
- 56.** Gurtner GC, Dauskardt RH, Wong VW, *et al.* Improving Cutaneous Scar Formation by Controlling the Mechanical Environment. *Ann Surg.* 2011 Aug; 254(2):217-25.
- 57.** Korns D, Frasch SC, Fernandez-Boyanapalli R, *et al.* Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Front Immunol.* 2011 Nov 8; 2:57.
- 58.** Linheng Li and Hans Clevers. Coexistence of Quiescent and Active Adult Stem Cells in Mammals. *Science.* 2010 Jan 29; 327(5965):542-5.
- 59.** Barker N, Bartfeld S, Clevers H. Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell.* 2010 Dec 3; 7(6):656-70.
- 60.** Alan Stevens, James Lowe. *Histologie humaine, deuxième édition.* 2002. De Boeck Université.
- 61.** Seno H, Miyoshi H, Brown SL, *et al.* Efficient colonic mucosal wound repair requires Trem2 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:256-261.
- 62.** Robert L. Coffman. The Origin of TH2 Responses. *Science* 328, 1116 (2010).

- 63.** Cheng O, Thuillier R, Sampson E, *et al.* Connective Tissue Growth Factor is a Biomarker and Mediator of Kidney Allograft Fibrosis. *Am J Transplant.* 2006 Oct; 6(10):2292-306. Epub 2006 Aug 4.
- 64.** Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol Rev.* 2014 Nov; 262(1):153-66.
- 65.** Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, *et al.* Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29:71-109.
- 66.** Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest.* 2008 Nov; 118(11):3522-30.
- 67.** Duffield JS, Luper M, Thannickal VJ, Wynn TA. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2013 Jan 24; 8:241-76.
- 68.** Wynn TA, Barron L. Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin Liver Dis.* 2010 Aug; 30(3):245-57.
- 69.** Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012 Jul 6; 18(7):1028-40.
- 70.** Wysocki AB. Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *Nurs Clin North Am.* 1999 34 (4): 777-97.
- 71.** Fawcett DW, Jersh RP. "Bloom & Fawcett" Histologie. Collection "Sciences fondamentales". Editions Maloine. 2002. p. 261 – 277.
- 72.** Descamps H, Baze Delecroix C, Jauffret E. Rééducation de l'enfant brûlé. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Kinésithérapie – Médecine physique-Réadaptation, 26-275-D-10, 2001, 10 p.
- 73.** Kamina Pierre. Précis d'anatomie clinique. Tome 1. Editions Maloine. 2002. p. 107 – 117.
- 74.** Stevens A, Lowe J. Human histology. Second edition. Mosby. 1997.
- 75.** Neufeld DA, Day FA. Perspective: a suggested role for basement membrane structures during newt limb regeneration. *Anat Rec.* 1996 Oct; 246(2):155-61.
- 76.** Keene DR, Sakai LY, Lunstrum GP, *et al.* Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J Cell Biol.* 1987 Mar; 104(3):611-21.
- 77.** Larsen WJ. Human embryology. Third edition. Elsevier science. 2001. p. 465 – 479.
- 78.** Ortonne JP, Benedetto JP. Mélanocytes épidermiques et mélanocytes folliculaires. *Ann. Génét. Sel. Anim.* 1981, 13(1), 17- 6.
- 79.** Fuchs E, Raghavan S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nature Reviews Genetics.* 2002; 3, 199-209.

