

Analyse multi-échelles des propriétés biomécaniques de la peau de souris saine et malade

**B. LYNCH^a, S. BANCELIN^b, M.-C. SCHANNE-KLEIN^b,
C. BONOD-BIDAUD^c, F. RUGGIERO^c, J.-M. ALLAIN^a**

a. Laboratoire de Mécanique des Solides (LMS), École Polytechnique, 91120 Palaiseau

b. Laboratoire Optique et Biosciences (LOB), École Polytechnique, 91120 Palaiseau

c. Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL), 46 allée d'Italie, 69364 Lyon

Résumé :

La peau est un tissu complexe composé de 3 couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Le derme est responsable de la majeure partie des propriétés mécaniques de la peau. Une modification de la composition du derme entraîne ainsi des modifications drastiques du comportement mécanique de la peau, comme dans la maladie d'Ehlers-Danlos, qui se caractérise par une hyper-élasticité des tissus. Au niveau microstructural, le derme est composé essentiellement de matrice extracellulaire, formée pour la majeure partie d'un réseau désordonné de fibres de collagène. Pour élucider le lien exact entre organisation microstructurale et propriétés mécaniques de la peau, nous réalisons des essais de traction uniaxiaux in situ sous un microscope multiphoton avec détection du signal de génération de seconde harmonique. Ceci nous permet de suivre la réponse de la microstructure du tissu au cours de l'essai mécanique. Des paramètres quantitatifs ont été développés pour caractériser à la fois la réponse mécanique macroscopique du tissu et le réarrangement du réseau de fibres de collagène sous chargement. Nous pouvons ainsi comparer le comportement multi-échelles de peau de souris saine et de peau de souris atteinte d'une mutation affectant la microstructure du derme.

Abstract :

Skin is a complex multi-layered tissue, consisting of three main parts: the epidermis, the dermis and the hypodermis. The dermis is responsible for most of the complex mechanical properties of skin. Changes in its composition generally lead to drastic modifications of skin's mechanical properties, as in Ehlers-Danlos syndrome for instance, where skin is hyper-elastic. At the microscopic level the dermis consists for the greater part of extracellular matrix, compounded mainly of collagen fibres forming an orderless network. To elucidate the exact link between microstructural organisation and mechanical properties, we perform uniaxial tensile test on ex vivo mice skin in situ under a multiphoton microscope with second harmonic generation detection. This allows us to follow at the same time the mechanical response and the microstructural reorganisation in the depth of the tissue. Quantitative parameters have been developed to characterise both the mechanical properties and the collagen network rearrangement under loading. This method allows us to compare the multi-scale behaviour of skin from sane mice and from mice affected by a mutation of the dermis microstructure.

Mots clefs : biomécanique, peau, microstructure, collagène, microscopie

1 Introduction

La peau est un tissu complexe composé de plusieurs couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Le derme est le principal responsable des propriétés mécaniques complexes de la peau [1]. A petite échelle le derme est essentiellement constitué de matrice extracellulaire, elle-même composée majoritairement d'un réseau désordonné de fibres de collagène de type I, d'environ 50 nm de diamètre. Lorsque le derme est affecté par une mutation génétique modifiant sa microstructure, le comportement mécanique de la peau est altéré. Une mutation affectant la synthèse du collagène de type V est ainsi à l'origine du syndrome d'Ehlers-Danlos, dans lequel la génération d'un derme dégradé entraîne une hyper-élasticité de la peau [2].

La lignée de souris dite « peK » a été créée dans le contexte de l'étude de la pathologie d'Ehlers-Danlos, pour élucider le rôle d'un composant du derme pathologique, le collagène de type V sous forme homotrimère [3]. Concrètement, la mutation peK entraîne la déposition de petites fibrilles de collagène de type V, de diamètre inférieur à 10 nm, à la jonction entre l'épiderme et le derme. Aucun autre élément du derme n'est affecté par cette modification relativement simple.

Nous avons développé une méthode de caractérisation de la peau combinant les échelles macroscopique et microscopique. Nous soumettons des échantillons de peau de souris à des essais de traction uniaxiaux *in situ* sous microscope multiphoton avec détection du signal de génération de seconde harmonique (SHG). Ceci nous permet de quantifier à la fois les propriétés mécaniques macroscopiques de la peau et la réorganisation au niveau microstructural. Nous avons appliqué cette méthode à l'étude des propriétés mécaniques de peau de souris saines et de peau de souris peK, présentant une modification simple de la microstructure du derme.

