

DANIELLE LAROUCHE

**CARACTÉRISATION DES CELLULES SOUCHES
PRÉSENTES DANS LES FOLLICULES PILEUX ET
ANALYSE DE LEUR POTENTIEL DE
DIFFÉRENCIATION *IN VIVO* ET *IN VITRO* À L'AIDE
DE PEAUX RECONSTRUITES PAR GÉNIE
TISSULAIRE**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

DÉPARTEMENT DE CHIRURGIE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2005

© Danielle Larouche, 2005

Résumé

Les cellules souches sont à la base de la régénération des tissus adultes et du maintien de leur homéostasie. Afin d'étudier le processus de différenciation des cellules souches cutanées et d'approfondir nos connaissances sur les conditions qui contrôlent leur différenciation en épiderme et/ou en follicules pileux *in vitro*, différents substituts cutanés ont été mis au point par génie tissulaire. D'une part, la portion dermique des peaux reconstruites a été produite par la superposition de feuillets de matrice extracellulaire produits par des fibroblastes humains ou murins cultivés en présence d'acide ascorbique. D'autre part, des kératinocytes (humains ou murins) ou des follicules pileux immatures (murins) ont été implantés sur les dermes reconstruits. Les propriétés histologiques et immunohistochimiques des tissus ont été évaluées après leur maturation *in vitro* ou sur l'animal. Nos résultats ont révélé que les interactions mésenchyme-épithéliales créées dans la peau reconstruite par génie tissulaire influencent significativement la voie de différenciation qu'empruntent les kératinocytes engendrés par les cellules souches et qu'il est possible, en recréant les conditions adéquates, de reconstruire des substituts cutanés aux propriétés histologiques similaires à la peau native ainsi que des peaux reconstruites capables de soutenir la formation de follicules pileux après la greffe. Des études *in situ* ont également été menées sur les cellules souches de la vibrisse de la souris. Nous avons observé que les kératinocytes présentant un cycle cellulaire long forment deux populations distinctes dans la région du renflement : une est en contact avec la membrane basilaire et l'autre ne l'est pas (appelée Bs1). Chacune de ces populations possède un aspect histologique distinct et présente une organisation du réseau de kératine qui lui est spécifique et qui est associée à l'expression de kératines particulières. L'étude des vibrisses des souris dont le gène de la kératine 17 (K17) a été invalidé a révélé que la K17 est essentielle à la formation des vibrisses et à l'intégrité ultrastructurale des cellules Bs1. En conclusion, mes travaux apportent de nouvelles données sur les conditions qui régissent la différenciation des cellules souches cutanées et sur les caractéristiques intrinsèques des cellules souches de la vibrisse.

Abstract

Given the importance of post-natal stem cells in tissue homeostasis and for therapeutic applications, characterizing their intrinsic features and defining conditions controlling their differentiation lineage commitment are of great interest. In the present thesis, we studied skin stem cells within different three-dimensional interstitial tissue contexts: tissue-engineered reconstructed skins and the bulge region of the vibrissae follicle. The reconstructed skins were made by culturing keratinocytes on superimposed coherent sheets of extracellular matrix obtained after culturing fibroblasts with ascorbic acid. In order to create conditions allowing stem cells to generate epidermis as well as hair follicles, different reconstructed were designed from mouse or human cutaneous cells. Our models revealed that epithelial-mesenchymal interactions recreated in skin reconstructed by tissue engineering have a significant impact on the differentiation lineage commitment of stem cells. Within the bulge region of the vibrissae follicle, we identified two different populations presenting the stem cell-associated slow-cycling property. In addition to stem cells localized in the basal layer, label-retaining cells were also shown to be present in the suprabasal layers, detached from the basement membrane surrounding the outer root sheath of the hair follicle. These two label retaining cell populations displayed distinct microarchitecture reflected in terms of histological features, keratin composition, filament density and organization. Further evidence that keratin 17 is responsible for the phenotype of Bs1 cells comes from keratin 17 null mice in which Bs1 population exhibited an altered keratin network and also lack a vibrissae hairs indicating that keratin 17 is essential for vibrissae integrity.

Altogether, my works bring additional findings about the conditions that govern stem cell differentiation toward epidermal or follicular lineage. Furthermore, I defined a peculiar cell population presenting close contact with follicular stem cells in which keratin 17 plays a crucial role.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, le Dr Lucie Germain. Dès la première rencontre, elle m'a fait confiance et m'a laissé la liberté de m'approprier des idées et de mener à terme mon projet de Doctorat, tout en me procurant plusieurs opportunités de dépassement. Elle fut et est encore pour moi un exemple de détermination. J'ai assouvi lors mon doctorat une grande créativité qui m'a permis de grandir énormément et cela a été possible en partie grâce à elle.

Un laboratoire de recherche n'existerait pas sans les gens qui ont pris le risque de se fier à leur instinct et de développer leurs idées avec audace comme l'a fait le Dr. François A. Auger. Au cours de mes 6 années d'études passées au LOEX, j'ai assisté à la remarquable expansion de ce laboratoire qui est devenu un endroit dans lequel il est fort agréable de travailler.

Je voudrais remercier le Dr Pierre A. Coulombe. Il est un brillant exemple de réussite académique et m'a beaucoup inspiré. L'étroite collaboration et l'engagement du Dr. Coulombe et de son étudiante Xumei Tong ont permis de mener à terme le projet vibrante et je leur exprime toute ma gratitude.

Puisqu'un milieu de recherche est enrichissant grâce aux personnes qui y travaillent, mes remerciements s'adressent à l'équipe du LOEX d'hier et d'aujourd'hui. Plus particulièrement à Véronique Couture, Marie-Claude Miousse, Claudia Fugère, Anne-Marie Moisan, Roxane Pouliot, Kristine Cuffley, Catherine Bissonnette et Israël Martel, les assistants de recherche et étudiants qui ont participé à mon projet. Je me suis fait au LOEX de nombreux amis : Yan Grimard, Patrick Carrier, Valérie Hudon, Marie-Hélène Rochon, Guillaume Grenier, Anne-Marie Belzil et Robert Gauvin. Merci d'avoir été là et d'avoir fait en sorte qu'il fût, même dans les moments plus difficiles, toujours agréable de venir au laboratoire.

Un merci particulier s'adresse à Julie Fradette une travailleuse acharnée qui a toujours été là pour me guider, à Aristide Pusterla qui m'a attendu un certain jour où

l'université avait dû fermer à cause d'une tempête afin de traiter mes lames. Les résultats que j'ai obtenus suite à ces travaux sont à l'origine de tout le projet vibrisse. J'exprime également ma gratitude à mes collègues Robert Gauvin et Claudie Paquet qui ont porté un regard critique sur le manuscrit de ma thèse dans sa version préliminaire.

Je témoigne toute ma reconnaissance à mes juges de thèse. Tout d'abord, merci au Dr François A. Auger, qui en plus de prendre part au comité d'évaluation, a accepté de faire la prélecture de ma thèse. Ensuite, mes remerciements s'adressent au Dr Normand Marceau qui s'est intéressé à mes travaux tout au long de mon cheminement. Finalement, merci à Dr. Jean-François Beaulieu qui a accepté le rôle d'évaluateur externe.

Merci aux organismes subventionnaires : les Instituts de Recherche en Santé du Canada et le Fonds de Recherche en Santé du Québec, qui rendent possibles les études graduées au Québec.

Finalement, pour leur amour et leur admiration qui furent le moteur de mon bien-être, je ne passerais jamais sous silence la contribution de Lise, Jean-Robert, Martin et Jean-Pierre, les êtres merveilleux qui forment ma famille. Je salue mes fidèles amis de bacc : Jo, Jules, Jeff, Nadine et Karine, car on a toujours besoin de vrais amis. J'exprime toute ma gratitude et mon amour à Stan, qui est mon complice, mon ami et mon époux, et qui m'accorde un soutien constant. En plus de mon doctorat, il ne faut pas oublier que pendant ces années d'études, une aventure se tenait en parallèle. L'aventure que j'ai menée avec Stan et qui a fait de nous des parents, soit la « génèse » de notre magnifique petit Matéo qui a donné le plus grand sens à ma vie. Merci.

*À mon père qui fut le premier à assouvir ma
quête de réponses*

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	ii
Remerciements.....	iii
Table des matières	vi
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations et termes français correspondants	xiii

CHAPITRE I INTRODUCTION GÉNÉRALE.....1

I.1 PROBLÉMATIQUE D'ENSEMBLE	1
I.2 CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DE LA PEAU ET DE SES ANNEXES	5
I.2.1 L'ÉPIDERME : UN ÉPITHÉLIUM PAVIMENTEUX STRATIFIÉ KÉRATINISÉ.....	5
I.2.1.1 Les principaux constituants de l'épiderme	6
I.2.1.1.1 Kératinocytes, cellules de Langerhans et mélanocytes.....	6
I.2.1.1.2 Les cellules de Merkel	7
I.2.1.1.3 Les desmosomes et les jonctions adhérentes.....	8
I.2.1.1.4 Les intégrines.....	9
I.2.1.1.5 La membrane basilaire et les hémidesmosomes	9
I.2.2 LE DERME : PLUS QU'UN TISSU DE SOUTIEN	10
I.2.2.1 Les principaux constituants du derme.....	10
I.2.2.2 Les interactions mésenchyme-épithélium.....	11
I.2.3 L'APPAREIL PILO-SÉBACÉ	12
I.2.3.1 La structure du follicule pileux.....	12
I.2.3.1.1 Les différents compartiments de différenciation du follicule pileux	14
I.2.3.1.2 La glande sébacée	17
I.2.3.1.3 La papille dermique : une population fibroblastique très particulière	17
I.2.3.2 La vibrisse: un poil hautement spécialisé chez le mammifère	18
I.3 LA FORMATION DE LA PEAU ET DES POILS	19
I.3.1.1 La formation et le cycle du poil.....	19
I.3.1.1.1 Le cycle du poil	21
I.3.1.1.2 La régulation du développement et du cycle du poil	22
I.3.1.1.3 La transition télogène-anagène.....	24
I.3.1.1.4 Les particularités du cycle cellulaire de la vibrisse.....	25

I.3.1.1.5	La transition télogène-anagène de la vibrisse.....	27
I.4	LES CELLULES SOUCHES	27
I.4.1	DÉFINITIONS DES DIFFÉRENTS TYPES DE CELLULES SOUCHES	27
I.4.2	LES CELLULES SOUCHES CUTANÉES.....	28
I.4.2.1	Les cellules souches épithéliales cutanées.....	29
	Caractéristiques des cellules souches épithéliales cutanées	30
I.4.2.2.....		30
I.4.2.2.1	La spécification du caractère « souche »: le concept de la niche.....	30
I.4.2.2.2	Autorenouvellement et division asymétrique.....	31
I.4.2.2.3	La dynamique de division des cellules souches	35
I.4.2.2.4	Multipotentialité.....	38
I.4.2.2.5	Le caractère peu différencié	40
I.4.2.3	Identification des cellules souches cutanées.....	40
I.4.2.4	L'engagement des cellules souches cutanées dans le processus de différenciation.....	41
I.4.2.4.1	La voie Wnt : un élément clé dans la régulation du destin des cellules souches cutanées.....	41
I.4.2.4.2	Les gènes ciblés par la voie de signalisation Wnt : implication de c-myc dans la différenciation des cellules souches de la peau	47
I.5	LES CHANGEMENTS ASSOCIÉS AUX PROCESSUS DE DIFFÉRENCIATION TERMINALE DE LA PEAU.....	48
I.5.1	LES CHANGEMENTS ASSOCIÉS AUX PROCESSUS DE DIFFÉRENCIATION TERMINALE DE L'ÉPIDERME.....	48
I.5.1.1.1	Les principaux évènements caractérisant la différenciation terminale des kératinocytes épidermiques	48
I.5.1.1.2	La régulation de la différenciation de l'épiderme.....	49
I.5.2	LES CHANGEMENTS ASSOCIÉS AUX PROCESSUS DE DIFFÉRENCIATION TERMINALE DU FOLLICULE PILEUX.....	51
I.5.2.1.1	La tige du poil: la différenciation du cortex et de la cuticule.....	51
I.5.2.1.2	La différenciation de la gaine folliculaire interne (IRS).....	53
I.6	LES KÉRATINES : FILAMENTS INTERMÉDIAIRES DES CELLULES ÉPITHÉLIALES.....	54
I.6.1.1	Structure des kératines	55
I.6.1.2	Expression différentielle des kératines	56
I.6.1.3	Les kératines : différentes protéines affectées à différentes fonctions.....	58

I.6.1.3.1	Le niveau d'organisation du cytosquelette de kératines	58
I.6.1.3.2	Les propriétés mécaniques des kératines	59
I.6.1.3.3	La participation des kératines à la régulation d'évènements cellulaires.....	62
I.6.1.4	La kératine 19 : une kératine exprimée par les cellules souches cutanées aux propriétés particulières.....	63
I.6.1.4.1	La distribution de la kératine 19.....	63
I.6.1.4.2	La fonction de la kératine 19	65
I.6.1.5	La kératine 17 : une kératine de contextes spéciaux	66
I.7	LE GÉNIE TISSULAIRE	67
I.7.1	LA PEAU RECONSTRuite PAR GÉNIE TISSULAIRE	68
I.7.2	LA CULTURE DES CELLULES CUTANÉES HUMAINES PAR RAPPORT AUX CELLULES MURINES	72
I.7.3	L'ÉTUDE DE LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES CUTANÉES PAR GÉNIE TISSULAIRE.....	72
I.8	OBJECTIFS DES TRAVAUX	74

CHAPITRE II PEAU HUMAINE RECONSTRuite IN VITRO GREFFÉE SUR LA SOURIS ATHYMIQUE **77**

II.1	RÉSUMÉ	78
II.2	RECONSTRUCTED HUMAN SKIN PRODUCED IN VITRO AND GRAFTED ON ATHYMIC MICE	80

CHAPITRE III LA COMPOSITION DU DERMIS À L'INTÉRIEUR D'UNE PEAU RECONSTRuite PAR GÉNIE TISSULAIRE INFLUENCE LA VOIE DE DIFFÉRENCIATION DES CELLULES SOUCHES DU POIL **103**

III.1	RÉSUMÉ.....	104
III.2	THE DERMIS COMPOSITION WITHIN A RECONSTRUCTED SKIN INFLUENCES THE DIFFERENTIATION LINEAGE OF HAIR FOLLICLE STEM CELLS	105

CHAPITRE IV DEUX POPULATIONS DE CELLULES SOUCHES ÉPITHÉLIALES SE DISTINGUANT PAR L'EXPRESSION ET L'ORGANISATION DES KÉRATINES SONT PRÉSENTES DANS LA VIBRISSE..... **137**

IV.1	RÉSUMÉ	138
-------------	---------------------	------------

IV.2 KERATIN PROFILING DEFINES DISTINCT POPULATIONS OF PRESUMPTIVE EPITHELIAL STEM CELLS IN THE VIBRISSAE HAIR BULGE	139
---	------------

CHAPITRE V DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION 178

Un modèle unique de peau reconstruite humaine pour le traitement des blessures cutanées profondes	179
La mise au point d'une peau reconstruite permettant d'étudier la différenciation des cellules souches en follicule pileux	184
Deux populations de cellules souches distinctes au sein de la vibrisse	189
La kératine 19: spécifique aux cellules souches basales des poils	191
Nouvelles données sur la fonction de la kératine 17	193
CONCLUSION GÉNÉRALE	196

ANNEXE I. NORMAL HUMAN MERKEL CELLS ARE PRESENT IN EPIDERMAL CELL POPULATIONS ISOLATED AND CULTURED FROM GLABROUS AND HAIRY SKIN SITES... .. 198

ANNEXE II. KERATIN 19 AS A STEM CELL MARKER IN VIVO AND IN VITRO..... 199

ANNEXE III. CHARACTERIZATION OF A 150 KDA ACCESSORY RECEPTOR FOR TGF-B1 ON KERATINOCYTES: DIRECT EVIDENCE FOR A GPI ANCHOR AND LIGAND BINDING OF THE RELEASED FORM..... 200

ANNEXE IV. TISSUE REORGANIZATION IN RESPONSE TO MECHANICAL LOAD INCREASES FUNCTIONALITY 201

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 202

Liste des tableaux

Tableau I-1 La terminologie des différents types de poils de la souris et de l'humain.....	13
Tableau I-2 Les principaux marqueurs des cellules souches cutanées	42
Tableau I-3 La famille des protéines associées aux kératines des poils (KAP)	52
Tableau I-4 Les différents groupes de la famille des filaments intermédiaires.....	55
Tableau I-5 Expression différentielle des kératines dans la peau et les différents tissus.....	57
Tableau I-6 Classification des blessures cutanées en fonction de leur profondeur	70

Liste des figures

Figure I-1 Représentation schématique de l'épiderme et coupe histologique de la peau colorée au trichrome de Masson.....	5
Figure I-2 Les compartiments de différenciation de l'appareil pilo-sébacé.....	15
Figure I-3 Ultrastructure des cellules qui composent les poils (vibrisse et pelage).....	16
Figure I-4 La formation et le cycle du poil (pelage).....	21
Figure I-5 Schématisation de la voie de signalisation Wnt.....	23
Figure I-6 Les changements morphologiques associés au cycle cellulaire de la vibrisse....	26
Figure I-7 Schématisation du concept de la niche.....	30
Figure I-8 Le concept de division asymétrique.....	32
Figure II-1 Macroscopic analysis of reconstructed human skin matured <i>in vitro</i>	88
Figure II-2 Macroscopic analysis of reconstructed human skin matured <i>in vivo</i>	89
Figure II-3 Histological analysis of reconstructed human skin matured <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	90
Figure II-4 Basement membrane and dermal organization sustaining the mechanical properties.....	92
Figure II-5 Dermal composition of reconstructed human skin matured <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	94
Figure II-6 Ultrastructural analysis of the reconstructed human skin matured <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	94
Figure III-1 Macroscopic and microscopic analysis and detection of the endogenous alkaline phosphatase activity of reconstructed skins after grafting on athymic mice	115
Figure III-2 Keratin 10 and loricrin expression analysis of reconstructed skins 1,5 months after grafting.....	118
Figure III-3 Lef1 and β -catenin expression within reconstructed skins matured <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	119
Figure III-4 Characterization of histological and phenotypic properties of reconstructed skins cultured <i>in vitro</i>	122
Figure III-5 Influence of the fibroblast composition of the reconstructed dermis on the thickness of the epidermis and western blot analysis of hK6irs1 expression in reconstructed skins cultured <i>in vitro</i>	124

Figure IV-1 Putative stem cells of the vibrissae follicle	149
Figure IV-2 Keratin expression in rodent vibrissae follicles.....	153
Figure IV-3 Re-emergence of K14 in Bb and Bs1 cells in vibrissae bulges explanted ex vivo	155
Figure IV-4 Keratin filament ultrastructural organization of vibrissae follicle.....	157
Figure IV-5 Keratin expression in the vibrissae follicles of K17 null mouse	159
Figure IV-6 Keratin filament organization of K17-/- vibrissae follicle	161

Liste des abréviations et termes français correspondants

* Les termes anglais sont en italiques.