- 80.** Li H, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*. 2010 Jan 29; 327(5965):542-5.
- 81.** Ito M, Liu Y, Yang Z, *et al*. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med*. 2005; 11:1351–4.
- 82.** Plikus MV, Gay DL, Treffisen E, *et al*. Epithelial stem cells and implications for wound repair. *Semin Cell Dev Biol*. 2012 Dec; 23(9):946-53.
- 83.** Jensen KB, Collins CA, Nascimento E, *et al*. Lrig1 expression defines a distinct multipotent stem cell population in mammalian epidermis. *Cell Stem Cell*. 2009; 4:427–39.
- 84.** Snippert HJ, Haegebarth A, Kasper M, *et al*. Lgr6 marks stem cells in the hair follicle that generate all cell lineages of the skin. *Science*. 2010; 327:1385–9.
- 85.** Brownell I, Guevara E, Bai CB, *et al*. Nerve-derived sonic hedgehog defines a niche for hair follicle stem cells capable of becoming epidermal stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011; 8:552–65.
- 86.** Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2014 May; 14(5):289-301.
- 87.** Sundberg JP, King LE. Mouse mutations as animal models and biomedical tools for dermatological research. *J Invest Dermatol*. 1996; 106(2): 368-76.
- 88.** Yannas IV. Similarities and differences between induced organ regeneration in adults and early foetal regeneration. *J. R. Soc. Interface*. 2005; 2:403-417.
- 89.** Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999 Sep 2; 341(10):738-46.
- 90.** Slemp AE, Kirschner RE. Keloids and scars: a review of keloids and scars, theirpathogenesis, risk factors, and management. *Curr Opin Pediatr*. 2006; 18: 396–402.
- 91.** Van der Veer WM, Bloemen MC, Ulrich MM, *et al*. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation. *Burns*. 2009 Feb; 35(1):15-29.
- 92.** Kørbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med*. 2003 Aug 7; 349(6):570-82.
- 93.** Barker N, Bartfeld S, Clevers H. Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell*. 2010 Dec 3; 7(6):656-70.
- 94.** Pelissier P. Physiologie de la cicatrisation. Cours. E-plastic.fr. Service de chirurgie plastique, esthétique et reconstructrice, centre F.X. Michelet, CHU de Bordeaux.
- 95.** Muthukumar T, Anbarasu K, Prakash D, Sastry TP. Effect of growth factors and pro-inflammatory cytokines by the collagen biocomposite dressing material containing

Macrotyloma uniflorum plant extract-In vivo wound healing. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 Sep 1; 121:178-88.

- 96.** Jetten N, Roumans N, Gijbels MJ, *et al.* Wound administration of M2-polarized macrophages does not improve murine cutaneous healing responses. *PLoS One*. 2014 Jul 28; 9(7):e102994.
- 97.** Verhaegen PD, van Zuijlen PP, Pennings NM, *et al.* Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis. *Wound Repair Regen*. 2009 Sep-Oct; 17(5):649-56.
- 98.** Ferguson MW, O'Kane S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004 May 29; 359(1445):839-50.
- 99.** Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, *et al.* Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011:969618.
- 100.** Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2014 Nov 6; 7:301-11.
- 101.** Wolfram D, Tzankov A, Pülzl P, Piza-Katzer H. Hypertrophic scars and keloids--a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management. *Dermatol Surg*. 2009 Feb; 35(2):171-81.
- 102.** Roseborough IE, Grevious MA, Lee RC. Prevention and treatment of excessive dermal scarring. *J Natl Med Assoc*. 2004 Jan; 96(1):108-16.
- 103.** Pasquereau A, Thélot B. Hospitalisations pour brûlures à partir des données du Programme de médicalisation des systèmes d'information, France métropolitaine 2011 et évolution depuis 2008. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire ; 2014. 8 p.
- 104.** Guéro S. Brûlures de l'enfant. EMC (Elsevier SAS, Paris), Pédiatrie, 4-113-D-10, 2000, 13 p.
- 105.** Bloemen MC, van der Veer WM, Ulrich MM, *et al.* Prevention and curative management of hypertrophic scar formation. *Burns*. 2009 Jun;35(4):463-75.
- 106.** Dufourq JB, Gall O. La brûlure de l'enfant : quelle prise en charge en pré-hospitalier ? Enseignement supérieur Médecins. Urgences 2003 ; p 75 – 84.
- 107.** Carsin H., Le Béver H., Bargues L., Stéphanazzi J. Brûlure. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Médecine d'urgence, 25-030-D-40, 2007.
- 108.** Deitch EA, Wheelahan TM, Rose MP, *et al.* Hypertrophic burn scars: analysis of variables. *J Trauma*. 1983 Oct; 23(10):895-8.