2 Méthode

Nous soumettons des échantillons de derme *ex vivo* prélevés sur le dos de souris âgées d'un mois à un test de traction uniaxiale. L'imagerie étant impossible pendant la traction du fait des mouvements du tissu, le chargement se fait de manière incrémentale. Le déplacement est imposé et la force résultante est mesurée à l'aide de capteurs de force. La courbe contrainte - déformation obtenue est conforme à celle présentée dans la littérature [4], une courbe typique est présentée en figure 1 en noir. La courbe, appelée courbe « en J », présente un pied de courbe, une augmentation progressive du module tangent et une partie linéaire, avant la rupture. L'analyse des courbes contrainte - déformation permet de caractériser le comportement mécanique macroscopique de la peau. On mesure en particulier l'extension du pied de courbe et la rigidité du tissu à travers la pente de la partie linéaire, appelé module tangent.

Pour observer l'essai mécanique au niveau microscopique, nous réalisons l'essai *in situ* sous un microscope multiphoton avec un canal de détection du signal de génération de seconde harmonique. Avec cette technique nous sommes capables de visualiser la réorganisation des fibres de collagène directement dans le tissu. L'imagerie se fait en 3D et ne nécessite aucune préparation préalable de l'échantillon. La figure 2 présente les images obtenues avec cette technique pour une unique zone, imagée dans l'état initial et après déformation. L'analyse des images donne accès à des paramètres quantitatifs sur l'organisation microstructurale du derme, comme la proportion de fibres alignées dans la direction de traction, appelé paramètre d'orientation.

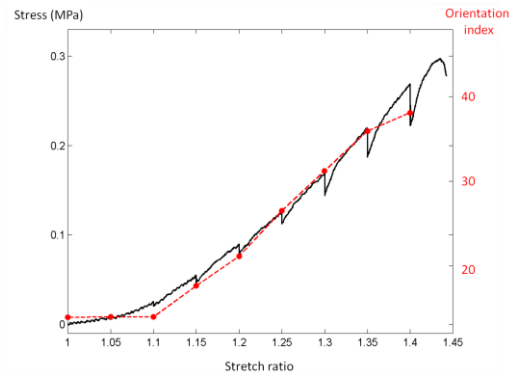


FIG. 1 – Contrainte (en noir) et paramètre d'orientation (en rouge) en fonction de la déformation pour un essai de traction uniaxiale sur peau de souris contrôlée âgée d'un mois.

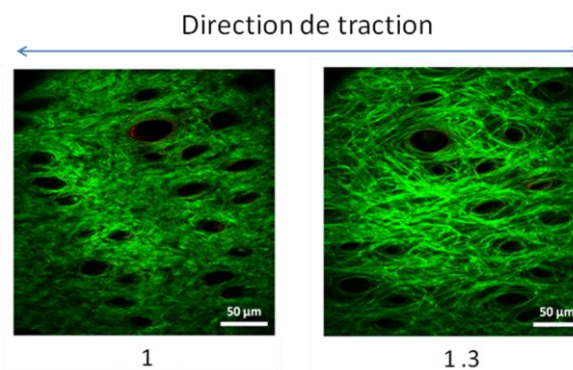


FIG. 2 – Images en génération de seconde harmonique de la même région d'un échantillon de peau dans l'état initial et dans l'état déformé (souris contrôlée âgée d'un mois). Les fibres de collagène apparaissent en vert. Les trous sont les follicules pileux. La barre d'échelle est de 50 µm.

3 Résultats et Discussion

L'imagerie SHG nous permet de visualiser les fibres de collagène dans la peau avec une résolution de l'ordre du micromètre. L'analyse du paramètre d'orientation, qui représente la proportion de fibres alignées dans la direction de traction, montre que la réorganisation des fibres de collagène est progressive tout au long de l'essai mécanique. L'évolution du paramètre d'orientation, en rouge sur la figure 1, décrit une courbe en J, qui suit de façon remarquable l'évolution de la contrainte. Ainsi, la contrainte est proportionnelle à la fraction de fibres alignées dans la direction de traction. Ce résultat diffère notamment de ce que l'on observe dans le tendon, où le pied de courbe est interprété comme le dépliement et la réorganisation des fibres de collagène et la partie linéaire comme l'extension de fibres totalement alignées.