ADN : *a*cide *d*ésoxyribonucléique
AP-1 : *a*ctivation *p*rotein-1
ARN: *a*cide ribonucléique
ARNm : *a*cide ribonucléique *m*essenger
Bb : *b*ulge *b*asal
bK: *b*ulge *k*eratinocyte/kératinocytes de la région du renflement
BM : *b*asement *m*embrane/membrane basilaire
BMP : *b*one *m*orphogenic *p*rotein
BMPRIa : *B*mp *r*ecceptor *1a*
BPAG : *b*ullous *p*emphigoid *a*ntigen/Antigène de la pemphigoïde bulleuse
Bs1: *b*ulge *s*uprabasal *1*
Bs2: *b*ulge *s*uprabasal *n* *2*
BrdU : *b*romo-2'-*d*eoxy-*U*ridine
CDP : *C*CAAT *d*isplacement *p*rotein
Ch : *c*uticle of the *h*air shaft/cuticule du cortex
Ci : *c*uticle of the *I*RS/ cuticule de la gaine folliculaire interne
Cl : *c*ompanion *l*ayer/couche compagne
Co : *c*ortex/cortex
DEPC: *d*iethylpyrocarbonate
DLK : *d*ual *l*eucine *z*ipper *k*inase
DME: *D*ulbecco-*V*ogt *m*odification of *E*agles *m*edium
DNA : *d*eoxyribonucleic *a*cid/acide désoxyribonucléique
Dsh : *D*ishevelled
DTAF: *f*luorescein *d*ichlorotriazine
eAP : *e*ndogenous *a*lkaline *p*hosphatase
EBS : *e*pidermolysis *b*ullosa *s*implex
EC : *e*mbryonal *c*arcinoma/carcinome embryonnaire
ECM : *e*xtracellular *m*atrix/matrice extracellulaire
EG : *e*mbryonic *g*erm/germinale embryonnaire
EGF: *e*pidermal *g*rowth *f*actor
eK: *e*pidermal *k*eratinocyte/kératinocyte épidermique
ES : *e*mbryonic *s*tem/souche embryonnaire
FCS: *f*etal *c*alf *s*erum/sérum de veau foetal
FGF: *f*ibroblast *g*rowth *f*actor

FI : filament intermédiaire
FITC : fluorescein isothiocyanate
FPI : follicule pileux immature
FSC : *forward scatter*
Fz : *Frizzled*
GFP : *green fluorescent protein*
GM : *glassy membrane*/membrane vitrée
GPI : *glycosylphosphatidylinositol*
GSK-3 : *glycogen synthase kinase-3*
He : *Henle's layer*/couche de Henlé
HFB : *hair follicle bud*/bourgeon folliculaire
hFS : *human fibroblast sheets*/feuillet de fibroblastes humains
Hgf : *hepatocyte growth factor*
HLA : *human leukocyte antigen*
Hox : *Homeobox*/Homéobox
Hu : *Huxley's layer*/couche de Huxley
IF : *intermediate filament*/filament intermédiaire
IFAP : *intermediate filament associated protein*/protéine associée aux filaments intermédiaires
iK : isolated keratinocytes
IL-1 : *interleukin-1*/interleukine-1
IRS : *inner root sheath*/gaine folliculaire interne
K : *keratin*/kératine
KAP : *keratin associated protein*/protéine associée au kératine
kDa : *kilo Dalton*
KGF : *keratinocyte growth factor*
Lef1 : *lymphoid enhancer factor-1*
LRC : *label-retaining cell*/cycle cellulaire long
LOEX : *Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale*
MAPKK : *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*
Me : *medulla*/Moelle
Mel : *melanin*/mélanine
mFS : *murin fibroblast sheets*/feuillet de fibroblastes murins
MLK : *mixed-lineage kinase*
mRNA : *messenger ribonucleic acid*
NGF : *nerve growth factor*
ORS : *outer root sheath*/gaine folliculaire externe
PBS : *phosphate buffer saline*/tampon phosphate physiologique

PI-3K : *phosphatidylinositol-3 kinase*
PKC : *protein kinase C/Protéine kinase C*
PR : *peau reconstruite*
pRb : *retinoblastoma protein/protéine du rétinoblastome*
RHS : *reconstructed human skin/peau reconstruite humaine*
Shh : *sonic hedgehog*
siRNA : *small interfering RNA*
SSC : *side scatter*
Tcf : *T-cell factor*
TGase : *transglutaminase/ transglutaminase*
TGF-β : *transforming growth factor-β*
Th : *thrychohyalin granule/granule de trychohyaline*
TNF : *tumor necrosis factor*
TNFR2 : *TNF receptor 2*
TOPGAL : *Lef1/Tcf optimal promoter β-galactosidase*
TPA : *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*
TRADD : *TNF receptor type-1 associated death domain*
TRE : *Tetracycline-responsive regulatory element*
TUNEL : *terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling*
vs : *versus*

Chapitre I Introduction générale

I.1 Problématique d'ensemble

En apparence simple, la peau est un organe spécialisé formé de plusieurs types cellulaires et annexes qui lui permettent d'accomplir de multiples fonctions. La peau sépare et protège l'organisme interne de l'environnement et elle est l'interface qui renseigne sur le monde extérieur. De plus, l'aspect de la peau influence la construction de la personnalité et le succès des liens sociaux. Considérant l'impact d'une altération de la peau ou des cheveux sur l'intégrité d'un être humain, il n'est pas étonnant que des sommes considérables soient investies chaque année dans le développement des soins cosmétiques ou de tissus cutanés de remplacement à des fins de greffe.

Les cellules souches cutanées sont à la base de la production et de la régénération de la peau et des poils. Les cellules souches, de la peau velue, résident dans le follicule pileux. Elles engendrent les cellules épithéliales composant le poil et les glandes sébacées qui y sont annexées ainsi que les cellules de l'épiderme interfolliculaire. Ce projet porte sur la caractérisation des cellules souches cutanées afin d'évaluer leur potentiel de différenciation à des fins de reconstruction tissulaire.

En effet, l'intérêt suscité par la reconstruction d'organes en laboratoire par génie tissulaire est en plein essor. Ce domaine de recherche a une double finalité: thérapeutique et fondamentale. Thérapeutique, puisque le génie tissulaire vise la production en laboratoire de tissus de rechange à partir de cellules prélevées chez un patient; cette approche peut remédier de façon significative au manque de tissus de remplacement pour les greffes autologues, voire même allogéniques. Fondamentale, car les modèles tridimensionnels de culture, offerts par le génie tissulaire, permettent d'étudier les interactions modulant la vie cellulaire dans un environnement plus représentatif de la réalité.

Les travaux présentés dans le cadre de cette thèse avaient d'abord pour objectif de fournir un environnement matriciel tridimensionnel favorable aux cellules souches cutanées, afin d'étudier leur potentiel de différenciation en follicule pileux ou en d'autres types cellulaires. D'autre part, l'évaluation du rôle du tissu mésenchymateux dans la coordination de ces phénomènes était aussi l'un des buts recherchés. En effet, plusieurs questions demeurent sans réponse quant à la façon dont le mésenchyme influence la différenciation des cellules souches épithéliales. Est-ce que les variations morphologiques de la peau, selon le site anatomique ou l'espèce animale, sont liées au type cellulaire ou dépendent plutôt d'interactions entre le tissu épithélial et le tissu mésenchymateux? Quelles sont les raisons causant l'absence des annexes en culture; les interactions mésenchyme-épithéliales inadéquates ou l'absence de populations cellulaires particulières? Est-ce que les cellules souches sont conservées en culture et est-ce que leur nombre influence la qualité du tissu? Est-ce que les conditions de culture permettent une régulation correcte des cellules souches vers la voie de différenciation du follicule pileux? Comment est organisé l'environnement tridimensionnel des cellules souches *in situ*? Quelles caractéristiques histologiques et biochimiques définissent les cellules souches?

La relation entre des cellules épithéliales cutanées et des fibroblastes entourés de leurs produits de sécrétion, a été étudiée dans un modèle de peau reconstruite par génie tissulaire, dans le but de fournir des réponses à ces questions et de mieux comprendre les interactions permettant la différenciation des cellules souches cutanées en follicule pileux. Des cellules provenant de différentes sources plus ou moins riches en cellules souches

(épiderme de sujets nouveau-nés ou adultes humains, épiderme de souris, follicules pileux de souris, derme humain, derme murin) furent utilisées dans l'objectif d'évaluer les différences intrinsèques pouvant exister entre elles. Ces travaux visaient le développement de peaux reconstruites permettant la formation des follicules pileux afin d'apporter de nouvelles fonctions aux reconstructions tout en optimisant la qualité des greffons.

Une peau reconstruite contenant des follicules pileux représente également un outil permettant d'étudier la prolifération et la différenciation des cellules souches. En effet, le follicule pileux est un mini-organe qui subit des cycles successifs de croissance et de régression tout au long de sa vie. Ces cycles font intervenir de nombreuses interactions entre le tissu mésenchymateux et le tissu épithélial ainsi qu'un programme complexe de régulation de la différenciation des cellules souches en plusieurs types cellulaires différents.

Les travaux de cette thèse ont été dirigés, dans un second temps, vers l'étude approfondie de l'environnement tridimensionnel entourant les cellules souches dans un follicule pileux très spécialisé : la vibrisse. Plusieurs mammifères possèdent plusieurs de ce gros poil qui se spécialise dans la détection des stimuli mécaniques. La vibrisse, en tant que modèle d'étude des cellules souches, offre plusieurs avantages. Notamment, sa dimension importante qui permet de bien distinguer les différents compartiments de différenciation cellulaire. Ces travaux visaient à comprendre l'organisation des cellules souches dans leur niche et à étudier de façon approfondie les propriétés phénotypiques des cellules qui la composent. Des études *in situ* sur l'arrangement des cellules épithéliales au sein de la région du renflement (niche des cellules souches), sur leurs caractéristiques histologiques et sur l'expression des différentes kératines en relation avec la structure de leur réseau, furent donc menées sur la vibrisse de la souris.

Pour faciliter la compréhension des travaux, une introduction générale portant, dans un premier temps, sur la structure de la peau et des follicules pileux ainsi que sur les processus qui régissent leur formation et leur maintien est présentée dans cette thèse. Dans un second temps, les travaux qui ont permis les avancées les plus importantes dans le domaine de recherche des cellules souches cutanées sont passés en revue et commentés. Par la suite, les nombreux changements biochimiques et structuraux que subit la cellule souche

épithéliale lors de son engagement dans le processus de différenciation menant à la production des cellules spécialisées qui forment l'épiderme ou le follicule pileux sont décrits en détail. Le chapitre d'introduction se termine par la description des principales méthodes de culture des cellules cutanées. Ces méthodes sont comparées en terme de leurs forces, de leurs limites et de leurs utilisations. À la suite de l'introduction générale, viennent les travaux originaux de cette thèse. Leur description prend la forme d'articles scientifiques. Une discussion générale souligne la contribution des résultats de ces articles dans la compréhension de la biologie des cellules souches. Dans cette section, des perspectives d'études sont proposées pour la poursuite du projet. Enfin, des résumés d'articles et chapitres de livre publiés auxquels j'ai apporté ma collaboration lors de ma formation sont placés en annexe. Ils portent sur la culture des cellules de Merkel, l'utilisation de la K19 comme marqueur des cellules souches, les récepteurs TGF- β (*transforming growth factor- β*) à la surface des kératinocytes et la réorganisation des tissus reconstruits suite à l'application de contraintes mécaniques.

I.2 Caractéristiques générales de la peau et de ses annexes

La peau se divise en 2 couches principales : l'épiderme qui est la couche superficielle, et le derme sous-jacent, un tissu mésenchymateux innervé et vascularisé composé principalement de fibroblastes enrobés de matrice extracellulaire. Les annexes cutanées (follicules pileux et glandes), qui sont des tissus épithéliaux, se situent dans le derme. Le derme et l'épiderme sont séparés par une jonction appelée membrane basilaire. Les principaux éléments qui caractérisent la peau sont décrits dans cette section.

I.2.1 L'épiderme : un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé

L'épiderme est la couche en contact immédiat avec l'environnement. Il s'agit d'un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé. Ce genre de tissu est formé de plusieurs assises de cellules, dont une couche de cellules en division ancrées à la membrane basilaire (Figure

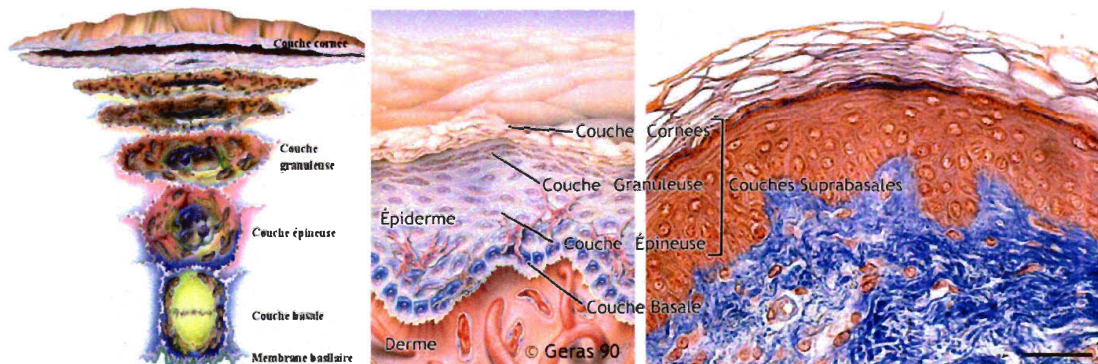


Figure I-1 Représentation schématique de l'épiderme[¶] et coupe histologique de la peau colorée au trichrome de Masson.

Barre de mesure: 50 μm . [¶] Schéma adapté de Geras (1990), *Dermatology: A medical artist's interpretation*, Santoz Medical Publications.

I-1). Dans la peau, les cellules épithéliales sont appelées kératinocytes. Lorsque le

processus de différenciation s'entame, les kératinocytes basaux se détachent de la membrane basilaire et migrent au niveau des couches suprabasales. Au cours de ce processus, les caractéristiques histologiques des kératinocytes se modifient. Ainsi, les couches suprabasales sont divisées en 3 couches distinctes : épineuse (*spinosum*), granuleuse (*granulosum*) et cornée (*corneum*). À la surface de cette dernière, les cellules, aussi appelées cornéocytes ou squames, soumises aux frottements se détachent et se perdent dans l'environnement (Fuchs, 1990). Ce phénomène se nomme la desquamation. Les kératinocytes, devenus cornéocytes, forment une véritable barrière de protection sélectivement perméable. Les cellules souches de la peau assurent la production continue de kératinocytes, ce qui maintient un équilibre entre la perte et l'addition de nouvelles cellules. Les principaux mécanismes biologiques impliqués dans la différenciation de l'épiderme sont décrits de façon plus détaillée dans la section I.5.1.

I.2.1.1 Les principaux constituants de l'épiderme

I.2.1.1.1 Kératinocytes, cellules de Langerhans et mélanocytes

L'épiderme est formé majoritairement de kératinocytes (90%). Cependant, d'autres types cellulaires y sont présents. Notamment, les cellules de Langerhans qui font partie du système immunitaire; leur rôle est de présenter l'antigène phagocyté aux lymphocytes. Les cellules de Langerhans se situent dans les couches suprabasales de l'épiderme, mais aussi dans les follicules pileux où elles se concentrent dans leur partie supérieure soit l'infundibulum et le renflement (pour une illustration des parties du poil, voir Figure I-2), créant ainsi une ligne de défense immunitaire à l'entrée du poil (Banchereau *et al.*, 2000; Moresi et Horn, 1997; Paus *et al.*, 1998).

Les mélanocytes se spécialisent dans la pigmentation de la peau et des poils. Ces cellules sont en contact avec la membrane basilaire et, grâce à leurs extensions cytoplasmiques, elles déposent leur pigment appelé mélanine dans les kératinocytes (Slominski *et al.*, 2005). Récemment, une équipe de chercheurs a démontré qu'au niveau du follicule pileux, les précurseurs des mélanocytes résident dans la même niche que les

cellules souches épithéliales du follicule pileux, soit dans la région du renflement (Nishimura *et al.*, 2002).

1.2.1.1.2 Les cellules de Merkel

Dans la peau, la majorité des glandes et des cellules spécialisées dans la détection tactile se situent dans le derme. Cependant, une population peu abondante, appelée cellules de Merkel, est présente entre les kératinocytes basaux de l'épiderme. Au niveau des follicules pileux, les cellules de Merkel se retrouvent en densité plus importante dans les régions du renflement, de l'infundibulum et de l'isthme (Fradette *et al.*, 1995; Halata *et al.*, 2003; Moll, 1994a; Moll *et al.*, 1996; Sieber-Blum *et al.*, 2004). Certaines structures spécialisées dans la détection des stimuli tactiles possèdent un nombre considérable de cellules de Merkel. Notamment, le disque tactile (*haarscheiben*, ou *tactile hair disk*), qui correspond à un épaissement épidermique retrouvé à proximité de certains poils et le renflement de la vibrisse des rongeurs (Winkelman et Breathnach, 1973).

Les cellules de Merkel possèdent à la fois des caractéristiques épithéliales et neuronales. En effet, comme les kératinocytes de la peau, elles ont un réseau de filaments de kératine qui communique avec les kératinocytes voisins par des desmosomes. De plus, des granules de neurosécrétion sont présentes dans leur cytoplasme. La plupart des cellules de Merkel de l'épiderme et des poils rentrent en contact avec des terminaisons nerveuses avec lesquelles elles échangent des neurotransmetteurs lorsqu'elles sont excitées (Haeberle *et al.*, 2004; Moll *et al.*, 1996; Winkelman et Breathnach, 1973). Cette double identité a longtemps alimenté les débats quant à la provenance embryonnaire des cellules de Merkel (ces questions sont discutées dans Sieber-Blum et Grim, 2004). Récemment, l'étude des souris transgéniques *Wnt1-cre/R26R*, dans lesquelles les cellules de la crête neurale et leur descendance expriment le gène rapporteur codant pour l'enzyme β -galactosidase, a permis l'identification de cellules de Merkel marquées dans la vibrisse et dans la peau de la tête de la souris (Sieber-Blum *et al.*, 2004; Szeder *et al.*, 2003). Ces travaux suggèrent que les cellules de Merkel dérivent de la crête neurale. Cependant, ils ne démontrent pas l'origine embryonnaire des cellules de Merkel du reste du corps.

Les cellules de Merkel demeurent néanmoins peu connues. La récente mise au point à notre laboratoire de techniques permettant l'identification et la mise en culture des cellules de Merkel humaines (Fradette *et al.*, 1995; Fradette *et al.*, 2002)(Annexe I). permettra sans doute d'en apprendre davantage sur leurs exigences particulières de culture. Il sera alors fort intéressant d'incorporer les cellules de Merkel dans les divers modèles de peaux reconstruites.

1.2.1.1.3 Les desmosomes et les jonctions adhérentes

Les cellules de tous les épithélia sont reliées entre elles par des jonctions adhérentes et des desmosomes. En plus de contribuer à leur cohésion et à leur intégrité, ces jonctions participent à la morphogénèse des tissus (Nanba *et al.*, 2000). En effet, les forces mécaniques générées par l'assemblage et le désassemblage des jonctions sont accompagnées de changements au niveau du cytosquelette qui permettent de moduler la forme, le positionnement et le mouvement des cellules (Jamora et Fuchs, 2002).