- 109.** Aarabi S, Longaker MT, Gurtner GC. Hypertrophic scar formation following burns and trauma: new approaches to treatment. *PLoS Med.* 2007 Sep; 4(9):e234.
- 110.** Juckett G, Hartman-Adams H. Management of keloids and hypertrophic scars. *Am Fam Physician.* 2009 Aug 1; 80(3):253-60.
- 111.** Arakawa M, Hatamochi A, Mori Y, *et al.* Reduced collagenase gene expression in fibroblasts from hypertrophic scar tissue. *Br J Dermatol.* 1996 May; 134(5):863-8.
- 112.** Su CW, Alizadeh K, Boddie A, Lee RC. The problem scar. *Clin Plast Surg.* 1998 Jul; 25(3):451-65.
- 113.** A. Le Touze, M. Robert, la cicatrisation et la cicatrice. Société française de chirurgie pédiatrique (www.chirpediatric.fr).
- 114.** Société Française d'Etude et de Traitement des Brûlures. Compression des brûlures. Référentiels et fiches de recommandations SFETB. 2012.
- 115.** Bruant-Rodier C. Cicatrisation et traitement des pertes de substances cutanées étendues. Appareil loco-moteur, DCEM1 2004/2005. Faculté de médecine de Strasbourg.
- 116.** Juhasz I, Kiss B, Lukacs L, *et al.* Long-term followup of dermal substitution with acellular dermal implant in burns and postburn scar corrections. *Dermatol Res Pract.* 2010; 2010:210150.
- 117.** Sahota PS, Burn JL, Heaton M, *et al.* Development of a reconstructed human skin model for angiogenesis. *Wound Repair Regen.* 2003 Jul-Aug; 11(4):275-84.
- 118.** MacNeil S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature.* 2007 Feb 22; 445(7130):874-80.
- 119.** Slack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science.* 2000 Feb 25; 287(5457):1431-3.
- 120.** Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968 Mar; 6(2):230-47.
- 121.** Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, *et al.* Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974 Apr; 17(4):331-40.
- 122.** Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, *et al.* Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood.* 1980 Aug; 56(2):289-301.
- 123.** Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991 Sep; 9(5):641-50.
- 124.** Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 2000 Jan 7; 100(1):157-68.

- 125.** Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005; 7(5):393-5.
- 126.** Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008 Sep; 8(9):726-36.
- 127.** Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec; 13(12):4279-95.
- 128.** Shih DT, Lee DC, Chen SC, *et al.* Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells*. 2005 Aug; 23(7):1012-20.
- 129.** Wang HS, Hung SC, Peng ST, *et al.* Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004; 22(7):1330-7.
- 130.** Seo BM, Miura M, Gronthos S, *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004; 364: 149-155.
- 131.** Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*. 2012 Jun 14; 10(6):709-16.
- 132.** Phinney DG, Sensebé L. Mesenchymal stromal cells: misconceptions and evolving concepts. *Cytotherapy*. 2013 Feb; 15(2):140-5.
- 133.** Crisan M, Yap S, Casteilla L, *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11; 3(3):301-13.
- 134.** Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, *et al.* A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res* 2008; 102: 77-85.
- 135.** Da Silva Meirelles L, Sand TT, Harman RJ, Lennon DP, Caplan AI. MSC frequency correlates with blood vessel density in equine adipose tissue. *Tissue Eng Part A* 2009; 15: 221-229.
- 136.** Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal Stem Cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu. Rev. Immunol.* 2013. 31:285-316
- 137.** Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*. 2000 Apr; 113 (Pt 7):1161-6.
- 138.** Lee CC, Christensen JE, Yoder MC, *et al.* Clonal analysis and hierarchy of human bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells. *Exp Hematol*. 2010 Jan; 38(1): 46-54.

- 139.** Sarugaser R, Hanoun L, Keating A, *et al.* Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. *PLoS One*. 2009 Aug 4; 4(8):e6498.
- 140.** Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, *et al.* Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 2007; 131: 324–336.
- 141.** Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*. 2011 July 8; 9(1), 11-15.
- 142.** Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*. 2013 Nov 15; 45:e54.
- 143.** Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002. 99:3838–43.
- 144.** Bartholomew A1, Sturgeon C, Siatskas M, *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002 Jan; 30(1):42-8.
- 145.** Meisel R, Zibert A, Laryea M, *et al.* Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004; 103:4619-21.
- 146.** Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105, 1815–1822.
- 147.** Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*. 2003; 76:1208–13.
- 148.** Prigione I, Benvenuto F, Bocca P, *et al.* Reciprocal interactions between human mesenchymal stem cells and $\gamma\delta$ T cells or invariant natural killer T cells. *Stem Cells*. 2009; 27:693–702.
- 149.** Selmani Z, Naji A, Zidi I, *et al.* Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008; 26:212–22
- 150.** Casiraghi F, Azzollini N, Cassis P, *et al.* Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *J Immunol*. 2008 Sep 15; 181(6):3933-46.
- 151.** Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2006 Aug 15; 177(4):2080-7.