L'analyse des courbes contrainte - déformation montre que la peau des souris peK est significativement plus rigide que celle des souris contrôles. Le module tangent moyen est 2.5 ± 0.1 MPa pour les souris peK au lieu de 1.6 ± 0.2 MPa pour les contrôles. Ceci est cohérent avec l'augmentation de la viscosité du derme, induit par la synthèse de petites fibrilles de collagène V.

Au niveau microscopique, le paramètre d'orientation augmente moins rapidement lors de l'essai pour les souris peK que pour les souris contrôles. La pente moyenne de la partie linéaire de la courbe indice d'orientation - déformation vaut 79 ± 3 pour les souris contrôles, 59 ± 5 pour les peK. Concrètement, les fibres ont plus de difficulté à s'aligner dans les souris peK. Il est probable que les

fibrilles de collagène V gênent les fibres de collagène I dans leurs déplacements, ce qui ralentit l'augmentation du nombre de fibres de collagène I alignées.

Enfin, le pied de courbe est significativement plus long pour les souris mutantes : d'un pied de courbe de 0.15 ± 0.01 (élongation) pour les contrôles, on atteint 0.22 ± 0.01 pour les peK. Le pied de courbe peut être attribué au flambage et au repliement des fibres de collagène I orientées initialement perpendiculairement à la traction, comme cela a été observé sur gels de collagène par exemple [5]. Les fibrilles de collagène V, en gênant le déplacement des fibres transverses, semblent également responsables de l'augmentation de la longueur du pied de courbe.

Une modification simple et de faible envergure de la microstructure du derme, telle que la mutation peK, entraîne des changements importants et très significatifs des propriétés mécaniques du derme. En observant à la fois la microstructure et le comportement mécanique on peut, pour une mutation simple, faire la liaison entre les changements aux deux échelles.

4 Conclusion

Notre approche combine essais mécaniques sur peau de souris et observation de la microstructure grâce à l'imagerie de génération de seconde harmonique. Grâce aux paramètres quantitatifs développés, nous pouvons mettre en relation les échelles macroscopique et microscopique. En particulier, pour une modification simple de la microstructure de la peau, il devient possible de comprendre les mécanismes qui relient ces deux échelles.

Cet outil peut être généralisé pour étudier d'autres modifications pathologiques de la synthèse du collagène, ainsi que l'impact de l'âge ou de cicatrices sur le comportement multi-échelles de la peau. L'implémentation d'autres essais mécaniques, comme un chargement biaxial ou cyclique, permettra d'apporter une perspective multi-échelles à l'exploration d'autres propriétés du tissu, comme son anisotropie ou sa viscoélasticité.

Références

- [1] Y. Fung, *Biomechanics - Mechanical properties of Living Tissues*, Springer-Verlag, 1993
- [2] H. Chanut-Delalande, C. Bonod-Bidaud, S. Cogne, M. Malbouyres, F. Ramirez, A. Fichard, F. Ruggiero, Development of a Functional Skin Matrix Requires Deposition of Collagen V Heterotrimers, *Molecular and Cellular Biology* (2004) vol. 24 6049-6057
- [3] C. Bonod-Bidaud, M. Roulet, U. Hansen, A. Elsheikh, M. Malbouyres, S. Ricard-Blum, C. Faye, E. Vaganey, P. Rousselle, F. Ruggiero, *In Vivo* Evidence for a Bridging Role of a Collagen V Subtype at the Epidermis-Dermis Interface, *Journal of Investigative Dermatology* (2012) vol. 132 1841-18492
- [4] P.Tong, Y. Fung, The stress-strain relationship for skin, *Journal of Biomechanics* (1976) vol. 9 649-657
- [5] D. Vader, A. Kabla, D. Weitz, L. Mahadevan, Strain-Induced Alignment in Collagen Gels, *PLoS ONE* (2009) vol. 4