Les desmosomes sont des structures abondantes dans les tissus soumis à de fortes contraintes mécaniques comme l'épiderme de la peau et le muscle cardiaque (Kowalczyk *et al.*, 1999). En servant de point d'attache pour le réseau de filaments intermédiaires, les desmosomes participent à l'intégrité architecturale des cellules (Kowalczyk *et al.*, 1999). Différentes isoformes de la famille des cadhérines, des desmogléines et des desmocollines, constituent le desmosome et sont spécifiques au niveau de différenciation du kératinocytes (Kljuic *et al.*, 2003; Kowalczyk *et al.*, 1999; Moles et Watt, 1997; Wan *et al.*, 2003a; Wan *et al.*, 2003b). Chaque protéine desmosomique participerait à sa façon au contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales (Jamora et Fuchs, 2002; Koch et Franke, 1994). Une augmentation graduelle du nombre de desmosomes s'observe lors de la différenciation des kératinocytes (Wan *et al.*, 2003a; Wu *et al.*, 2003). Comme de nombreuses réactions enzymatiques impliquées dans la différenciation de l'épiderme, la formation des desmosomes est dépendante du calcium (Koch et Franke, 1994).

Les jonctions adhérentes sont des complexes moléculaires qui relient les cellules entre elles et dont l'assemblage dépend du calcium (Jamora et Fuchs, 2002). Elles joignent

le réseau d'actine via l' α -caténine qui forme un complexe avec la β -caténine. Cette dernière interagit avec une cadhérine. Comme pour les desmosomes, différents isotopes de cadhérine existent. La peau contient les cadhérines E et P (Jamora et Fuchs, 2002). Au cours de la morphogénèse et de la différenciation, la concentration ou le type de cadhérine se modifie ce qui influence l'adhérence et la migration des cellules (Jamora et Fuchs, 2002). En plus de leur rôle structural, les jonctions adhérentes possèdent des capacités de signalisation. À l'inverse, une multitude de sentiers de signalisation ont un impact sur le dynamisme des jonctions adhérentes, notamment la voie Wnt (Jamora *et al.*, 2003).

1.2.1.1.4 Les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs membranaires exprimés à la surface des kératinocytes. Elles sont formées de deux chaînes: alpha (α) et bêta (β). Les intégrines s'attachent à des éléments de la matrice extracellulaire (collagène, laminine, vitronectine, fibronectine, tenascine) et transmettent des signaux au noyau via leur domaine cytoplasmique et la machinerie d'actine (pour une révision des connaissances portant sur les intégrines et leur capacité de signalisation, voir Van der Flier et Sonnenberg, 2001). Les intégrines $\alpha 2 \beta 1$ (récepteur du collagène), $\alpha 3 \beta 1$ ainsi que $\alpha 6 \beta 4$ (récepteurs de la laminine) sont les plus abondantes des kératinocytes basaux de l'épiderme et de la gaine folliculaire externe (*ORS : outer root sheath*) du follicule pileux. Au sein de la peau, les intégrines participent à la régulation de l'homéostasie de l'épiderme ainsi qu'à celle des poils en modulant l'équilibre entre la prolifération et la différenciation cellulaire. À cet égard, la chaîne $\beta 1$ et l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$, qui sont fortement exprimées par les cellules souches de la peau, semblent particulièrement importantes dans le contrôle du phénotype des kératinocytes cutanés (voir section I.4.2.2.2).

1.2.1.1.5 La membrane basilaire et les hémidesmosomes

La membrane basilaire, qui sépare l'épiderme du derme, est formée d'une matrice extracellulaire riche en laminines et en certains collagènes (principalement les types IV et VII). Les kératinocytes basaux de l'épiderme s'attachent à la membrane basilaire à l'aide d'hémidesmosomes, des complexes qui sont composés entre autres, des antigènes de la

pemphigoïde bulleuse (*BPAG*, *bullous pemphigoid antigen*) (Borradori et Sonnenberg, 1999) ainsi que d'une intégrine qui leur est propre : l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ (Carter *et al.*, 1990). Comme le desmosome décrit dans la section I.2.1.1.3, l'hémidesmosome sert de point d'attache au réseau de filaments intermédiaires du kératinocyte (Borradori et Sonnenberg, 1999).

L'aspect de la membrane basilaire est très caractéristique en microscopie électronique où elle apparaît sous forme de 3 couches : la plaque d'attachement des hémidesmosomes est du côté cytoplasmique et est suivie d'une zone claire appelée *lamina lucida* et finalement, d'une zone opaque aux électrons : la *lamina densa*. Le réseau de matrice extracellulaire du derme s'attache à la membrane basilaire via des fibrilles d'ancrage de collagène de type VII (Burgeson et Christiano, 1997).

La membrane basilaire n'est pas seulement une structure qui assure la cohésion entre le derme et l'épiderme. Elle participe au contrôle de la formation, de l'homéostasie et de la régénération de l'épiderme ainsi que de ses annexes. Ces processus requièrent une coordination de la différenciation et de la prolifération des cellules et est régi en partie par la modulation de l'adhésion des cellules épithéliales aux différentes composantes de la membrane basilaire et ce, grâce à un éventail d'intégrines et de complexes d'adhésion. Au cours des mécanismes de remodelage de l'épiderme, les divers éléments de la membrane basilaire subissent aussi des modifications (Couchman et Gibson, 1985). Par exemple, lors de la formation des poils, l'expression des laminines 1 et 5, normalement en abondance dans la membrane basilaire de la peau, diminue au profit de la laminine 10 (Hayashi *et al.*, 2002; Nanba *et al.*, 2000). Cette dernière y joue d'ailleurs un rôle crucial puisque la délétion de son gène compromet complètement la folliculogénèse (Li *et al.*, 2003).

I.2.2 Le derme : plus qu'un tissu de soutien

I.2.2.1 Les principaux constituants du derme

Le derme est le tissu conjonctif de soutien sur lequel repose l'épiderme. Il est constitué principalement de fibroblastes et de leurs produits de sécrétions formant un réseau tridimensionnel riche en collagènes, en fibres élastiques, en protéoglycans et en certaines

glycoprotéines. Les collagènes confèrent à la peau sa résistance aux déformations mécaniques tandis que les fibres élastiques lui procurent son élasticité. Le derme est constitué principalement du collagène de type I (80-90%) et du collagène de type III (9-12%). Il comprend également un réseau très structuré de fibres élastiques composé de trois types de fibres dont la proportion de deux composants principaux, la fibrilline et l'élastine, varie. Les fibres de type oxytalan sont celles qui possèdent la plus faible proportion d'élastine et sont donc majoritairement constituées de fibrilline. Elles se distribuent perpendiculairement à la jonction dermo-épidermique dans laquelle elles s'ancrent. Les fibres de type élaunine s'orientent de la même façon, mais leur teneur en élastine est plus importante que celle des fibres oxytalan. Les fibres élastiques proprement dites se distribuent parallèlement à l'épiderme et contiennent une proportion plus élevée d'élastine par rapport à celle de fibrilline (Cotta-Pereira *et al.*, 1976). Même si les kératinocytes et les fibroblastes en culture expriment la tropoélastine (Kajiya *et al.*, 1997; Sephel *et al.*, 1986), une interaction entre les deux types cellulaires serait nécessaire à la maturation des fibres élastiques, comme l'a suggéré une étude portant sur la composition du réseau élastique d'un modèle de peau reconstruite utilisant une éponge de chitosan et de collagène (Duplan-Perrat *et al.*, 2000).

Le derme renferme les vaisseaux sanguins qui assurent sa nutrition ainsi que celle de l'épiderme. Les annexes cutanées, comme l'appareil pilo-sébacé (section I.2.3) et les glandes sudoripares ou exocrines, se situent dans le derme malgré leur nature épithéliale. Les nerfs, les terminaisons nerveuses et les structures spécialisées dans la détection de stimuli tactiles, notamment les corpuscules de Pacini et de Meissner, se distribuent dans le derme en densité variable selon la région. En résumé, le rôle du derme est d'intégrer les informations que reçoit la peau et d'assurer le maintien de ses qualités, notamment sa souplesse, sa résistance ainsi que son niveau d'hydratation.

I.2.2.2 Les interactions mésenchyme-épithélium

L'environnement joue un rôle majeur dans l'expression des gènes de la différenciation épidermique. La relation spatiale qui existe entre les éléments du derme et les cellules épithéliales diffère selon les tissus. Ainsi, à un endroit et à un moment donné, la

matrice extracellulaire est en mesure de fournir des informations précises aux cellules. Par exemple, l'interaction des molécules de la matrice extracellulaire avec des facteurs de croissance affecte leur concentration locale et leur activité. De plus, la matrice peut limiter la diffusion de certains facteurs ou encore les conserver en réserve une fois que leur production est cessée. Plusieurs molécules de la matrice extracellulaire, entre autres les laminines, la tenascine et la thrombospondine, possèdent une certaine activité mitogénique qui peut affecter le comportement des cellules. Les récepteurs de surface (ex : CD36, CD44, intégrines) sont eux aussi étroitement impliqués au niveau des interactions entre le mésenchyme et l'épithélium puisque les différents récepteurs activent diverses voies de signalisation. Ce genre d'échanges entre le mésenchyme et l'épithélium est au coeur des mécanismes régissant le développement et la morphogénèse.

Puisque les différents facteurs de croissance et les protéines de la matrice extracellulaire collaborent et forment une niche qui contrôle la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales, il apparaît primordial de recréer les interactions tridimensionnelles en culture pour bien reproduire les mécanismes régissant l'homéostasie cutanée.

I.2.3 L'appareil pilo-sébacé

Le follicule pileux est un prolongement intradermique de l'épiderme. Toutefois, son processus de différenciation est relativement plus complexe. Une description de l'anatomie des poils en général, et de la vibrisse en particulier, est élaborée dans la section qui suit.

I.2.3.1 La structure du follicule pileux

Même si tous les follicules pileux partagent une structure similaire, leur forme et leur taille varient. Dans la littérature scientifique, plusieurs termes différents sont employés pour nommer le même type de poil. Le Tableau I-1 récapitule la terminologie utilisée pour désigner les différents poils retrouvés chez la souris et chez l'humain.

Tableau I.1 La terminologie des différents types de poils de la souris et de l'humain

Synonymes	Description
Souris :	
<i>Monotrich, Tylotrich, Guard hair, Primary, Primary X</i>	Poil le plus long du pelage (<i>over hair</i>).
<i>Awl, Auchene, Secondary, Primary Y</i>	Poils du pelage de longueur intermédiaire (<i>over hairs</i>).
<i>Zigzag, Tertiary, Secondary, Quaternary,</i>	Poil le plus court du pelage (<i>underfur</i>).
<i>Vibrisse (vibrissae), Moustache (Whisker), Sinus Hair</i>	Poil spécialisé dans la détection tactile fine (orientation dans l'espace, discrimination de textures).
Humain :	
<i>Lanugo</i>	Poil fin et doux qui se développe sur le corps du fœtus avant sa naissance.
<i>Duvet (Vellus hair)</i>	Poil de 1 à 2 cm peu pigmenté retrouvé partout sur le corps (sauf la peau palmoplantaire). Il n'a pas de glande sébacée annexée et ne se transforme jamais en poil d'un autre type.
<i>Terminal hair</i>	Long poil pigmenté de la tête ou du corps.
<i>Cheveux (Scalp hair)</i>	Poil qui se caractérise par un cycle très long et qui est propre à l'humain. Il fait partie du groupe <i>terminal hair</i> .

1.2.3.1.1 Les différents compartiments de différenciation du follicule pileux

Le follicule pileux mature est constitué de couches concentriques de cellules épithéliales d'aspect très caractéristique en microscopie optique (Figure I-2) et électronique (Figure I-3). Il se distingue par trois compartiments de différenciation principaux. Le premier est formé des couches cellulaires de la tige du poil rigide et insoluble qui émerge à la surface de la peau. Ce compartiment se subdivise en 3 autres couches : les cellules de la moelle (*medulla*) qui sont les plus internes, entourées par celles du cortex, puis les cellules de la cuticule du cortex, qui sont les plus externes de la tige du poil. Le second compartiment de différenciation s'appelle la gaine folliculaire interne (*IRS* pour *inner root sheath*). Il est composé de 3 couches de cellules morphologiquement et biochimiquement distinctes : la cuticule de l'*IRS* (la plus interne), la couche de Huxley (au centre) et la couche de Henley (la plus externe). Le troisième compartiment de différenciation correspond à celui de la gaine folliculaire externe (*ORS*) dont la couche la plus externe, appelée couche basale, est formée d'une assise de cellules en contact avec une membrane basilaire qui entoure le follicule. Ensuite, l'*ORS* est constitué de plusieurs assises de cellules suprabasales, ainsi que de la couche « compagne » (*companion layer*), soit la couche cellulaire la plus interne de l'*ORS*.

L'*ORS* fait le lien entre le bulbe du follicule et l'épiderme avec lequel il est en continuité. C'est à l'intérieur de l'*ORS*, au niveau d'une structure qu'on appelle le renflement, que se trouvent les cellules souches du poil (Akiyama *et al.*, 1995; Blanpain *et al.*, 2004; Cotsarelis *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 2004; Oshima *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2000; Tumber *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2004). Le renflement est une région située sous la glande sébacée, à l'endroit où s'insère le muscle érecteur du poil (*arrector pili*). On le reconnaît par un épaissement de l'*ORS* dû à une augmentation du nombre de couches cellulaires (Figure I-2).

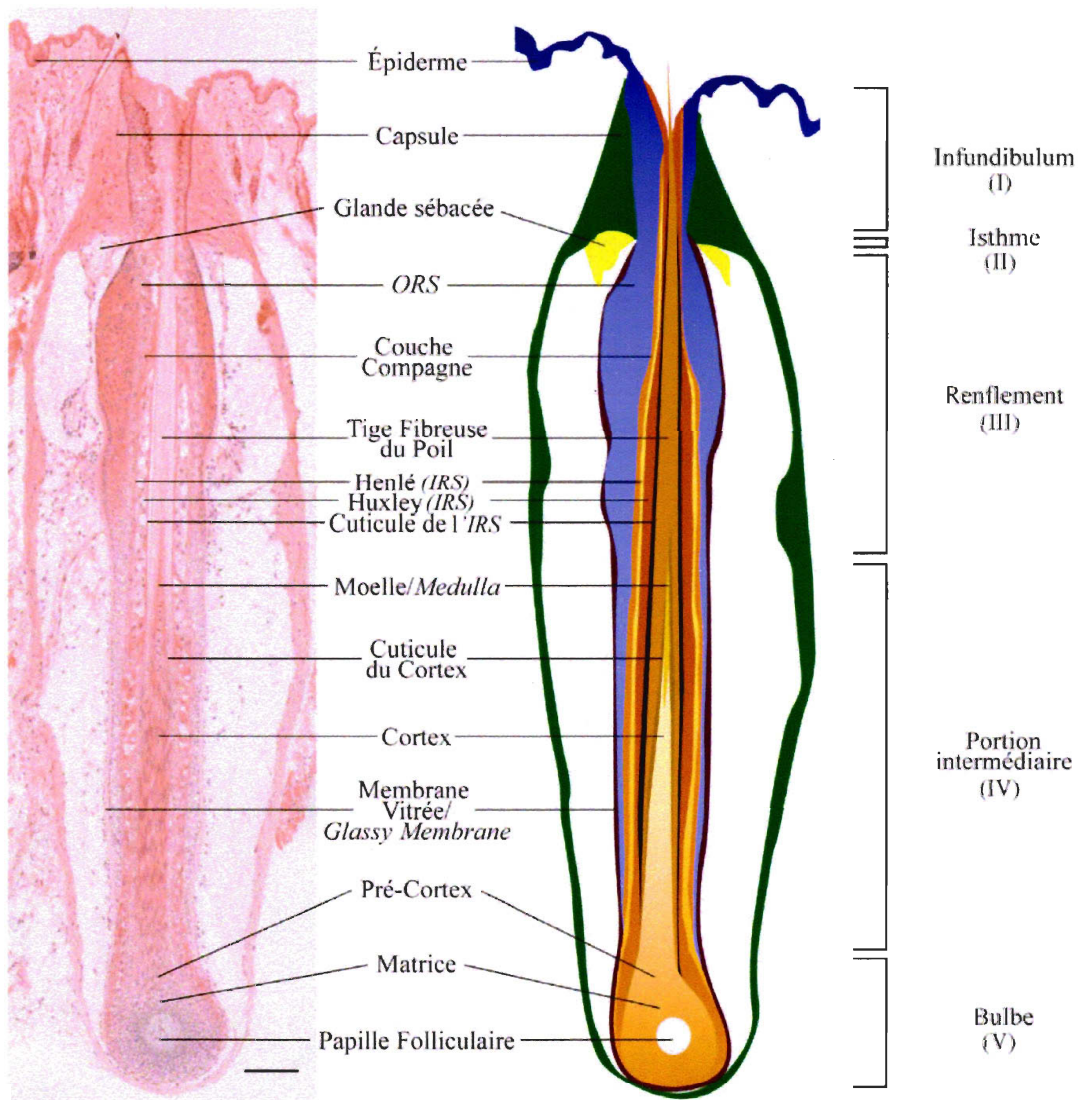


Figure I-2 Les compartiments de différenciation de l'appareil pilo-sébacé
 Coupe histologique d'un poil (vibrisse) et représentation schématique correspondante.
IRS, Inner root sheath; ORS, Outer root sheath. Barre de mesure: 100 μ m. © D. Larouche.

Les cellules qui composent la tige et l'*IRS* proviennent de la différenciation des cellules de la matrice. Celles-ci forment le bulbe du poil et elles entourent un amas de cellules de types fibroblastiques appelé papille folliculaire (Figure I-2). Le contact des cellules de la matrice avec la papille folliculaire permettrait de les maintenir dans un état prolifératif et peu différencié (Cotsarelis *et al.*, 1990; Oliver et Jahoda, 1988). À la base du

follicule, l'IRS se lie à la cuticule du cortex. Cependant, vers la surface de la peau, l'IRS dégénère graduellement afin de libérer le poil (Hardy, 1992).