- 152.** Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. 2009; 113:6576–83.
- 153.** Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*. 2008 Jan; 26(1):151-62.
- 154.** Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008 Feb 1; 111(3):1327-33.
- 155.** Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E (2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med.* 2009; 15:42-49.
- 156.** Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*. 2009 Feb; 94(2):258-63.
- 157.** Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Oct-Dec; 20(5-6):419-27.
- 158.** Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*. 2008; 3: e1886.
- 159.** Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001; 7: 211-228.
- 160.** Tsuji W, Rubin JP, Marra KG. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue Regeneration. *World J Stem Cells*. 2014 July 26; 6(3): 312-32.
- 161.** Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, *et al.* Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol*. 2006; 208: 64-76.
- 162.** Kern S, Eichler H, Stoeve J, *et al.* Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*; 2006; 24:1294-301.
- 163.** Pachón-Peña G, Yu G, *et al.* Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. *J Cell Physiol*. 2011; 226: 843-851.

- 164.** Stockmann P, Park J, von Wilmowsky C, *et al.* Guided bone regeneration in pig calvarial bone defects using autologous mesenchymal stem/progenitor cells—a comparison of different tissue sources. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* 2012; 40:310-20.
- 165.** Puissant B, Barreau C, Bourin P, *et al.* Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow-mesenchymal stem cells. *Br J Haematol.* 2005; 129:118-29.
- 166.** Krampera M. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. *Leukemia.* 2011 Sep; 25(9):1408-14.
- 167.** Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2010; 5:103-110.
- 168.** Rehman J, Traktuev D, Li J, *et al.* Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004; 109: 1292-1298.
- 169.** Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, *et al.* Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; 109:656-63.
- 170.** Lee HC, An SG, Lee HW, *et al.* Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: a pilot study. *Circ J* 2012; 76: 1750-1760.
- 171.** Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, *et al.* Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy.* 2014 Feb; 16(2):245-57.
- 172.** Kim WS, Park BS, Sung JH, *et al.* Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2007 Oct; 48(1):15-24.
- 173.** Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, *et al.* Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Apr; 29(4):503-10.
- 174.** Sultan SM, Barr JS, Butala P, *et al.* Fat grafting accelerates revascularisation and decreases fibrosis following thermal injury. *J Plast Reconstruct Aesthet Surg.* 2012; 65:219-27.
- 175.** Langmuir I. Oscillations in Ionized Gases. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1928; 14 (8): 627.
- 176.** Hoffman C, Berganza C, Zhang J. Cold atmospheric plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Medical Gas Research.* 2013; 3:21.

- 177.** Laroussi M. Plasma Medicine: low temperature plasma as a transformational technology for the healthcare field. Oral communication at MIPSE. 2012 Oct 10.
- 178.** Fridman G, Friedman G, Gutsol A, *et al.* Applied Plasma Medicine. *Plasma Process. Polym.* 2008; 5, 503–533.
- 179.** Chirokov A, Gutsol A, Fridman A. Atmospheric pressure plasma of dielectric barrier discharges. *Pure Appl. Chem.* 2005; 77: 487-495.
- 180.** Kong MG, Kroesen G, Morfill G, *et al.* Plasma medicine: an introductory review. *New journal of physics*, 2009; 11, 115012.
- 181.** Karakas E, Laroussi M. Experimental studies on the plasma bullet propagation and its inhibition. *J Appl. Phys.* 2010; 108, 063305.
- 182.** Isbary G, Morfill G, Schmidt HU, *et al.* A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *Br J Dermatol.* 2010 Jul; 163(1):78-82.
- 183.** Heinlin J, Isbary G, Stolz W, *et al.* Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2011; 25 (1), 1-11.
- 184.** Morfill G, Shimizu T, Steffes B, *et al.* Nosocomical infections—a new approach towards preventive medicine using plasmas. *New J. Phys.* 2009; 11, 115019.
- 185.** Soloshenko IA, Tsiolko VV, Khomich VA, *et al.* Sterilization of Medical Products in Low-Pressure Glow Discharges. *Plasma Physics Reports.* 2000; 26 (9), 792-800.
- 186.** Moisan M, Barbeau J, Moreau S, *et al.* Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int J Pharm.* 2001 Sep 11; 226(1-2):1-21.
- 187.** Laroussi M. Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: Review, analysis, and prospects. *Plasma Science, IEEE Transact.* 2002; 30 (4), 1409-1415.
- 188.** Hee Lee M, Joo Park B, Chang Jin S, *et al.* Removal and sterilization of biofilms and planktonic bacteria by microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. *New J. Phys.* 2009; 11, 115022.
- 189.** Dobrynin D, Fridman G, Friedman G, Fridman A. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J. Phys.* 2009; 11, 115020.
- 190.** Laroussi M, Leipold F. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry.* 2004; 233(1-3), 81-86.

- 191.** Mendis DA, Rosenberg M, Azam F. A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. *Plasma Science, IEEE Transact.* 2000; 28 (4), 1304-1306.
- 192.** Stoffels E, Sakiyama Y, Graves DB. Cold atmospheric plasma: Charged species and their interactions with cells and tissues. *Plasma Science, IEEE Transact.* 2008; 36(4), 1441-1457.
- 193.** Polk C. Biological applications of large electric fields: some history and fundamentals. *Plasma Science, IEEE Transact.* 2000; 28 (1), 6- 14.
- 194.** Kalghatgi S, Friedman G, Friedman A, Clyne AM. Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Ann Biomed Eng.* 2010 Mar; 38(3):748-57.
- 195.** Arjunan K, Clyne A. Hydroxyl radical and hydrogen peroxide are primarily responsible for Dielectric Barrier Discharge plasma-induced angiogenesis. *Plasma Process. Polym.* 2011; 8, 1154–1164.
- 196.** Kieft IE, Kurdi M, Stoffels E. Reattachment and apoptosis after plasma-needle treatment of cultured cells. *Plasma Science, IEEE Transact.* 2006; 34 (4), 1331-1336.
- 197.** Shashurin A, Keidar M, Bronnikov S. Living tissue under treatment of cold plasma atmospheric jet. *Appl. Phys. Lett.* 2008; 93, 181501.
- 198.** Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, *et al.* Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PLoS One.* 2011 Jan 21; 6(1):e16270.
- 199.** Haertel B, Straßenburg S, Oehmigen K, *et al.* Differential influence of components resulting from atmospheric-pressure plasma on integrin expression of human HaCaT keratinocytes. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:761451.
- 200.** Duval A, Marinov I, Bousquet G, *et al.* Cell death induced on cell cultures and nude mouse skin by non-thermal, nanosecond-pulsed generated plasma. *PLoS One.* 2013 Dec 16; 8(12):e83001.
- 201.** Wu AS, Kalghatgi S, Dobrynin D, *et al.* Porcine intact and wounded skin responses to atmospheric nonthermal plasma. *J Surg Res.* 2013 Jan; 179(1):e1-e12.
- 202.** Flanagan SP. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res.* 1966; Dec; 8(3):295-309.
- 203.** Pantelouris EM, Hair J. Thymus dysgenesis in nude (nu nu) mice. *J Embryol Exp Morphol.* 1970; 24(3):615-23.
- 204.** Pantelouris EM, Pringle CR. Interferon production in athymic nude mice. *J Gen Virol.* 1976; 32(1):149-52.

- 205.** Watts CJ, Hahn BL, Sohnle PG. Resistance of athymic nude mice to experimental cutaneous *Bacillus anthracis* infection. *J Infect Dis.* 2009; 199(5):673-9.
- 206.** Cheers C, Waller R. Activated macrophages in congenitally athymic “nude mice” and in lethally irradiate mice. *J. Immunol.* 1975; 115, 844-847.
- 207.** Wlodarski K, Morrison K, Rose NR. Effect of nu gene on the number of mast cells in lymph nodes. *Scand. J. Immunol.* 1982; 15, 105-112.
- 208.** Rygaard J, Povlsen CO. Athymic (nude) mice. In: *The Mouse in Biomedical Research.* Vol. IV. 1982. New York: Academic Press, pp 51-67.
- 209.** Møller Nielsen I, Heron I. Diet and immune response in nu/nu BALB/c mice. In: *Immune-Deficient-Animals.* 1984. Sordat B edition. Basel: Karger, pp 137-139.
- 210.** Ferrick DA, Sambhara SR, Chadwick BS, *et al.* The T-cell receptor repertoire is strikingly similar in older nude mice compared to normal adult mice. *Thymus.* 1989; 13(1-2):103-11.
- 211.** Lake JP, Pierce CW, Kennedy JD. CD8+ alpha/beta or gamma/delta T cell receptor-bearing T cells from athymic nude mice are cytolytically active in vivo. *J Immunol.* 1991; 147(4):1121-6.
- 212.** Lake JP, Pierce CW, Kennedy JD. T cell receptor expression by T cells that mature extrathymically in nude mice. *Cell Immunol.* 1991; 135(1):259-65.
- 213.** Kennedy JD, Pierce CW, Lake JP. Extrathymic T cell maturation. Phenotypic analysis of T cell subsets in nude mice as a function of age. *J Immunol.* 1992; 148(6):1620-9.
- 214.** Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock.* 2004; 22(5):460-6.
- 215.** Gawronska-Kozak B, Bogacki M, Rim JS, *et al.* Scarless skin repair in immunodeficient mice. *Wound Repair Regen.* 2006; 14(3):265-76.
- 216.** Ashcroft GS, Greenwell-Wild T, Horan MA, Wahl SM, Ferguson MW. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. *Am J Pathol.* 1999 Oct; 155(4):1137-46.
- 217.** Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007 Dec; 82(6):1375-81.
- 218.** Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One.* 2010 Apr 26; 5(4):e10088.