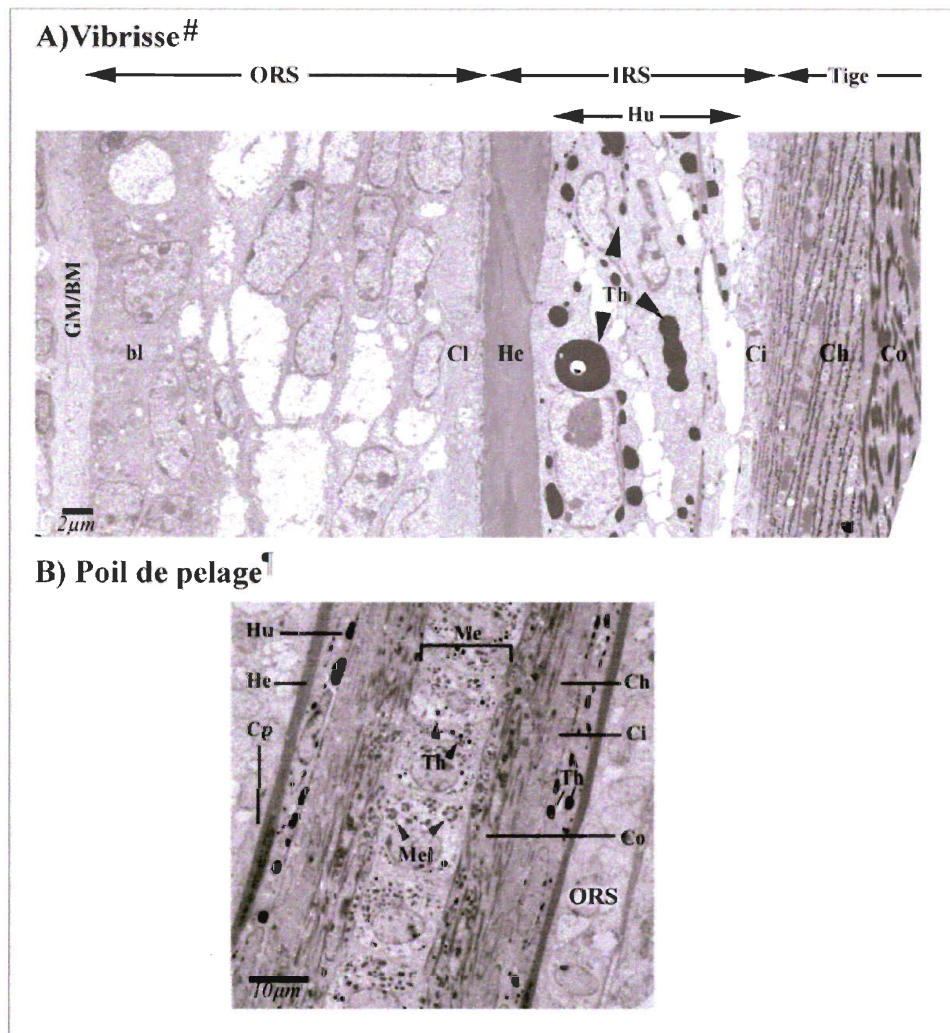


Figure I-3 Ultrastructure des cellules qui composent les poils (vibrisse et pelage)

Micrographies de coupes de vibrisse (A) et d'un poil du pelage (B) observées au microscope électronique à transmission.

Bl, couche basale; BM, membrane basale; Ch, cuticule du cortex; Ci, cuticule de l'IRS; Cl/Cp, couche compagne; Co, cortex; GM, membrane vitrée; He, Henlé; Hu, Huxley; IRS, gaine folliculaire interne; Me, moelle; Mel, granule de mélanine; ORS, gaine folliculaire externe; Th, grains de trichohyaline. # © D. Larouche. ¶ Figure adaptée de Kobiela et al, JCB, 163 :613.

1.2.3.1.2 La glande sébacée

La glande sébacée annexée au poil est formée de grosses cellules épithéliales polyédriques remplies de gouttelettes lipidiques qui peuvent être mises en évidence à l'aide de diverses techniques de coloration telle l'huile rouge (*Oil red O*). La glande sébacée se développe à partir de l'*ORS* mais excrète son contenu, appelé sébum, par un canal qui s'ouvre dans l'espace situé entre l'*IRS* et la tige du poil. Le sébum est un filtre lipidique qui enduit et protège les poils ainsi que la surface cutanée.

1.2.3.1.3 La papille dermique : une population fibroblastique très particulière

La papille folliculaire est un amas de fibroblastes enrobés de matrice extracellulaire présent à la base du follicule pileux (Figure I-2). Cette population cellulaire est très importante car elle contrôle la morphogénèse et le cycle du poil via l'échange de signaux avec les cellules épithéliales qui l'entourent. Il est même possible d'induire la formation de follicules pileux en recréant le contact étroit entre des fibroblastes provenant de papilles folliculaires et des cellules épithéliales *in vivo* (Horne *et al.*, 1986; Jahoda, 1992; Jahoda *et al.*, 1984; Jahoda *et al.*, 1993; Oliver, 1967; 1970; Reynolds et Jahoda, 1992; Robinson *et al.*, 2001).

Les fibroblastes de la papille folliculaire ont des propriétés qui les distinguent des fibroblastes dermiques. En culture monocouche, les fibroblastes de la papille folliculaire ont tendance à former des agrégats et produisent plusieurs composantes des membranes basales telles que le collagène IV, la laminine et la fibronectine ainsi que des facteurs qui stimulent la prolifération des kératinocytes *in vitro* (Couchman, 1986; Jahoda *et al.*, 1984; Messenger *et al.*, 1991; Reynolds *et al.*, 1991; Warren *et al.*, 1992). D'autre part, les fibroblastes de la papille folliculaire expriment la phosphatase alcaline *in situ* ainsi qu'en culture. La détection de l'activité de cette enzyme est d'ailleurs couramment effectuée pour les identifier (Handjiski *et al.*, 1994). Tout au long du cycle du poil, l'expression de molécules morphogénétiques de différentes familles (FGF (*fibroblast growth factor*), TGF- β (*transforming growth factor-beta*), Shh (*sonic hedgehog*), effecteurs de la voie Wnt, neurotrophines, protéines à gènes homéobox) fluctue au sein de la papille folliculaire et

coordonne la différenciation des cellules du poil (pour une révision des molécules qui régissent le cycle du poil, voir Stenn et Paus, 2001).

Les messages qui proviennent des cellules mésenchymateuses de la papille folliculaire des poils déterminent leur site, leur taille et leur forme lors de leur formation. À l'âge adulte, cette propriété persiste. En effet, différentes expériences de greffe combinant des fibroblastes de papilles dermiques avec des kératinocytes ont permis de montrer que la provenance des fibroblastes utilisés (vibrisse, poil de pelage, cheveux) détermine le type d'annexe généré (Ibrahim et Wright, 1982; Jahoda, 1992). Ces travaux ont également révélé que le volume de la papille folliculaire est un facteur qui détermine la taille du poil.

I.2.3.2 La vibrisse: un poil hautement spécialisé chez le mammifère

La vibrisse, aussi appelée moustache, est sûrement le follicule pileux ayant atteint le plus haut niveau de spécialisation chez le mammifère. Ce gros poil permet à l'animal de s'orienter dans l'espace. Entre autres, le contact de la vibrisse avec une surface permet à l'animal d'évaluer la distance qui l'en sépare (Mehta et Kleinfeld, 2004). Grâce à ses vibrisses, l'animal est même en mesure de reconnaître les textures (Carvell et Simons, 1990; Guic-Robles *et al.*, 1989). La vibrisse se caractérise par une capsule collagénique qui renferme du liquide (Figure I-2). Un réseau de sinus abondamment innervé et vascularisé entoure sa partie épithéliale. Comme le suggère son nom, la vibrisse « vibre » en réponse aux stimuli mécaniques et, contrairement aux poils de petit calibre, ses propriétés physiques lui permettent de vibrer à des fréquences très élevées rendant possible la discrimination de sensations très fines (Hartmann *et al.*, 2003; Neimark *et al.*, 2003). Les stimuli mécaniques transmis par la tige rigide de la vibrisse sont vraisemblablement captés par les cellules de Merkel et transmis au système nerveux central via les nerfs. Le nombre de cellules de Merkel établissant des connexions avec les terminaisons nerveuses entourant la vibrisse est estimé à plus de 3000; les cellules de Merkel se concentrent dans la couche de cellules basales dans la région du renflement (Ebara *et al.*, 2002). L'innervation préférentielle de cette région, en plus de son association avec le muscle arrecteur du poil, lui suggère un rôle senso-moteur. Cependant, le lien avec les cellules souches de la vibrisse, également

localisées dans le renflement (Kobayashi *et al.*, 1993; Oshima *et al.*, 2001), reste à découvrir.

I.3 La formation de la peau et des poils

Au cours du développement de l'embryon humain, l'épiderme et les poils dérivent du périoderme, qui correspond à un épiderme primitif apparaissant dès le 8 ième jour de gestation, soit lorsque l'ectoderme et l'endoderme se définissent dans le bouton embryonnaire du blastocyste (Byrne *et al.*, 2003). Chez l'être humain, l'épiderme est kératinisé et fonctionnel à la fin du second trimestre tandis que chez la souris, il l'est après 16 jours de gestation. Le derme, pour sa part, dérive du mésoderme sous-jacent à l'ectoderme et du dermatome superficiel qui provient de la portion dorsolatérale des somites. Certaines cellules spécialisées, comme les mélanocytes et les cellules de Merkel, proviennent de la crête neurale (Sieber-Blum *et al.*, 2004; Szeder *et al.*, 2003). Récemment, des études ont suggéré qu'il en serait de même pour certains fibroblastes de la papille folliculaire des poils, du moins, celle des vibrisses des souris (Fernandes *et al.*, 2004; Sieber-Blum *et al.*, 2004).

I.3.1.1 La formation et le cycle du poil

La présente section donne des détails sur la formation et le cycle du poil classiquement utilisé pour ce genre d'étude : celui du pelage de la souris. De plus, les principales différences entre le cycle des poils du pelage et celui des vibrisses sont décrites et schématisées.

Le développement de l'appareil pilo-sébacé peut être divisé en 3 étapes : l'induction, l'organogénèse et la différenciation terminale.

La phase d'induction débute au cours du second trimestre chez l'humain et à partir du 12,5 ième jour de gestation chez la souris (Paus *et al.*, 1999). La formation des poils commence au niveau de la tête et s'étend ensuite sur le reste de l'animal (Schmidt-Ullrich et Paus, 2005). Pour ce qui est des mammifères au pelage dense, des vagues secondaires de formation de poils de plus petite taille succèdent au développement des premiers poils (Schmidt-Ullrich et Paus, 2005).

Les étapes de la formation des follicules pileux sont schématisées dans la Figure I-4. L'initiation de la formation d'une annexe débute généralement par la création de gradients d'activateurs et d'inhibiteurs de la différenciation. Ceux-ci vont établir des domaines d'induction au sein de l'épithélium et du mésenchyme embryonnaires, déterminant ainsi l'espacement entre les futures annexes (pour une révision des mécanismes moléculaires impliqués, voir Schmidt-Ullrich *et al.*, 2005). Lors de la formation des poils, le premier message spécifiant la formation d'une annexe à un endroit particulier au sein de l'ectoderme proviendrait du derme. En réponse à ce premier signal survenant au stade 0 (Figure I-4A), les cellules épithéliales sus-jacentes prolifèrent et forment un épaississement appelé placode, ce qui correspond au stade 1 (Figure I-4B). Les cellules de cette placode expriment la K19 (illustrée en rouge, Figure I-4B) et une forte concentration de l'intégrine $\beta 1$, deux marqueurs de cellules souches cutanées (Bickenbach et Chism, 1998; Jones et Watt, 1993; Michel *et al.*, 1996). Les cellules épithéliales de la placode en formation envoient à leur tour un message vers le tissu dermique. En réponse, les cellules mésenchymateuses à proximité de la placode se condensent (stade 2, Figure I-4B). Ces dernières, qui constitueront la papille folliculaire du poil mature, envoient un autre signal à l'épiderme lui dictant quel type de poil il doit former. À ce moment s'initie le stade 3, correspondant au début de la période d'organogénèse au cours de laquelle les cellules épithéliales vont former une papille pileuse qui va se prolonger et entourer peu à peu la papille folliculaire (Figure I-4C). Au stade 4, le bulbe du poil et les premières cellules qui formeront la gaine folliculaire interne (*IRS*) sont visibles (Figure I-4D). Lors de cette étape, les cellules exprimant les marqueurs des cellules souches se situent dans toutes les cellules de la gaine folliculaire externe (*ORS*) (Figure I-4D, illustrées en rouge). Cependant, dans le poil mature, les cellules souches se confinent à la région du renflement (Figure I-4F,

illustrées en rouge) qui apparaît au stade 5 (Figure I-4E). C'est également au cours du stade 5 que les premiers sébocytes se forment et que la fibre du poil apparaît dans la portion inférieure du canal pileux au centre de l'IRS (Figure I-4E). Les stades 6 à 8 sont des étapes au cours desquelles le follicule se prolonge plus profondément dans le derme, et se poursuit la différenciation terminale des cellules de l'IRS et de la tige dans le canal pileux jusqu'à l'émergence finale de la fibre du poil à la surface de la peau (Figure I-4F,G).

I.3.1.1.1 Le cycle du poil

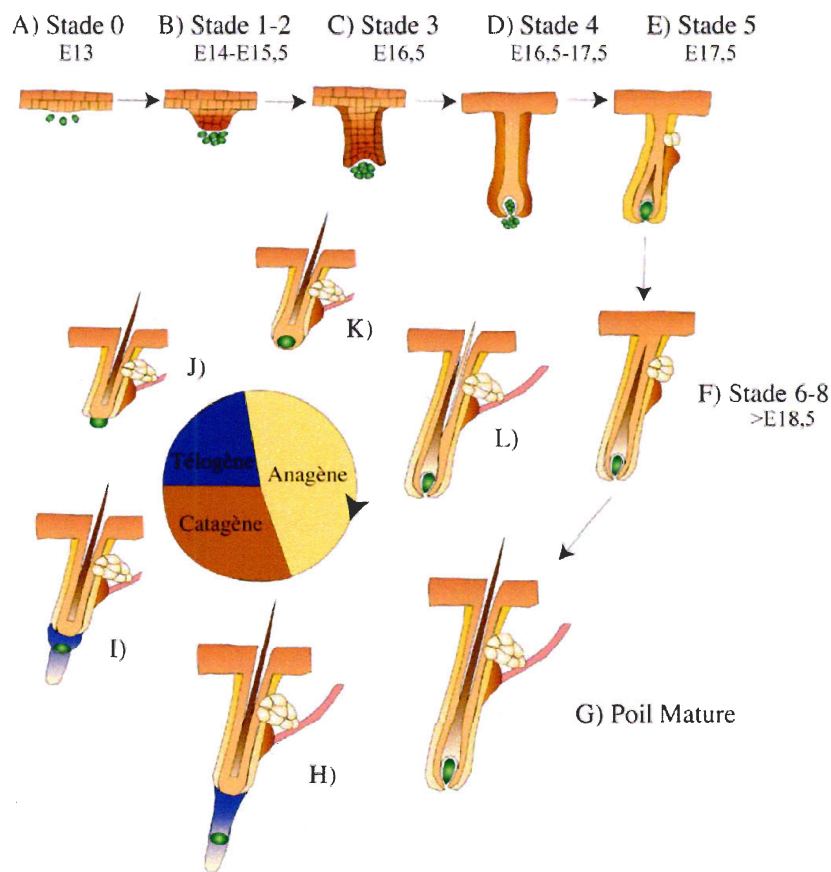


Figure I-4 La formation et le cycle du poil

Vert, cellules mésenchymateuses qui forment la papille dermique; Rouge, cellules exprimant les marqueurs des cellules souches cutanées; Jaune, gaine folliculaire externe; Pêche, gaine folliculaire interne; Beige, sébocytes; Brun, matrice et fibre du poil; Bleu, cellules en apoptose. © D. Larouche.

Au terme de son développement initial, le follicule pileux va subir une croissance cyclique se divisant en trois étapes illustrées dans la Figure I-4: les phases catagène,

télogène et anagène. Lors de la phase catagène, les cellules de la matrice du poil cessent de proliférer et deviennent apoptotique. En conséquence, la portion inférieure du follicule pileux régresse (Figure I-4H). Lors de la deuxième étape, soit la phase télogène, l'activité des cellules de la matrice est interrompue, et ce jusqu'à l'initiation de la troisième phase, soit la phase anagène. Au cours de cette dernière, les cellules amplificatrices transitoires, issues de la stimulation des cellules souches, régénèrent la matrice du bulbe et leur descendance constitue un nouveau poil (Figure I-4L). Sous l'émergence de ce poil en formation, l'ancien poil est peu à peu expulsé du canal pileux.

1.3.1.1.2 La régulation du développement et du cycle du poil

La morphogénèse de l'épiderme et du follicule pileux est le produit d'interactions entre le mésenchyme et l'ectoderme embryonnaires. De nombreux récepteurs cellulaires, molécules d'adhésion, éléments de la matrice extracellulaire et molécules sécrétées interviennent dans le contrôle de ces événements. Parmi les molécules effectrices impliquées, citons les membres des familles TGF, BMP (*bone morphogenic protein*), FGF et Hedgehog ainsi que des éléments participant à la voie de signalisation Wnt. L'expression précise dans le temps et l'espace de ces molécules régit la signalisation chimique qui active les gènes propres à la différenciation des follicule pileux. Les mécanismes impliqués dans la formation embryonnaire du poil sont étroitement apparentés à ceux qui contrôlent sa croissance cyclique. Par conséquent, le follicule pileux adulte est un outil idéal pour étudier la morphogénèse.

Les gènes Hox (*homeobox*) participent au positionnement des différents organes et annexes cutanées d'un embryon lors de son développement. L'expression de la majorité des gènes Hox a été identifiée dans un ou l'autre des compartiments de différenciation du follicule pileux (papille folliculaire, *IRS*, *ORS*, renflement, tige du poil) lors de son développement (Awgulewitsch, 2003). La transcription de gènes Hox a également lieu à des endroits et à des moments précis au cours du cycle du poil mature (Awgulewitsch, 2003; Shang *et al.*, 2002). Les facteurs de transcription codés par les gènes Hox reconnaissent les domaines homéobox. Or, plusieurs molécules à domaine homéobox sont impliquées dans le contrôle de la différenciation du follicule pileux. Notamment, *Msx-1*,

Msx-2 et les membres de la famille Lef1/Tcf (Lef1 : *lymphoid enhancer factor-1* ; Tcf : *T-cell factor*) (Awgulewitsch, 2003).

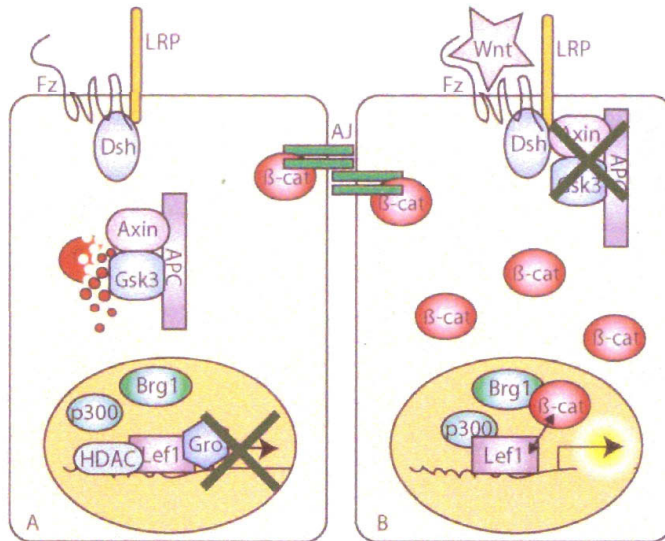


Figure I-5
Schématisme de la voie de signalisation Wnt

(A) Sans activation du récepteur Frizzled (Fz), la β -caténine (β -cat) produite en excès est rapidement phosphorylée par la *glucogen synthase-3* (GSK-3) et devient cible de la dégradation par le protéasome. Lef1 a la faculté de se lier à l'ADN mais est inapte à activer la transcription à lui seul. (B) Lorsqu'un ligand de la famille Wnt est présent dans le milieu extracellulaire, sa liaison au récepteur Frizzled permet à

Dishevelled (Dsh) d'inactiver la GSK-3, permettant ainsi la translocation de la β -caténine au noyau; le complexe formé entre β -cat et Lef1 active la transcription de gènes cibles. Schéma tiré de Alonso et Fuchs 2003, *Genes Dev*, 17 :1189-1200.

Autant chez l'humain que chez la souris, les gènes *Msx-1* et *Msx-2* s'expriment dans les structures cutanées adultes ou bien au cours de leur développement (Stelnicki *et al.*, 1997; Stelnicki *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999). Les facteurs *Msx-1* et *Msx-2* participeraient notamment au contrôle de l'induction de la croissance des annexes (Noveen *et al.*, 1995). *Msx-2* serait également impliquée dans la modulation de la taille et de la longueur du cycle du poil (Jiang *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999).

La voie de signalisation Wnt est particulièrement importante dans la différenciation du follicule pileux. Elle est impliquée à trois niveaux connus : 1) dès l'initiation de leur formation à partir de l'ectoderme embryonnaire, 2) au cours de la différenciation de ses cellules souches (section I.4.2.4.1) et 3) lors du contrôle de la différenciation des différentes cellules formant sa tige et son *IRS* à partir du bulbe (voir sections I.5.2.1.1 et I.5.2.1.2).

La voie de signalisation Wnt fait intervenir une molécule qu'on retrouve dans le complexe des jonctions adhérentes: la β -caténine. Sans signal Wnt, la β -caténine qui n'est pas intégrée pour les jonctions adhérentes, est rapidement phosphorylée par la GSK-3 (*glycogen synthase kinase-3*) présente dans le cytoplasme. La β -caténine, ainsi phosphorylée, est alors rapidement dégradée par la machinerie du protéasome (Figure I-5). Or, l'activation du récepteur Frizzled par un ligand Wnt permet à la protéine Disheveled d'inhiber la GSK-3. En conséquence, la β -caténine, ainsi protégée de la dégradation, est transloquée au noyau où elle va interagir avec les facteurs de transcription de la famille Lef1/Tcf si ces derniers sont présents.

Lors de l'induction de la folliculogénèse, la molécule Noggin, via son action inhibitrice sur BMP-4, permet l'expression de Lef1 dans certaines cellules de l'ectoderme embryonnaire. L'activation parallèle de la voie Wnt est cependant nécessaire à la formation du complexe Lef1/ β -caténine dans le noyau de ces cellules et mène à la diminution de l'expression de la E-cadhérine des jonctions adhérentes, expression qui est nécessaire à l'allongement du poil dans le derme lors de sa formation (Botchkarev *et al.*, 1999; Botchkarev *et al.*, 2001; Botchkarev *et al.*, 2002; Jamora *et al.*, 2003).

1.3.1.1.3 La transition télogène-anagène

Les mécanismes moléculaires impliqués lors de la transition entre la phase télogène et la phase anagène ne sont pas encore parfaitement compris. Plusieurs théories ont été émises à ce sujet. Notamment, la théorie de l'activation de la prolifération des cellules souches par les fibroblastes de la papille folliculaire, qui sont à leur proximité lors de la phase télogène (voir Figure I-4). Cette supposition est intitulée « *the bulge activation hypothesis* » (Cotsarelis *et al.*, 1990). Cependant, les signaux précis initiant cette prolifération n'ont jamais été identifiés. L'hypothèse très ancienne, émise par Chase en 1954, intitulée *inhibition-desinhibition* récolte aujourd'hui plusieurs arguments en sa faveur. Dans cette hypothèse, il est proposé qu'à la fin de la phase télogène, l'arrêt d'un mécanisme d'inhibition de la prolifération cellulaire permettrait l'initiation de la phase anagène. En plus de travaux ayant permis de montrer que le poil en télogène contenait des

substances inhibant sa croissance, les nouvelles données disponibles suggèrent que la formation du follicule pileux est contrôlée par un mécanisme d'inhibition impliquant BMP-4 et Noggin (Botchkarev *et al.*, 1999; Botchkarev *et al.*, 2001; Jamora *et al.*, 2003). De plus, l'équipe de KobielaK a récemment suggéré un modèle dans lequel une inhibition séquentielle, suivie d'une activation des récepteurs BMPR1a (*Bmp receptor 1a*), seraient nécessaires à la différenciation des cellules de la matrice (KobielaK *et al.*, 2003). Cependant, puisque plusieurs facteurs de croissance et substances tels que le KGF (*keratinocyte growth factor*), le HGF (*hepatocyte growth factor*), Shh, le TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*), le minoxidil et certains antagonistes des oestrogènes sont capables d'induire la phase anagène, une libération précise d'inhibiteurs et d'activateurs orchestre sans doute le cycle du poil (pour une synthèse des molécules impliquées dans le contrôle du cycle du poil, voir Stenn, 2001).

1.3.1.1.4 Les particularités du cycle cellulaire de la vibrisse

Les vibrisses sont les premiers poils à se former et à émerger à la surface cutanée chez le rongeur. Outre leur taille importante, une des différences les plus marquées entre les vibrisses et les poils du pelage, est que leur cycle de croissance est très long (Young et Oliver, 1976). Une autre dissemblance est que le follicule de la vibrisse ne raccourcit pas lors de la phase catagène (Young et Oliver, 1976). Ainsi, contrairement au poil du pelage, la phase catagène de la vibrisse est surtout associée à une différenciation terminale plutôt qu'à une phase de dégénération. De plus, sa phase télogène est très courte (environ 3 jours) et le début d'un nouveau cycle de croissance s'effectue avant même que la différenciation de la vibrisse précédente ne soit complétée. Par conséquent, les cellules de la matrice sont presque en prolifération continue.

Les changements morphologiques associés au cycle de la vibrisse concernent surtout les cellules de la matrice et de la papille folliculaire (Ibrahim et Wright, 1975; Young et Oliver, 1976) et sont détaillés dans la Figure I-6.

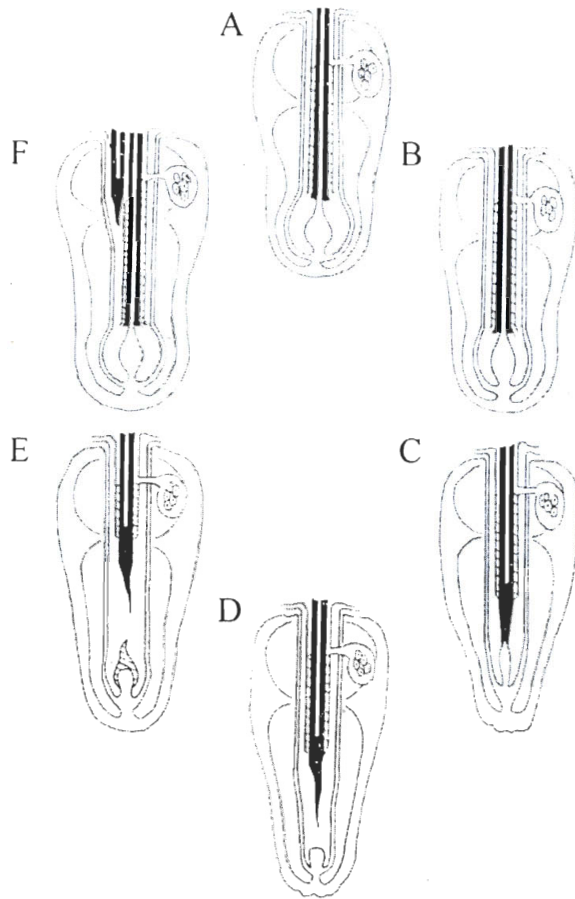


Figure I-6 Les changements morphologiques associés au cycle cellulaire de la vibrisse.

A) Vibrisse en phase anagène. Lors de la phase anagène, les cellules de la matrice prolifèrent de façon active et entourent presque complètement la papille folliculaire formant un col à la base du follicule. La papille folliculaire a l'aspect d'une poire qui se prolonge dans la moelle de la tige, mais reste néanmoins en continuité avec la couche mésenchymateuse du follicule et du collagène dermique au niveau du col. La période d'anagène dure environ 4 semaines et la vibrisse s'allonge à raison d'1 mm par jour approximativement. B-E) Vibrisse en phase catagène. Le début de la phase catagène est caractérisé par une diminution de la prolifération des cellules de la matrice et d'une réduction de leur volume. Cet arrêt de croissance se traduit par un ralentissement de l'émergence de la vibrisse à la surface de la peau qui s'étend sur un intervalle

d'environ 1 semaine. La papille se prolonge vers le haut et le col formé par les cellules matricielles s'élargit. Tout au long de la phase catagène, les cellules épithéliales du poil continuent leur maturation malgré l'arrêt de croissance des cellules de la matrice. Un arrêt de production cellulaire destinée à l'IRS, le cortex et la moelle est observé seulement à la fin de la phase catagène. À ce moment, l'ancienne vibrisse se sépare de la papille et est progressivement poussée vers la surface de la peau. Les cellules de la matrice sont alors indistinguables de celles de l'ORS. F) Vibrisse en phase télogène. Lors de la phase télogène, la taille de la papille folliculaire continue de diminuer et cette dernière devient très compacte. La nouvelle phase d'anagène commence par une prolifération des cellules de la matrice et la kératinisation recommence avant même que la papille soit à nouveau entourée de cellules épithéliales. L'expulsion de l'ancienne vibrisse peut prendre plusieurs semaines. Ainsi, il arrive fréquemment que deux vibrisses émergent du même follicule. Schéma adapté de Young et Oliver, 1976, J. Embryol. Exp. Morphol., 36 : 603-604.

I.3.1.1.5 La transition télogène-anagène de la vibrisse

Lors de l'initiation d'un nouveau cycle de croissance (transition télogène-anagène) des poils de petit calibre (pelage), les fibroblastes de la papille folliculaire se trouvent à proximité des cellules souches de la région du renflement. Or, la taille importante de la vibrisse par rapport au poil du pelage et l'absence de régression du follicule pileux de ce poil spécialisé empêchent ce rapprochement. Oshima et son équipe ont observé qu'au niveau de la vibrisse du rat, un nombre important de kératinocytes clonogéniques (une propriété de cellule souche, voir section I.4.2.2.3) est présent dans la portion inférieure de la vibrisse et ce, vers la fin de la période de ralentissement de croissance (transition télogène-anagène) (Oshima *et al.*, 2001). Ces observations furent corrélées à un déplacement de cellules provenant du renflement, suggérant qu'il existe un certain trafic cellulaire de cellules souches au sein de la vibrisse. Ce mécanisme existe peut-être afin de faciliter l'interaction entre ces dernières et la papille folliculaire. Cependant, les molécules ou les facteurs régissant ces mouvements sont inconnus.

I.4 Les cellules souches

I.4.1 Définitions des différents types de cellules souches

La cellule souche totipotente est en théorie la mère de tous les types cellulaires. Par définition, elle est capable de s'autorenouveler indéfiniment (Kirschstein et Skirboll, 2001). Cependant, tous les précurseurs n'ont pas le même potentiel de prolifération. Ainsi, une terminologie des différents types de cellules souches a été établie afin d'éviter les confusions (Kirschstein et Skirboll, 2001) :

Totipotente : Cellule qui a la capacité de donner lieu aux membranes et tissus extra-embryonnaires, à l'embryon et à tous ses tissus et organes.

L'ovule fertilisé est le meilleur exemple d'une cellule souche totipotente.

Pluripotente : Cellule indifférenciée qui a la capacité de donner lieu à toutes les cellules dérivées des trois lignées germinales embryonnaires (endoderme, ectoderme et mésoderme).

Par exemple, les cellules du bourgeon embryonnaire de l'embryon au stade blastocyste.

Multipotente : Cellule indifférenciée qui a la capacité de donner lieu à plusieurs types cellulaires d'une ou plusieurs lignées germinales embryonnaires.

Les cellules souches de la peau sont un exemple (voir section I.4.2.2.4).

Unipotente : Cellule indifférenciée qui peut seulement se développer dans une voie de différenciation particulière.

Selon leur provenance, différentes catégories de cellules souches existent :

Cellule souche embryonnaire (ES, *embryonic stem cell*) : Cellule indifférenciée pluripotente provenant du bouton embryonnaire du blastocyste.

Cellule souche germinale (EG, *embryonic germ cell*) : Cellule indifférenciée pluripotente prélevée dans les crêtes gonadales (future gamète) d'un embryon/fœtus.

Cellule souche cancéreuse (EC, *embryonal carcinoma cell*) : Cellule indifférenciée pluripotente dérivant d'un tératome (cancer qui dérive d'un gamète).

Cellule souche adulte (ou post-natale) : Cellule indifférenciée, habituellement multipotente ou unipotente, qui se trouve dans un tissu spécialisé d'un organisme après sa naissance.

I.4.2 Les cellules souches cutanées

Les travaux de recherche portant sur les cellules souches cutanées se sont surtout concentrés sur les cellules épithéliales de l'épiderme et des follicules pileux. Or, une équipe

canadienne a publié une série d'articles portant sur l'isolement et la caractérisation de cellules souches provenant du derme (Fernandes *et al.*, 2004; Toma *et al.*, 2001; Toma *et al.*, 2005). Ces précurseurs dermiques, identifiés chez l'humain et la souris, expriment des marqueurs de différenciation propre à des tissus spécialisés du mésenchyme (cellules musculaires lisses, adipocytes) et de façon surprenante, à des lignées d'origine neuroectodermique (neurones, cellules gliales) en culture. Les précurseurs du derme, du moins une certaine proportion, proviendraient de la crête neurale (Fernandes *et al.*, 2004). Cependant, les travaux qui ont suivi cette découverte n'ont pas permis d'établir clairement la localisation de ces cellules in situ, ni leur rôle dans l'homéostasie normale ou la régénération du tissu cutané. Néanmoins, il est fascinant de constater qu'à partir d'une simple biopsie de peau, il est possible d'extraire et de cultiver plusieurs types cellulaires différents, dont des cellules originant de feuilletts embryonnaires distincts (ectoderme, neuroectoderme et mésoderme).

I.4.2.1 Les cellules souches épithéliales cutanées

Le développement de la recherche sur les cellules souches cutanées a été relativement lent en raison du manque de marqueurs spécifiques permettant la manipulation de cellules souches en laboratoire. Jusqu'à maintenant, les différents travaux d'identification et de caractérisation des cellules souches se sont basés sur des concepts. Notamment, le concept de niche, l'autorenouvellement, le cycle cellulaire lent, le caractère clonogénique, l'aspect peu différencié et la multipotentialité (Kirschstein et Skirboll, 2001). La localisation même des cellules souches cutanées a été l'objet d'une controverse qui a perduré pendant plusieurs années. Récemment, des percées dans ce domaine ont permis, grâce au développement d'outils puissants, d'isoler les cellules souches en conservant leur viabilité (Blanpain *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 1990; Tumber *et al.*, 2004). Ces approches novatrices ont enfin permis de concilier certains concepts théoriques avec la réalité. Les différents critères d'identification des cellules souches sont expliqués dans cette section et les principales évidences expérimentales identifiant de telles propriétés chez les cellules souches épithéliales cutanées sont passées en revue.

I.4.2.2 Caractéristiques des cellules souches épithéliales cutanées

I.4.2.2.1 La spécification du caractère « souche »: le concept de la niche

Le concept de niche fut proposé, il y a plus d'une trentaine d'années, en tant que mécanisme contrôlant le phénotype de la cellule souche (Lin, 2002; Ohlstein *et al.*, 2004). Dans cette idée, il est proposé que l'environnement extracellulaire de la cellule souche contrôle le maintien de ses caractéristiques et de sa fonctionnalité. Citons par exemple les interactions tridimensionnelles avec la matrice extracellulaire et les cellules voisines, ou encore la concentration locale de facteurs morphogénétiques (le concept de la niche est schématisé dans la Figure I-7). L'importance de la niche est constatée lorsque des cellules embryonnaires souches sont introduites dans le tissu musculaire, une niche inadéquate pour ce type de cellules souches, ce qui entraîne le développement de tératomes (Thomson *et al.*, 1998).

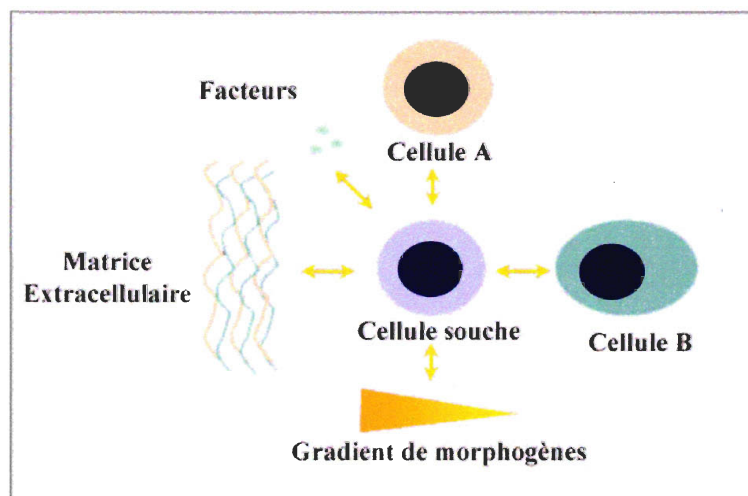


Figure I-7
Schématisation du concept de la niche

Dans la peau sans poil, les cellules souches ont été identifiées au fond des crêtes épidermiques les situant ainsi au plus profond de l'épiderme (Lavker et Sun, 1982; Michel *et al.*, 1996). Elles sont en conséquence mieux protégées contre le frottement et les blessures superficielles de la peau que les kératinocytes situés plus en surface. Dans la peau velue, des chercheurs ont identifié des kératinocytes présentant certaines propriétés associées aux cellules souches au sommet des crêtes épidermiques de l'épiderme

interfolliculaire (Jones et Watt, 1993; Lowell *et al.*, 2000; Watt, 2002a). La pertinence physiologique de cette niche est toutefois contestée. En effet, les cellules souches, étant près de la surface cutanée, sont vulnérables à la destruction.

La région du renflement des follicules pileux est considérée comme une niche incontestable de cellules souches (Akiyama *et al.*, 1995; Blanpain *et al.*, 2004; Cotsarelis *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 2004; Oshima *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2000; Tumber *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2004). Cette région est abondamment vascularisée et innervée. En plus de faire partie de la portion permanente du poil (ne régresse pas lors de la phase catagène), le renflement résiste à l'arrachement du follicule pileux. De façon intéressante, les résultats de Nishimura et son équipe ont indiqué en 2002, que les précurseurs des mélanocytes étaient également localisés dans le renflement des follicules pileux. Cette région semble donc fournir des conditions qui régissent le phénotype de différents types de cellules souches.

1.4.2.2 Autorenewement et division asymétrique

L'explication du phénomène d'autorenouvellement des cellules souches fait souvent référence à un principe de division asymétrique. Selon ce principe, une des deux cellules générées suite à la division de la cellule souche s'engage dans le processus de différenciation terminale tandis que l'autre conserve son phénotype de cellule souche (ce concept est schématisé dans la Figure I-8). La division asymétrique serait contrôlée par des mécanismes tels que la génération de polarité cellulaire, l'orientation des microtubules lors de la mitose et la ségrégation différentielle de déterminants pro-différenciation/pro-cellule souche dans chacune des cellule-filles issues de la division (pour une discussion sur ces mécanismes, voir Fuchs *et al.*, 2004). Cependant, l'autorenouvellement d'une cellule n'exige pas que sa division soit asymétrique. Par exemple, une cellule souche peut en se divisant, donner lieu à deux cellules identiques. Suite à un cycle cellulaire additionnel, une de ces cellules peut se voir déplacée hors de la niche des cellules souches sous la pression des nouvelles cellules générées, soit dans un microenvironnement favorisant sa différenciation.