- 219.** Charbord P, Casteilla L. Human mesenchymal stem cell biology. *Med Sci (Paris)*. 2011 Mar; 27(3):261-7.
- 220.** Buechler C, Ritter M, Orsó E, *et al*. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol*. 2000 Jan; 67(1):97-103.
- 221.** Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol*. 2012 Jan 1; 188(1):21-8.
- 222.** Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol*. 2009 Mar; 10(3):241-7.
- 223.** Douglas WH. Functional role of periostin in development and wound repair: implications for connective tissue disease. *J Cell Commun Signal*. Jun 2008; 2(1-2): 9-17.
- 224.** Zhou HM, Wang J, Elliott C, *et al*. Spatiotemporal expression of periostin during skin development and incisional wound healing: lessons for human fibrotic scar formation. *J Cell Commun Signal*. 2010 Jun; 4(2):99-107.
- 225.** Zhao S, Wu H, Xia W, *et al*. Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts. *J Cardiol*. 2014 May; 63(5):373-8.
- 226.** Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Immunologie, le cours de Janis Kuby*. 2008. Edition Dunod. Chap. 16, 17.
- 227.** Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003 Feb 14; 299(5609):1057-61.
- 228.** Lau SK, Chu PG, Weiss LM. CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol*. 2004 Nov; 122(5):794-801.
- 229.** Jones S, Horwood N, Cope A, Dazzi F. 2007. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J. Immunol*. 179:2824-31
- 230.** Kronenberg M, Rudensky A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature*. 2005 Jun 2; 435(7042):598-604.
- 231.** Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *N Engl J Med*. 2014 Jan 30; 370(5):455-65.
- 232.** Thiagarajan M, Anderson H, Gonzales XF. Induction of apoptosis in human myeloid leukemia cells by remote exposure of resistive barrier cold plasma. *Biotechnol Bioeng*. 2014 Mar; 111(3):565-74.

- 233.** Seifert AW, Kiama SG, Seifert MG, Goheen JR, Palmer TM, Maden M. Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (Acomys). *Nature*. 2012 Sep 27; 489(7417):561-5.
- 234.** Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res*. 2007 Jan; 17(1):42-9.
- 235.** Silva J, Chambers I, Pollard S, Smith A. Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature*. 2006 Jun 22; 441(7096):997-1001.
- 236.** Hübner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fässler R, Werner S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine*. 1996 Jul; 8(7):548-56.
- 237.** Hoffmann C, Berganza C, Zhang J. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Med Gas Res*. 2013 Oct 1; 3(1):21.
- 238.** Pan Q, Fouraschen SM, de Ruiter PE, Dinjens WN, Kwekkeboom J, Tilanus HW, van der Laan LJ. Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2014 Jan; 239(1):105-15.
- 239.** Sánchez Alvarado A. La régénération, *biofutur*, 213, 48, Juillet 2001.
- 240.** Brockes JP, Kumar A, Velloso CP. Regeneration as an evolutionary variable. *J Anat*. 2001 Jul-Aug; 199:3-11.
- 241.** Thouveny Y. and Tassava R., Regeneration through Phylogenesis, Cellular and Molecular Basis of Regeneration, Ferretti, P. and Geraudie, J., Eds., Chichester: J. Wiley & Sons, 1997, pp. 9–43.
- 242.** Larson BJ, Longaker MT, Lorenz HP. Scarless fetal wound healing: a basic science review. *Plast Reconstr Surg*. 2010 Oct; 126(4):1172-80.
- 243.** Buchanan EP, Longaker MT, Lorenz HP. Fetal skin wound healing. *Adv Clin Chem*. 2009; 48:137-61.
- 244.** De Barros S, Dehez S, Arnaud E, *et al.* Aging-related decrease of human ASC angiogenic potential is reversed by hypoxia preconditioning through ROS production. *Mol Ther*. 2013 Feb; 21(2):399-408.