La régénération continue de l'épiderme et des poils ainsi que le maintien à long terme des épidermes cultivés issus de biopsie cutanée après leur greffe sur un patient (Gallico *et al.*, 1984) sont des preuves indirectes d'un autorenouvellement des cellules

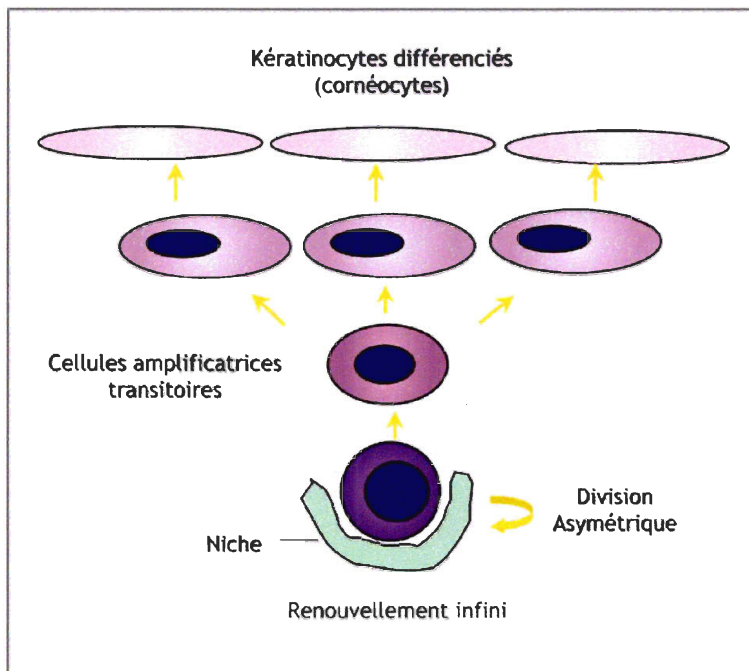


Figure I-8 Le concept de la division asymétrique

souches de la peau. Une équipe de chercheurs a récemment étudié le comportement en culture de kératinocytes provenant de la région du renflement des poils du pelage de la souris. Au fil des passages, le nombre de colonies de kératinocytes obtenu par repiquage d'un seul clone de cellules souches restait constant (Blanpain *et al.*, 2004). Ce résultat suggère que les cellules souches se régénèrent en culture et qu'il existe une autorégulation de leur nombre.

L'activité mitotique, l'état de différenciation et la morphogénèse de plusieurs épithélia, notamment celui de la peau, sont influencés par leur association avec une membrane basilaire (Martin *et al.*, 2002; Watt, 2002b). En se liant aux éléments de la matrice extracellulaire, les récepteurs de la famille des intégrines sont des régulateurs importants de l'homéostasie de l'épiderme et des poils (Watt, 2002b). Le niveau d'expression des différentes sous-unités d'intégrines varie selon l'état de différenciation

des cellules au sein des épithélia (Watt, 2002b). Par exemple, une plus grande quantité de la sous-unité $\beta 1$ et de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ a été dénotée à la surface de cellules aux propriétés souches (Jensen *et al.*, 1999; Jones et Watt, 1993; Jones *et al.*, 1995; Michel *et al.*, 1996; Tani *et al.*, 2000; Watt, 2002b). La force et la spécificité de liaison entre les intégrines de la cellule souche et la matrice extracellulaire de sa niche représente un mécanisme potentiellement impliqué dans la modulation de leur statut de différenciation (van der Flier et Sonnenberg, 2001).

La voie de signalisation Notch est un mécanisme moléculaire très conservé au cours de l'évolution. Cette voie participe au contrôle de la différenciation cellulaire (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Ce procédé implique des interactions réciproques entre le récepteur Notch et ses ligands, soient les membres des familles Delta et Serrate/Jagged, situés sur les cellules voisines. La cascade de signalisation qui résulte de l'activation des récepteurs Notch mène à un rétrocontrôle de leur propre expression. Ceci conduit à une distribution différentielle des récepteurs Notch entre deux cellules adjacentes. Ainsi, la machinerie Notch est impliquée dans la formation de domaines de différenciation cellulaire lors de plusieurs événements du développement (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999).

Au niveau de la peau, la voie de signalisation Notch participe au contrôle de la croissance et de la différenciation des kératinocytes (Lefort et Dotto, 2004; Lowell *et al.*, 2000; Lowell et Watt, 2001). En effet, Lowell et ses collègues ont dénoté la présence de domaines d'expression élevée de Delta1 au niveau de l'épiderme humain (Lowell *et al.*, 2000). Ils ont décrit les kératinocytes composant ces domaines comme ayant un aspect peu différencié et exprimant fortement l'intégrine $\beta 1$, deux critères d'identification des cellules souches cutanées (Bickenbach et Chism, 1998; Jones *et al.*, 1995). De plus, ils ont remarqué que l'expression forcée de Delta1 dans des kératinocytes en culture provoque la différenciation des kératinocytes adjacents via l'activation de Notch1. Ces travaux suggèrent qu'une asymétrie d'expression des récepteurs Notch1 et Delta1 est impliquée dans la formation de domaine de différenciation à l'intérieur de la couche basale de la peau (Lowell *et al.*, 2000). Par ailleurs, au cours du développement et du cycle des follicules pileux, il existe une expression différentielle et dynamique des

différentes variantes de Notch et de ses ligands (Favier *et al.*, 2000; Kopan et Weintraub, 1993). En 2003, Yamamoto et son équipe ont étudié la répercussion de l'inactivation de Notch 1 ou de RBP-J, un effecteur de transcription en aval de la voie de signalisation Notch, au niveau de l'épiderme et de l'ORS de souris transgéniques. Une augmentation du nombre des couches de kératinocytes différenciées au sein de l'épiderme, ainsi qu'une perte des poils, qui se sont transformés en kyste à caractère épidermique, furent observées dans ces souris (Yamamoto *et al.*, 2003). Ce phénotype ressemble beaucoup à celui résultant de l'interruption de la voie Wnt (Huelsenken *et al.*, 2000; Niemann *et al.*, 2002) (voir section I.4.2.4.1). À cet égard, il est possible que des interactions croisées existent entre les voies de signalisation Wnt et Notch et qu'elles coordonnent la différenciation des kératinocytes.

Les différents isotypes de cadhérines formant les jonctions adhérentes sont d'autres candidats intéressants à la modulation de l'asymétrie de la niche des cellules souches. En effet, ces complexes sont capables de coupler l'adhésion avec la signalisation nucléaire et cytoplasmique (Jamora et Fuchs, 2002). Récemment, des scientifiques ont découvert que l'activation de la voie Wnt module l'expression de la cadhérine E lors de l'induction de la formation des follicules pileux à partir des cellules souches de l'ectoderme embryonnaire (Jamora *et al.*, 2003). Ceci est un exemple de mécanisme permettant d'établir une polarité cellulaire qui renseigne sur la position de la cellule souche dans un environnement.

Des études récentes ont mis en évidence le caractère asymétrique de la niche des cellules souches des poils du pelage de la souris (Blanpain *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2004; Tumber *et al.*, 2004). Dans ces travaux, le niveau de transcription de plusieurs gènes de cellules souches fut analysé par micropuces (*microarray*) et révéla que les cellules souches en contact avec la membrane basilaire de la région du renflement expriment un profil d'ARNm qui leur est propre (Blanpain *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2004; Tumber *et al.*, 2004). Parmi ces ARNm, plusieurs codent des protéines de la matrice extracellulaire et des complexes d'adhésion (cadhérine-7, collagène 18a1, ténascine). Ces résultats suggèrent que les cellules souches organisent leur niche tout en communiquant entre elles.

En résumé, un contact étroit entre la cellule souche et la matrice extracellulaire via les intégrines, ainsi que les liaisons établies avec les cellules voisines via des jonctions

adhérentes, ou encore les récepteurs de la famille Notch et ses ligands, permettent sans doute d'établir une polarité cellulaire ainsi que d'intégrer et de transmettre les informations de l'environnement extracellulaire à la machinerie de signalisation des cellules souches, leur procurant ainsi un profil de transcription qui leur est propre.

1.4.2.2.3 La dynamique de division des cellules souches

Une cellule souche doit présenter deux propriétés pour satisfaire le principe d'autorenouveaulement : 1) un cycle cellulaire long (à l'intérieur d'une niche appropriée) et 2) un grand potentiel de prolifération intrinsèque. Un long cycle de division cellulaire permet de minimiser le risque d'erreur de réplication de l'ADN et de restreindre le nombre de division que doit subir la cellule souche au cours de la vie de l'animal. Le cycle cellulaire long est de loin la propriété la plus utilisée pour identifier les cellules souches *in situ*. En contre-partie, la démonstration du plus grand potentiel de prolifération des cellules souches, notamment lorsqu'elles sont soumises aux conditions de culture, sert souvent de confirmation de leur phénotype.

En 1987, Barrandon et Green ont établi une classification des différents types de colonies issus de la culture des kératinocytes. Cette classification fait référence à leur potentiel de prolifération intrinsèque. Ainsi, trois sortes de colonies ont été définies : l'holoclon, le paraclon et le méroclon. L'holoclon est généré par les kératinocytes peu différenciés et capables de subir plusieurs cycles de division. Ce type de colonie a un nombre élevé de cellules de petite taille (avec un rapport surface du noyau/surface du cytoplasme proche de 1) et est généré par la prolifération d'un kératinocyte souche. Le paraclon est issu d'un kératinocyte ayant entamé son processus de différenciation terminal. Sa capacité de prolifération étant peu importante, la colonie générée contient peu de cellules et plusieurs d'entre elles présentent un aspect différencié (cellule de grande taille avec un rapport surface du noyau/surface du cytoplasme $< 0,5$). Le méroclon est une colonie de phénotype intermédiaire entre l'holoclon et le paraclon qui dérive d'une cellule amplificatrice transitoire (Barrandon et Green, 1987; Roachat *et al.*, 1994).

La technique classique d'identification des cellules souches sur la base de leur cycle cellulaire long consiste à incorporer des analogues de nucléotides à leur brin d'ADN (Annexe II). Pour se faire, une solution contenant l'analogue de base est injectée dans l'animal de façon répétée et sur une période de temps prolongée afin de s'assurer que la cellule souche se divise au moins une fois lors de cet intervalle. Les injections s'échelonnent habituellement sur 1 semaine, puisque le renouvellement de l'épiderme de la souris est d'environ 7 jours (Ghazizadeh et Taichman, 2001). Ainsi, toutes les cellules qui se sont multipliées lors de cette période se retrouvent marquées. Lors de la division cellulaire, les brins d'ADN se partagent entre deux cellule-filles. Ainsi la quantité d'analogues de nucléotides incorporée au brin d'ADN diminue à chaque multiplication cellulaire. Avec le temps, les cellules s'étant divisées le moins souvent conservent une plus grande quantité de marquage. Ces cellules sont nommées *LRCs* (*label-retaining cells*). Elles peuvent être identifiées sur des coupes histologiques ou des cellules en suspension fixées. Il faut cependant considérer le fait qu'une cellule en division au moment du marquage, mais qui a cessé de croître par la suite, conserve aussi l'analogue de base incorporé à son ADN. La propension à retenir les bases de nucléotides n'est donc pas un critère strict d'identification des cellules souches.

Sur la base de la conservation à long terme d'analogues de base, les cellules souches de la peau de souris ont tout d'abord été identifiées au centre d'unités de prolifération situées au sein de l'épiderme (Bichenbach, 1981; Morris et Potten, 1994). Par la suite, des kératinocytes retenant le marquage de façon encore plus persistante furent observés à l'intérieur du follicule pileux dans l'*ORS* de la région du renflement (Cotsarelis *et al.*, 1990; Morris et Potten, 1999). De plus, l'analyse clonale des kératinocytes du renflement des poils humains et des vibrisses a permis de confirmer leur important potentiel de prolifération (Kobayashi *et al.*, 1993; Oshima *et al.*, 2001; Rochat *et al.*, 1994). D'ailleurs, Oshima et son équipe ont évalué que 1040 holoclones étaient générés, en moyenne, par les kératinocytes provenant d'un seul renflement de vibrisse (Oshima *et al.*, 2001). Cependant, puisqu'il n'existe pas de consensus définissant la quantité minimale de cellules qu'une colonie doit contenir pour être considérée comme un holoclon, ce chiffre ne reflète pas nécessairement la quantité de cellules souches présentes dans la vibrisse.

Une stratégie très ingénieuse a récemment été mise au point pour sélectionner les cellules souches sur la base de leur cycle cellulaire lent. Il s'agit d'un système d'expression de la protéine fluorescente GFP (*green fluorescent protein*) au niveau des histones des noyaux (Kanda *et al.*, 1998), sous le contrôle d'un élément de réponse modulable par la tétracycline (*TRE, tetracycline-responsive regulatory element*) (Tumbar *et al.*, 2004). Cet élément de réponse se positionne en aval du promoteur de la kératine 5 afin de cibler l'épithélium de la peau et des poils (qui expriment cette kératine dans leur couche basale). Dans ce système, le traitement à la tétracycline empêche la production de la GFP. Ainsi, tous les noyaux des cellules de la peau des souris K5-tetVP16-TRE-H2B-GFP sont fluorescents au départ. Suite à une administration prolongée de tétracycline, seuls les noyaux des cellules s'étant divisées peu souvent demeurent fluorescents (Tumbar *et al.*, 2004). L'avantage de ce système est qu'il permet de trier les cellules souches par cytométrie de flux tout en les maintenant vivantes ce qui rend possible des études *in vitro* et *in vivo* subséquentes. De plus, puisque chaque division se traduit par une diminution de l'expression de la GFP, la quantification de la fluorescence permet d'évaluer les mouvements de la descendance immédiate des cellules souches.

L'analyse des souris K5-tetVP16-TRE-H2B-GFP ayant subi un traitement de 2 mois à la tétracycline a permis de confirmer que les kératinocytes du renflement des poils de pelage conservaient le plus haut taux de marquage à la GFP et que ces kératinocytes démontraient un comportement clonogénique en culture (Tumbar *et al.*, 2004). Toujours dans le renflement des poils du pelage, une intensité de GFP importante fut identifiée dans les noyaux de kératinocytes n'établissant aucun contact avec la membrane basilaire (Blanpain *et al.*, 2004). Les travaux de caractérisation de cette population *LRC* secondaire ont démontré leur caractère souche *in vitro* et *in vivo* (Blanpain *et al.*, 2004). Cette découverte est importante car elle vient à l'encontre du dogme voulant que le contact avec une membrane basilaire est obligatoire au maintien du phénotype souche. L'importance fonctionnelle ainsi que les caractéristiques phénotypiques de cette population secondaire de cellules souches au sein de la niche du follicule pileux restent toutefois inconnues.

Le profil d'expression des ARNm dans les cellules souches du renflement des poils du pelage semble en faveur d'une suppression de la prolifération et de la différenciation, comme en témoigne l'expression accrue d'inhibiteurs de la prolifération (FGF18, BMP6, p27) et de la voie Wnt. En contre-partie, l'expression des gènes de prolifération (Ki67, PCNA, cyclines D2, A2, B1 et B2) est diminuée (Blanpain *et al.*, 2004; Tumber *et al.*, 2004). Ces données suggèrent que la niche peut gouverner, du moins en partie, la nature quiescente et peu différenciée des cellules souches.

1.4.2.2.4 Multipotentialité

Trois types cellulaires principaux sont présents au sein de la portion épithéliale de la peau : les kératinocytes épidermiques, les sébocytes des glandes sébacées et les kératinocytes du follicule pileux ou trichocytes.

Les kératinocytes du follicule pileux peuvent changer de programme de différenciation et se diriger vers la lignée épidermique. En effet, suite à une blessure cutanée importante menant à une perte, partielle mais sévère, de l'épiderme, les cellules souches des poils résiduels parviennent à régénérer l'épiderme (Argyris, 1976). Par ailleurs, les kératinocytes des poils peuvent être utilisés pour fabriquer des épithélia ou des peaux reconstruites en culture (Lenoir *et al.*, 1988; Limat *et al.*, 1993).

En 2000, les travaux effectués par Taylor et son équipe ont démontré, hors de tout doute, que les cellules souches des poils du pelage de la souris participent à l'homéostasie de l'épiderme interfolliculaire (Taylor *et al.*, 2000). Ce résultat a été confirmé dans un article récent publié dans le journal de prestige *Science* (Tumber *et al.*, 2004). En plus de l'épiderme, les cellules souches de la région du renflement sont également à la source des sébocytes (Blanpain *et al.*, 2004; Merrill *et al.*, 2001; Oshima *et al.*, 2001; Panteleyev *et al.*, 2000; Tumber *et al.*, 2004).

Certaines équipes ont posé l'hypothèse que diverses cellules souches seraient à la source des trois lignées de différenciation principales du follicule pileux (tige, *IRS*, *ORS*) et des glandes sébacées au sein d'un même appareil pilo-sébacé (Ghazizadeh et Taichman,

2001; Kamimura *et al.*, 1997). Récemment, une preuve concrète de la multipotentialité des cellules du renflement a été fournie par Blanpain et son équipe. Leur méthode consistait à combiner des kératinocytes d'un clone issu d'une cellule *LRC* du renflement avec des fibroblastes dermiques de souriceaux nouveau-nés, une technique qui permet la formation de poils complets après la greffe (Lichti *et al.*, 1993; Lichti *et al.*, 1995; Weinberg *et al.*, 1993). L'analyse des greffons a permis de confirmer que toutes les cellules des compartiments de différenciation épithéliaux cutanés dérivait des kératinocytes greffés (Blanpain *et al.*, 2004).

Qu'en est-il du caractère mutipotentiel des cellules de l'épiderme interfolliculaire et de la peau glabre? Tel que mentionné dans la section I.2.3.1.3, les fibroblastes de la papille folliculaire du poil possèdent le pouvoir d'induire la formation de follicules pileux. C'est en associant de tels fibroblastes avec des épidermes de peau palmaire et plantaire, et en transplantant ces combinaisons cellulaires sur des souris athymiques, que Reynolds et son équipe ont démontré la capacité de la peau glabre à former des follicules pileux (Reynolds et Jahoda, 1992). Lors de travaux récents, les premières étapes de la folliculogénèse ont été induites dans l'épiderme plantaire de souris adultes suite à l'expression d'une forme constitutivement stabilisée de la β -caténine dans les kératinocytes (Lo Celso *et al.*, 2004). Ces observations évoquent que le programme de différenciation des kératinocytes de l'épiderme plantaire peut être modifié. Cependant, une « transdifférenciation » de cellules épidermiques en follicule pileux n'a jamais été observée en condition d'homéostasie.

L'injection de cellules souches de renflement de poils, ayant incorporé un gène rapporteur de façon permanente, dans un embryon au stade blastocyste a permis de montrer que le programme de différenciation des cellules souches cutanées pouvait être changé lorsqu'elles étaient introduites dans une nouvelle niche. En effet, des cellules marquées ont été retrouvées dans la majorité des tissus (d'origine ectodermique, mésodermique, endodermique ou de la crête neurale) chez les souris adultes (Liang et Bickenbach, 2002).