Summary

Title : Regenerative medicine strategies in a mouse model of burns wound healing.

Key words : Regeneration, scarring, mesenchymal stem cells, cold atmospheric plasma, burn, inflammation.

Scarring and regeneration are both repair processes observed in the animal kingdom, even though mammals always heal by a scar tissue formation that never restitute the initial tissue structure and properties.

Burns healing can become abnormal and may subsequently affect the person's daily life. Considering pathological healings, we developed innovative regenerative medicine strategies to reduce or redirect the wound healing process towards a better issue in a mouse model of skin burn.

First, we performed a cell therapy based on the administration of adipose mesenchymal stromal cells. Although the experiments showed promising *immunomodulatory* abilities, such cells failed to provide convincing results in our model of excessive burn healing.

The second intent was designed after findings from the first approach and knowledge from regenerative models. Deep skin burns were treated by cold atmospheric plasma. We found that plasma-treated lesions were repaired by a considerably diminished scar. Experiments showed that the plasma treatment resulted in almost nonexistent fibrosis through a reduction of inflammation and matrix deposition, emergence of regeneration follicles regeneration and a restitution of hypodermis.

In conclusion, cold atmospheric plasma significantly improves healing when applied on skin burns.

Author : Guillaume Perez

PhD director : Dr. Valérie Planat-bénard, PhD.

Institution : Toulouse University, STROMALab UMR5273 UPS/CNRS, U1031 Inserm, EFS.

AUTEUR : Guillaume Perez

TITRE : Stratégies de médecine « régénérative » dans un modèle murin de cicatrisation cutanée

DIRECTEUR DE THESE : Docteur Valérie Planat-Bénard

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE :
Salle des Thèses, faculté de médecine CHU Rangueil, le 17 juin 2015

RESUME

La cicatrisation et la régénération sont les deux processus de réparation observés dans le règne animal. Toutefois, les mammifères ne sont susceptibles de réparer une blessure que par la constitution d'une cicatrice qui ne restitue point la structure et les propriétés du tissu initial.

Dans un contexte de brûlure profonde, la cicatrisation, le plus souvent excessive, peut retentir négativement sur la vie de l'individu. A cette aune, nous nous sommes proposés de mettre au point des thérapies innovantes, dans un modèle murin de brûlure, dans le but de réduire ou de réorienter une réaction cicatricielle anormale.

La première stratégie était une thérapie cellulaire basée sur l'utilisation des cellules stromales mésenchymateuses du tissu adipeux. Bien que les études effectuées aient révélé des aptitudes *immunomodulatrices* encourageantes, l'utilisation de ces cellules n'a pas apporté de résultats probants pour prétendre combattre la cicatrisation excessive de notre modèle.

La seconde stratégie s'appuyait sur les enseignements tirés de la première approche et de la régénération animale. Les brûlures ont été traitées par des jets de plasma froid à pression atmosphérique. La prise en charge des lésions par ce nouvel outil entraîna singulièrement une diminution de la zone cicatricielle. Les expériences montrèrent que le plasma circonscrivit la cicatrisation par l'atténuation de l'inflammation et du dépôt matriciel subséquent ; il en résulta une fibrose dermique quasi-inexistante, l'émergence de follicules pileux en régénération et une récupération de l'hypoderme.

En conclusion, le plasma froid améliore significativement la cicatrisation des brûlures profondes.

TITLE

Regenerative medicine strategies in a mouse model of burns wound healing

MOTS-CLES

Régénération, cicatrisation, cellules stromales/souches mésenchymateuses, plasma froid à pression atmosphérique, brûlure, inflammation.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE

ED BSB : Physiopathologie

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

STROMALab UMR 5273 UPS/CNRS, U1031 Inserm, EFS.
CHU Rangueil - 1 avenue Jean Poulhès
Bat L1 2ème étage - 31400 TOULOUSE - FRANCE