I.4.2.2.5 *Le caractère peu différencié*

Logiquement, le phénotype d'une cellule souche devrait présenter peu de critères de spécialisation biochimiques et structuraux. En 1995, Akiyama et son équipe ont bien décrit l'aspect peu différencié des kératinocytes de la région du renflement des cheveux humains en formation. En effet, ils ont observé, lors d'analyses ultrastructurales, que ces cellules possédaient une faible quantité d'organites dans leur cytoplasme (y compris les filaments intermédiaires), qu'elles étaient de petite taille et qu'elles étaient de forme régulière et arrondie (Akiyama *et al.*, 1995). Lorsque les cellules souches basales des poils sont étudiées par cytométrie de flux, ces caractéristiques morphologiques se manifestent par une faible granulosité cytoplasmique (paramètre SSC ou *side scatter*) et un court diamètre (paramètre FSC ou *forward scatter*) (Bichenbach, 1981; Lavker et Sun, 1982; Matic et Simon, 2003).

I.4.2.3 **Identification des cellules souches cutanées**

Encore aujourd'hui, l'étude des cellules souches cutanées est difficile car aucune protéine ou caractéristique associée exclusivement à ces cellules n'a été découverte. Il semble que lors de l'engagement des cellules souches dans le processus de différenciation, les caractéristiques de la différenciation s'acquièrent graduellement. Les différents marqueurs potentiels identifiés au niveau des cellules souches sont probablement présents dans leur descendance proche. Ainsi, même si la localisation des cellules souches est connue, leur nombre exact ne l'est pas.

La détection de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines est fréquemment utilisée pour identifier les cellules souches de la peau. En effet, en 1993, l'équipe de Jones publia que le niveau d'expression des intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ était élevé dans les kératinocytes épidermiques démontrant des propriétés de cellules souches (Jones et Watt, 1993). Ces récepteurs sont aussi présents, en quantité moins élevée, dans les autres kératinocytes de la couche basale ainsi que dans ceux des premières couche suprabasales. Par conséquent, les cellules souches démontrent une affinité de liaison au collagène IV, le substrat des intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$, plus importante (Bickenbach et Chism, 1998; Huelsken *et al.*,

2000; Jones et Watt, 1993; Jones *et al.*, 1995). L'expression de l'intégrine $\alpha6\beta4$, qui fait partie du complexe de l'hémidesmosome, est également plus importante à la surface des cellules souches de l'épiderme et des poils (Kaur et Li, 2000; Tani *et al.*, 2000). L'intégrine $\alpha6\beta4$ se situe seulement sur la surface cellulaire en contact avec la membrane basilaire ce qui permet, grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre ce récepteur, de séparer les cellules basales de leurs voisines suprabasales par cytométrie de flux (Blanpain *et al.*, 2004; Tani *et al.*, 2000; Trempus *et al.*, 2003).

D'autres marqueurs de surface cellulaire plus ou moins abondants au niveau des cellules souches furent décrits dans la littérature et sont énumérés dans le Tableau I-2. Puisque chaque marqueur possède ses avantages et ses inconvénients (voir Tableau I-2), ils sont habituellement utilisés en combinaison pour enrichir une suspension de kératinocytes en cellules souches (Blanpain *et al.*, 2004; Tani *et al.*, 2000; Trempus *et al.*, 2003; Tumber *et al.*, 2004; Wan *et al.*, 2003b). Malgré cela, les populations obtenues demeurent hétérogènes.

I.4.2.4 L'engagement des cellules souches cutanées dans le processus de différenciation

Au cours des 5 dernières années, le raffinement des techniques de transgénèse permettant l'expression conditionnelle des gènes, notamment ceux impliqués dans les mécanismes de développement, a permis des avancées considérables dans la compréhension de la différenciation des cellules souches cutanées. Notamment, ces travaux ont révélé que la voie de signalisation Wnt était impliquée dans le contrôle de la différenciation des cellules souches en follicule pileux.

I.4.2.4.1 La voie Wnt : un élément clé dans la régulation du destin des cellules souches cutanées

La voie de signalisation Wnt participe au contrôle du destin d'une variété de types cellulaires. Ainsi, cette voie occupe une place fondamentale tout au long de l'organogénèse.

Tableau I-2 Les principaux marqueurs des cellules souches cutanées

Marqueur	Description	Expression cutanée	Avantages	Inconvénients	Références
Δ N-p63	Dominant négatif naturel du facteur de transcription p63. Cette isoforme est incapable d'activer la transcription et serait impliquée dans le maintien de l'état indifférencié.	Son expression serait plus élevée dans les cellules souches de l'épiderme humain. Exprimée par les cellules souches de la cornée.	Identifié dans les holoclones de kératinocytes en culture.	Localisation nucléaire. Présent dans une proportion des cellules amplificatrices transitoires situées dans la couche basale.	(Pellegrini <i>et al.</i> , 2001)
10G7ag	Antigène de prolifération.	Kératinocyte en division. Absent dans les cellules quiescentes (souches).	La localisation membranaire permet le tri au cytomètre de flux.	N'est pas spécifique à l'état de différenciation.	(Li <i>et al.</i> , 1998), (Kaur et Li, 2000)
CD34	Glycoprotéine exprimée à la surface de différents types de précurseurs (sang, vaisseaux sanguins, muscle squelettique, système digestif).	Exprimé au niveau des kératinocytes basaux et suprabasaux de la région du renflement du follicule pileux chez la souris.	La localisation membranaire permet le tri au cytomètre de flux. N'est pas exprimé dans l'épiderme interfolliculaire.	Ne permet pas de distinguer les cellules basales des suprabasales.	(Trempeus <i>et al.</i> , 2003)
CD71	Récepteur de la transferrine.	Expression diminuée dans les cellules souches de la peau humaine.	La localisation membranaire permet le tri au cytomètre de flux.	N'est pas spécifique à l'état de différenciation.	(Webb <i>et al.</i> , 2004)

Tableau I-2 Suite.

Marqueur	Description	Expression cutanée	Avantages	Inconvénients	Références
Connexine 43	Protéine des jonctions intercellulaires de type GAP retrouvées dans plusieurs types cellulaires (tissu cardiaque, vaisseaux sanguins, tube digestif, tissu mammaire)	Kératinocytes de l'épiderme et des poils, à l'exception des cellules souches (a été fait sur la vibrisse de souris et l'épiderme humain).	Leur localisation membranaire permet le tri au cytomètre de flux.	L'absence totale au niveau des cellules souches n'a pas été formellement démontrée.	(Matic <i>et al.</i> , 1999; Matic et Simon, 2003)
Desmogléine 3 /Desmocolline 3	Cadhérines des desmosomes (épiderme, langue, œsophage).	Desmosomes des kératinocytes suprabasaux, niveau d'expression moins élevé au niveau des cellules souches (a été fait sur la peau plantaire et palmaire humaine).	La localisation membranaire permet le tri au cytomètre de flux.	Exprimées à faible niveau dans tous les kératinocytes basaux de l'épiderme et à niveau élevé dans tous les kératinocytes différenciés.	(Wan <i>et al.</i> , 2003b)
Intégrine : sous-unité $\alpha 6$	Composant transmembranaire des hémidesmosomes présents à la base des épithélia.	Hémidesmosome des kératinocytes basaux (épiderme et follicule pileux chez l'humain et la souris), expression accrue dans les cellules souches.	La localisation membranaire permet le tri au cytomètre de flux et permet de séparer les kératinocytes basaux de leurs voisins suprabasaux.	Exprimée dans tous les kératinocytes basaux (épiderme et poil).	(Blanpain <i>et al.</i> , 2004; Kaur et Li, 2000; Li <i>et al.</i> , 1998)
Intégrine : sous-unité $\beta 1$	Récepteur membranaire des cellules épithéliales et endothéliales.	Membrane des kératinocytes basaux (épiderme et follicule pileux chez l'humain et la souris), expression accrue dans les cellules souches.	La localisation membranaire permet le tri au cytomètre de flux.	Exprimée dans tous les kératinocytes basaux (épiderme et poil).	(Bickenbach et Chism, 1998; Jones et Watt, 1993).

Tableau I-2 Suite.

Marqueur	Description	Expression cutanée	Avantages	Inconvénients	Références
Kératine 15	Filament intermédiaire des cellules épithéliales (épiderme et follicule pileux).	Présente dans les cellules basales du renflement des poils humains et murins.	Puisque son expression est restreinte aux cellules basales de l'épiderme et des poils, son promoteur peut être utilisé pour cibler les cellules de la peau, notamment les cellules souches des poils.	Localisation intracellulaire (les cellules doivent être fixées pour le triage au cytomètre de flux). Aussi observée dans les cellules basales de l'épiderme et des poils.	(Liu <i>et al.</i> , 2003; Lyle <i>et al.</i> , 1998; Morris <i>et al.</i> , 2004)
Kératine 19	Filament intermédiaire des cellules épithéliales (voir section I.6.1.4.2 pour sa distribution).	Marque les cellules basales du renflement des poils humains et murins.	Marque les cellules souches en culture. Ne marque pas l'épiderme interfolliculaire (à l'exception des cellules de Merkel (Fradette <i>et al.</i> , 1995)), et est retrouvée exclusivement dans le renflement des follicules pileux au niveau de la peau.	Localisation intracellulaire (les cellules doivent être fixées pour le triage au cytomètre de flux). Marquerait une certaine proportion des cellules amplificatrices transitoires.	(Akiyama <i>et al.</i> , 1995; Commo <i>et al.</i> , 2000; Michel <i>et al.</i> , 1996; Stasiak <i>et al.</i> , 1989)
Tcf3	Facteur de transcription de la famille Lef1/Tcf	Exprimé dans les cellules basales du renflement (a été fait chez la souris). Lors de l'anagène, son expression s'étend dans les cellules basales sous le renflement (voir section I.4.2.4.1).	Exprimé uniquement au niveau du poil dans la peau. Implication au niveau de la régulation des cellules souches (voir section I.4.2.4.1).	Localisation nucléaire (les cellules doivent être fixées pour le triage au cytomètre de flux).	(DasGupta et Fuchs, 1999; Merrill <i>et al.</i> , 2001)
β -caténine, γ -caténine et cadhérine-E	Protéines des jonctions adhérentes de tous les épithélia.	Expression accrue de γ -caténine, et diminuée de β -caténine et cadhérine E dans les cellules souches (intégrine $\beta 1++$) de la peau glabre humaine.	La localisation membranaire permet le tri au cytomètre de flux.	Expression de ces molécules dans toutes les cellules basales et plusieurs couches suprabasales de la peau et des poils.	(Moles et Watt, 1997) (Akiyama <i>et al.</i> , 2000)

Le groupe des protéines Wnts compte plus de 19 membres qui se lient aux récepteurs à 7 domaines transmembranaires Frizzled. Au sein de la peau adulte et embryonnaire, plusieurs membres de la famille Wnt sont exprimés de façon très précise dans l'espace et dans le temps (Millar *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 2001).

Les travaux de Vangenderen en 1994, qui consistaient à éliminer l'expression du gène codant pour Lef1 au niveau de la peau de souris transgéniques, ont permis de démontrer l'implication de la voie Wnt dans le contrôle de la différenciation folliculaire. En effet, cette modification génétique a mené à la disparition des vibrisses et des poils secondaires du pelage. À l'inverse, l'expression ectopique de Lef1 au niveau de l'épiderme interfolliculaire de souris transgéniques provoque la formation de nouveaux poils (Niemann *et al.*, 2002). D'ailleurs, plusieurs gènes codant pour les kératines spécifiques à la différenciation folliculaire présentent le domaine de liaison du facteur de transcription Lef1 (Zhou *et al.*, 1995).

L'étude des souris TOPGAL (*Lef1/Tcf optimal promoter-β-galactosidase*), dans lesquelles le gène rapporteur de l'enzyme β-galactosidase est sous le contrôle d'un promoteur minimal activé par tous les membres de la famille Lef1/Tcf (DasGupta et Fuchs, 1999), a permis de constater une activité du gène du gène TOPGAL, associée à la présence nucléaire de la β-caténine, dans les cellules souches des poils à un moment précis de leur cycle de croissance : soit lors de l'initiation de la phase anagène (Merrill *et al.*, 2001). Les cellules souches du poil n'expriment pas Lef1 (DasGupta et Fuchs, 1999; Kaufman *et al.*, 2003). Cependant, elles expriment le facteur Tcf3 (DasGupta et Fuchs, 1999). Contrairement à Lef1, Tcf3 agit comme un répresseur de la transcription. Cependant, il devient activateur lorsque le niveau de β-caténine au noyau est important (Merrill *et al.*, 2001). De façon intéressante, l'expression ectopique de Tcf3 dans les cellules basales de l'épiderme de souris modifiées génétiquement supprime plusieurs aspects de la différenciation terminale de l'épiderme. Les kératinocytes épidermiques de ces souris ont plutôt adopté certaines caractéristiques de l'ORS (Merrill *et al.*, 2001). L'ensemble de ces données suggère que le facteur de transcription Tcf3 participe au contrôle du phénotype des cellules souches des poils.

L'analyse des souris transgéniques K14- Δ N87 β -cat, dans lesquelles une version de la β -caténine sans son site d'interaction avec Lef1/Tcf était exprimée sous le contrôle du promoteur de la K14, a révélé que les cellules souches folliculaires changeaient de programme de différenciation en réponse cette mutation. En effet, des kystes à caractère épidermiques se sont développés à partir des cellules souches des poils de ces souris (DasGupta *et al.*, 2002). De telles structures s'observent également dans la peau des souris dont l'expression de la β -caténine est invalidée spécifiquement au niveau des cellules exprimant la K14 (Huelsenken *et al.*, 2001). À l'inverse, l'expression ectopique d'une forme stable de la β -caténine dans les noyaux des cellules basales de l'épiderme de souris induit la formation de nouveaux poils (Gat *et al.*, 1998; Lo Celso *et al.*, 2004). Ces observations suggèrent que la translocation nucléaire de la β -caténine dans les cellules souches mène à leur engagement vers la lignée de différenciation folliculaire, tandis qu'en son absence, les cellules souches se différencient en épiderme par défaut.

Bien que la translocation de la β -caténine au noyau joue un rôle déterminant dans la spécification de la destinée de différenciation folliculaire, à plus faible niveau d'expression nucléaire, elle modulerait plutôt les caractéristiques propres aux sébocytes. En effet, lorsque l'interaction entre la β -caténine et le facteur Lef1 est bloquée dans les cellules souches du renflement des poils il y a, en plus des kystes à caractères épidermiques, développement de structures présentant des particularités de glandes sébacées (DasGupta *et al.*, 2002; Niemann *et al.*, 2002). Il semble que l'expression de la β -caténine à faible niveau favorise la différenciation des sébocytes, entre autres en activant Ihh (*indian hedgehog*), tandis qu'à niveau élevé, c'est la différenciation des poils qui est favorisée cette fois-ci, via l'activation de Shh (*sonic hedgehog*) (DasGupta *et al.*, 2002; Merrill *et al.*, 2001; Niemann *et al.*, 2002; Niemann *et al.*, 2003).

En résumé, même si la façon dont β -caténine active Lef1 est encore peu comprise et dépend probablement de la présence d'autres facteurs et du contexte cellulaire, l'implication de la formation du complexe Lef1/Tcf/ β -caténine sur la différenciation des cellules souches de la peau est indéniable.

1.4.2.4.2 Les gènes ciblés par la voie de signalisation Wnt : implication de c-myc dans la différenciation des cellules souches de la peau

Les gènes codant pour c-myc et la cycline D1 font partie de ceux dont la transcription est induite à la suite de l'activation de la voie Wnt (He *et al.*, 1998; Tetsu et McCormick, 1999; Zhou *et al.*, 1995). Dans un contexte de contrôle de la différenciation des cellules souches, ces molécules sont très intéressantes.

En effet, au cours d'expériences qui consistaient à induire l'expression du gène c-myc dans des kératinocytes humains cultivés, une diminution de l'intégrine $\beta 1$, ainsi qu'une accélération du processus de différenciation des kératinocytes furent observées (Gandarillas et Watt, 1997). L'expression de c-myc semble donc avoir induit les cellules souches à se différencier. De plus, le phénotype des souris dont les kératinocytes basaux des poils et de l'épiderme expriment c-myc évoque la même hypothèse (Arnold et Watt, 2001; Waikel *et al.*, 2001). En effet, une hyperprolifération des kératinocytes de l'épiderme ainsi qu'une perte des poils dans les premières semaines suivant la modification génique ont été observées chez ces souris (Arnold et Watt, 2001). Après 3 mois, de graves ulcérations cutanées ont été constatées et la diminution du nombre de cellules souches fut estimée à 75% (Waikel *et al.*, 2001).

En ce qui concerne l'initiation de la différenciation des cellules souches des poils, il est intéressant d'envisager un mécanisme dans lequel l'activation de la voie Wnt au niveau du renflement mènerait à l'expression de molécules telles c-myc et la cycline D1. Ces dernières pourraient participer à la conversion des cellules souches en cellules amplificatrices transitoires par l'activation de la prolifération cellulaire et la diminution de l'intégrine $\beta 1$, diminution qui a été associée à une modification de l'adhésion à la membrane basilaire et à l'initiation de la différenciation des kératinocytes (Arnold et Watt, 2001; He *et al.*, 1998; Levy *et al.*, 2000; Lowell *et al.*, 2000; Waikel *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1999).

I.5 Les changements associés aux processus de différenciation terminale de la peau

I.5.1 Les changements associés aux processus de différenciation terminale de l'épiderme

I.5.1.1.1 Les principaux évènements caractérisant la différenciation terminale des kératinocytes épidermiques

La fonction de barrière de l'épiderme est assurée par la couche cornée. L'enveloppe cornée mature est composée de filaments de kératine liés de façon covalente avec différentes protéines d'assemblage spécialisées telles que la lorocrine, l'envoplakine, la périplakine, l'involucrine, la filaggrine et des protéines riches en résidus proline, enrobées de lamelles lipidiques (pour une révision des principaux événements de la différenciation épidermique, voir Kalinin *et al.*, 2002). Les transglutaminases (TGases), une famille d'enzymes se spécialisant dans la formation de ponts isopeptidiques N^ε-(γ-glutamyl)lysine, participent à l'assemblage des différents éléments essentiels à la construction de la barrière insoluble qu'est la couche cornée.

Le début de la différenciation épidermique serait initié lors de la perte du contact entre le kératinocyte de la couche basale et la membrane basilaire (Watt, 2002b). Suivant l'arrêt de leur prolifération, les kératinocytes se mettent à produire l'envoplakine et la périplakine, deux protéines qui s'assemblent en tétramères et qui s'associent à la membrane cytoplasmique (Kalinin *et al.*, 2002). Elles seront rejointes par l'involucrine et la TGase1 constituant ainsi l'échafaudage de base à la cornification. Au cours de leur différenciation, les kératinocytes synthétisent des corps lamellaires qui sont remplis de lipides : céramides, acides gras libres et cholestérol. Une étape importante du processus de cornification est l'extrusion du contenu des corps lamellaires, notamment des céramides qui seront liées par la TGase1 aux différentes protéines en place au niveau de la membrane cytoplasmique. Les lipides des corps lamellaires remplaceront petit à petit les lipides de la membrane cytoplasmique et s'organiseront en strates appelées les lamelles intercellulaires.

La loricrine est une protéine très peu soluble qui représente 80% de la masse totale de l'enveloppe cornée. Elle s'accumule dans le cytoplasme des kératinocytes de la couche granuleuse où elle est liée à des protéines riches en résidus proline par la TGase3. Ces complexes sont ensuite joints aux autres protéines de l'enveloppe par la TGase1.

Les filaments intermédiaires (FIs) de kératine (K) sont d'autres composants essentiels à la formation d'une couche cornée fonctionnelle. Au cours du processus de différenciation des kératinocytes épidermiques, les kératines vont se lier à la filaggrine, une protéine associée aux filaments intermédiaires (*IFAP : intermediate filament associated protein*), qui assure leur aggrégation. Les kératines compactées par la filaggrine se joignent ensuite aux protéines de l'enveloppe cornée.

Le processus de cornification va finalement se compléter lorsque les kératinocytes vont perdre leur noyau et leurs organites mettant fin à tout processus métabolique.

1.5.1.1.2 La régulation de la différenciation de l'épiderme

La concentration en calcium intracellulaire augmente avec la différenciation des kératinocytes et plusieurs des événements de la cornification dépendent du calcium, notamment la fonction catalytique des TGases, l'assemblage des desmosomes, puis le contrôle de gènes comme ceux codant pour la K1, la K10 et la loricrine (Rosenthal *et al.*, 1991; Yuspa *et al.*, 1989). Lors de travaux effectués dans notre laboratoire, l'expression de la kinase DLK (*dual leucine zipper kinase*), une MAPKKK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) de la famille MLK (*mixed-lineage kinase*), fut identifiée au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme et associée au processus de cornification des kératinocytes (Germain *et al.*, 2000; Robitaille *et al.*, 2005).

En surface, l'épiderme paraît uniforme. Cependant, son épaisseur varie de façon significative selon la région du corps. Ainsi, l'épiderme palmoplantaire présente une épaisse couche cornée et des crêtes épidermiques qui s'allongent profondément dans le derme tandis que l'épiderme de la peau palpébrale (paupière) est extrêmement mince et ses crêtes sont peu profondes. Des interactions entre l'épiderme et le tissu mésenchymateux

sous-jacent régissent la différenciation de l'épiderme. Cependant, les mécanismes moléculaires qui contrôlent ces phénomènes ne sont pas connus avec précision.

Les données scientifiques disponibles suggèrent la participation de gènes Hox. En effet, l'expression de protéines à domaines homéobox suit un patron spatio-temporel très précis lors du développement de la peau humaine. De plus, la participation des molécules Hoxb4 et Msx-2 dans le contrôle de la prolifération des kératinocytes a été démontrée (Komuves *et al.*, 2002; Stelnicki *et al.*, 1997; Stelnicki *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999). Msx-2 agirait entre autres, en modulant l'expression de la sous-unité d'intégrine $\beta 1$. En effet, les travaux de Wang et de ses collègues ont permis de démontrer que l'élévation de l'expression du gène *Msx-2* dans tous les kératinocytes de l'épiderme de la souris provoquait leur hyperprolifération menant ainsi à un épaississement important de la couche cornée de l'épiderme (Wang *et al.*, 1999).

Les facteurs de croissance tels l'IL-1 (*interleukine-1*), le KGF/FGF-7, le GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) et le TGF- β , ainsi que la voie PKC (*protein kinase C*), semblent étroitement liés au contrôle de la stratification de l'épiderme. En effet, la différenciation des kératinocytes murins est accompagnée de changements au sein des facteurs de transcription AP-1 (*activation protein-1*) qui dépendent de l'activation de la voie PKC (Rutberg *et al.*, 1996). De plus, Szabowski et son équipe (2000) ont démontré l'existence d'une interaction paracrine entre les kératinocytes de la couche basale et les fibroblastes dans un modèle de peau reconstruite par génie tissulaire. Ce modèle révéla que l'IL-1, sécrétée par les kératinocytes, contrôle l'expression des protéines AP-1 par les fibroblastes. Ces dernières semblent nécessaires à la production de KGF et de GM-CSF dont le niveau d'expression a des impacts sur l'épaisseur ainsi que la morphologie de l'épiderme. En effet, le KGF fut associé au contrôle de l'activité mitotique des kératinocytes tandis que le GM-CSF est impliqué dans leur différenciation terminale (Szabowski *et al.*, 2000). Ainsi, une boucle de régulation impliquant l'IL-1 et les facteurs AP-1 est peut-être un mécanisme régissant l'épaisseur de l'épiderme dans les différentes régions du corps. Le FGF-10, aussi produit par les kératinocytes basaux, est un autre

candidat intéressant. Les souris nulles pour son gène ont un épiderme très mince qui présente des défauts de différenciation terminale (Suzuki *et al.*, 2000).

Les membres de la famille des TGF- β sont impliqués dans plusieurs aspects du développement, notamment celui de la peau (Pelton *et al.*, 1991; Sellheyer *et al.*, 1993). Le LOEX a participé à l'identification des trois types de récepteurs du TGF- β (I, II et III) ainsi que de la protéine d'ancrage GPI (*glycosylphosphatidylinositol*) de 150 Kilo Dalton (KDa) qui se lie aux récepteurs TGF I et II à la surface des kératinocytes adultes et néonataux (Tam *et al.*, 1998)(Annexe III). Le TGF- β inhibe la prolifération des kératinocytes.

I.5.2 Les changements associés aux processus de différenciation terminale du follicule pileux

Le poil insoluble, qui émerge à la surface de la peau, est formé par l'activité d'une dizaine de couches cellulaires distinctes au sein du follicule enfoui dans le derme (décrites dans la section I.2.3.1.1). Les cellules souches du renflement fournissent la progéniture cellulaire de l'*ORS* jusqu'à la matrice du bulbe. À ce niveau, l'environnement créé par les fibroblastes de la papille folliculaire favorise la prolifération des kératinocytes et dirige leur différenciation terminale en cellules de l'*IRS* et de la tige du poil. Les cellules de l'*ORS* sont biochimiquement similaires aux cellules de l'épiderme. Les deux régions partagent d'ailleurs maintes kératines (Tableau I-4). Par contre, les kératinocytes de l'*IRS* et de la tige diffèrent beaucoup plus. Entre autres, ils expriment plusieurs kératines qui leur sont propres (Tableau I-4). Les travaux portant sur les poils du lainage des moutons du groupe de Rogers ont permis d'identifier et de caractériser un grand groupe de protéines associées aux kératines nommé KAP (*keratin associated protein*). Ces protéines sont exprimées par les kératinocytes de la tige (Rogers et Powell, 1993; Rogers, 2004). La grande famille des KAPs se divise en 3 sous-groupes selon leur composition en acides aminés (Tableau I-5).

I.5.2.1.1 La tige du poil: la différenciation du cortex et de la cuticule

La zone de kératinisation de la tige du poil se situe dans son tiers inférieur. Elle se caractérise par une synthèse protéique importante. Des études d'hybridation *in situ* ont permis de démontrer que lorsqu'un kératinocyte passe de la zone de kératinisation à celle

du cortex, il exprime différentes kératines et KAPs de façon séquentielle et ordonnée. La synthèse des kératines dures de la tige est suivie de celle des KAPs riches en glycine et en tyrosine, puis des KAPs riches en cystéine et finalement, des KAPs ultra-riches en cystéine (Rogers, 2004). Au cours de ce processus, les kératines s'agrègent en fibrilles et les KAPs migrent dans les espaces entre les FIs. Ainsi, les FIs interagissent avec les KAPs pour former des écailles hexagonales et l'organisation structurale du cortex résulte de l'abondance relative des KAPs.

La cuticule entoure le cortex. L'involucrine et la loritrine se situent dans les cellules aplaties qui la composent, mais les KAPs riches en cystéine 5 et 10 en sont les protéines majoritaires (Rogers, 2004). Les cellules de la cuticule expriment les kératines hHa2/hHb2, hHa5/hHb5 et un groupe d'acides gras à longue chaîne responsables du caractère hydrophobe des poils (Langbein *et al.*, 2001). Les différents éléments du cortex s'attachent entre eux par des ponts disulfides et isopeptidiques.

Tableau I-3 La famille des protéines associées aux kératines des poils (KAP)

Famille	Composition	Nomenclature
KAP riche en glycine et tyrosine	35-60% de glycine et tyrosine	KAP6, KAP7 et KAP8
KAP riche en cystéine	30% cystéine	KAP1, KAP2, KAP3
KAP ultra-riche en cystéine	>30% cystéine	KAP4, KAP5, KAP10

Comme il a été mentionné dans la section I.3.1.1.2, des membres de la famille Hox furent identifiés dans tous les compartiments de différenciation des follicules pileux. Le seul gène Hox dont la mutation a été associée à une fragilité de la tige du poil est *Hoxc13* (Godwin et Capecchi, 1998; Tkatchenko *et al.*, 2001). Son ARNm s'exprime dans les cellules de la matrice et du précortex des poils en phase anagène (Jave-Suarez *et al.*, 2002). *Hoxc13* participerait à la régulation transcriptionnelle de gènes codant pour des kératines et

des KAPs spécifiques au poil. En effet, les gènes *hHa5*, *hHa2* et *hHa7* présentent des domaines liant Hoxc13 (Jave-Suarez *et al.*, 2002).

La voie de signalisation Wnt est impliquée dans le contrôle de la différenciation des kératinocytes de la tige. En effet, Lef1 est exprimé dans les cellules de la matrice du poil (DasGupta et Fuchs, 1999; Merrill *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 1995) et plusieurs gènes de kératines dures possèdent, dans leur région régulatrice, un motif qui lie Lef1 (Zhou *et al.*, 1995). Tel que décrit dans la Figure I-5, l'expression de Lef1 à elle seule ne permet pas la transcription de ses gènes cibles car une activation parallèle de la voie Wnt est nécessaire à la présence nucléaire de la protéine β -caténine, requise au complexe de transcription impliquant Lef1. La création de souris transgéniques, dans lesquelles des gènes contrôlant l'expression cutanée de diverses molécules du poil ont été introduits, a permis à l'équipe de Fuchs de proposer un mécanisme de contrôle de la différenciation des cellules de la tige. Il est suggéré dans ce modèle, que la molécule Noggin, sécrétée par les fibroblastes de la papille folliculaire et qui est antagoniste du morphogène BMP-4, permettrait au facteur de transcription Lef1 d'être exprimé à un niveau élevé dans les cellules de la matrice du poil. Cependant, l'expression des gènes contrôlés par Lef1 serait seulement possible dans les cellules du cortex car ces dernières expriment la β -caténine au sein de leur noyau (Kobielak *et al.*, 2003).

1.5.2.1.2 La différenciation de la gaine folliculaire interne (IRS)

L'*IRS* est une structure rigide qui entoure le cortex. Son rôle principal est d'orienter le compactage des cellules corticales (Kaufman *et al.*, 2003; Kobielak *et al.*, 2003). Le processus de différenciation de l'*IRS* se caractérise par la synthèse de la trichohyaline (Rogers *et al.*, 1997; Rothnagel et Rogers, 1986) (voir Figure I-3, Th). Suivant sa production, la trichohyaline se disperse entre les FIs avec qui elle forme des liens isopeptidiques grâce à l'activité d'une TGase (Rogers *et al.*, 1997). Dans les portions inférieures du follicule pileux, les cellules de l'*IRS* adhèrent à celles formant la tige tandis que près de la surface, elles desquament dans le milieu extérieur. Les cellules de l'*IRS* expriment la kinase DLK, qui est aussi impliquée dans le processus de différenciation de

l'épiderme (Germain *et al.*, 2000; Robitaille *et al.*, 2005). Cependant, le rôle de cette enzyme au sein des cellules de l'*IRS* reste à définir.

Le facteur de transcription GATA-3 et le répresseur de transcription CDP (*CCAAT displacement protein*) seraient impliqués dans la différenciation des cellules de la matrice du poil en cellules de l'*IRS*. En effet, des anomalies importantes ont été dénotées au sein de l'*IRS* des poils de souris ayant subi des modifications géniques invalidant l'expression de GATA-3 ou bien de CDP (Ellis *et al.*, 2001; Kaufman *et al.*, 2003). L'activation des récepteurs BMPR1A (*Bmp receptor 1a*) semble impliquée dans l'expression de GATA-3 car suite à l'ablation des récepteurs BMPR1A dans les poils de la souris, une diminution importante de GATA-3, associée à une perte de l'intégrité cellulaire et à une absence de trichohyaline, a été observée dans les cellules des couches de Huxley et de la cuticule de l'*IRS* (Kobielak *et al.*, 2003).

I.6 Les kératines : filaments intermédiaires des cellules épithéliales

Les filaments intermédiaires (FI) font partie du cytosquelette des cellules. Ce sont des protéines structurales qui ont été regroupées en 5 familles selon l'homologie de leur séquence nucléotidique (Tableau I-4). Les FIs des cellules épithéliales sont les groupes I et II et se nomment kératines (K). Le groupe I comprend les kératines acides et est formé des K9 à K20 ainsi que des kératines Hb1 à Hb6 tandis que les K1 à K8 et les kératines Ha1 à Ha7 font partie du groupe II et ont plutôt un caractère basique ou neutre (Langbein *et al.*, 1999; Langbein *et al.*, 2001; Moll *et al.*, 1982). Les kératines forment un réseau qui s'étend de la surface nucléaire à la périphérie de la cellule épithéliale où elles s'ancrent aux desmosomes ou aux hémidesmosomes. Les propriétés viscoélastiques uniques des FIs les rendent très résistants aux déformations. Ainsi, les kératines sont en grande partie responsables de la stabilité structurale des cellules épithéliales.

Tableau I-4 Les différents groupes de la famille des filaments intermédiaires

Type	Sous-unités	Spécificité d'expression
I	Kératines acides	Épithélium
II	Kératines neutres/basiques	Épithélium
III	Desmine	Muscles
	GFAP (protéine fibrillaire gliale)	Astrocytes Différents précurseurs
	Vimentine	embryonnaires Quasi ubiquitaire <i>in vitro</i>
	Périphérine	Cellules mésenchymateuses Neurones
IV	Neurofilaments (NF-L, NF-M, NF-H)	Neurones
	Internexine	Neurones
V	Lamines	Noyau/Ubiquitaire
VI	Nestine	Cellules souches neuroépithéliales
Autres	Filensine, Phakinine	Cristallin

I.6.1.1 Structure des kératines

Une molécule de kératine est formée de 3 domaines majeurs : un domaine central constitué de quatre régions en hélice alpha, séparées par de courtes régions (*linkers*), et deux domaines terminaux non-hélicoïdaux : le domaine N et le C. La composition en acides aminés du domaine central est très conservée à l'intérieur d'une même classe de FIs et la diversité des différentes kératines est plutôt attribuable à la composition de leurs extrémités terminales.

Les FIs se forment de façon séquentielle et spontanée. L'unité de base du filament de kératine est un dimère comprenant une molécule de kératine du groupe I associée à une kératine du groupe II (le processus d'assemblage des kératines est passé en revue dans Strelkov *et al*, 2003). Les dimères se réunissent ensuite de façon anti-parallèle pour former des tétramères qui vont s'aligner et s'organiser en protofibrilles. Le filament de 10 nm est

le résultat du regroupement de quatre de ces protofibrilles. La portion N-terminale de la molécule de kératine est impliquée dans l'allongement du filament tandis que son domaine C-terminal, grâce à des interactions avec des protéines environnantes, participe à sa stabilité (Hatzfeld et Burba, 1994; Wilson *et al.*, 1992).

Les filaments de kératine forment un réseau très stable. Cependant, ce réseau n'est pas statique car il doit s'adapter aux processus qui requièrent la déformation de la cellule comme le cycle cellulaire et la migration. Ainsi, le filament de kératine est une structure qui se réorganise constamment via l'échange de sous-unités de kératine entre le milieu intracellulaire et le filament polymérisé (Miller *et al.*, 1991; Windoffer *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2001).

I.6.1.2 Expression différentielle des kératines

Chaque sous-type de kératine a habituellement un ou plusieurs partenaires préférentiels. Ainsi, un état de différenciation épithélial donné est caractérisé par l'expression de paires de kératines spécifiques (Tableau I-5). Dans la peau, une dizaine de kératines au niveau de l'épiderme et plus d'une vingtaine au niveau du follicule pileux ont été associées à des stades particuliers de différenciation (Tableau I-5). Les kératines représentent donc des outils de choix pour l'étude du processus de différenciation des épithélia. L'appariement préférentiel, ajouté à la diversité d'expression de nombreux membres d'une même famille de protéines, suggèrent que les différentes sous-unités de kératine accomplissent des rôles spécifiques à l'intérieur des tissus épithéliaux. Cependant, même si de nombreuses études ont été menées sur le rôle des différentes kératines, la compréhension de l'étendue de la participation de chacune à la vie cellulaire des épithélia demeure un domaine de recherche de vif intérêt.

Tableau I-5 Expression différentielle des kératines dans la peau et les différents tissus

A) Distribution des kératines au sein des tissus

Kératines	Distribution
K2e	Cellules suprabasales tardives des épithélia cornifiés stratifiés
K2p	Palais dur
K3/K12	Cornée : cellules suprabasales du limbe et cellules du centre
K4/K13	Épithélia stratifiés non-kératinisés (muqueuse)
K5/K14	Épithélia stratifié (couche basale)
K6/K16	Épiderme palmoplantaire, muqueuses, guérison de plaie et état d'hyperprolifération
K7	Cellules myoépithéliales, épithélia simples
K8/K18	Épithélia simples, cellules de Merkel
K9	Épiderme palmoplantaire
K17	Ongles, cellules myoépithéliales, guérison de plaie
K19	Épithélia simples, certaines muqueuses, cellules souches de l'épiderme palmoplantaire, de la cornée et des poils, cellules de Merkel
K20	Cellules de Merkel, cellules différenciées de l'intestin

B) Distribution des kératines dans la peau

Statut de différenciation au sein de la peau		Kératines exprimées
<u>Épiderme de la peau</u>		
Kératinocytes basaux		K5/K14/K15 K5/K19 dans cellules souches* *présentes dans l'épiderme de la peau glabre
Kératinocytes suprabasaux différenciés		K1/K10/K11
<u>Follicule pileux</u>		
Gaine folliculaire Externe (<i>ORS</i>)	Couche basale	K5/K14/K17
	Cellules souches (renflement)	K5/K14/K15/K17/K19
	Couches suprabasales	K5/K6/K14/K16/K17 *K1/K10 *dans la région de l'infundibulum
	Couche compagne	K5/K6a/K6hf/K16/K17
Gaine folliculaire interne (<i>IRS</i>)	Couche Henle	K1/K10
	Couche Huxley	K6IRS1
	Cuticule de l' <i>IRS</i>	K6IRS1/K6IRS4 K6IRS1/K6IRS2/K6IRS3
Matrice du poil		K5/K17/K14/Ha5/Ha2/Hb5
Tige du poil	Cuticule du poil	Ha2/Ha5/Hb2/Hb5
	Cortex du poil	Ha1/Ha2/Ha3/Ha4/Ha5/Ha6/Ha7, Ha8/Hb1/Hb3/Hb5/Hb6
	Moelle	K5/K14/K17

I.6.1.3 Les kératines : différentes protéines affectées à différentes fonctions

I.6.1.3.1 Le niveau d'organisation du cytosquelette de kératines

Comme la plupart des filaments intermédiaires, les différentes kératines constituent un échafaudage soutenant la cellule épithéliale. Cependant, la structure globale de ce cytosquelette varie en fonction des kératines exprimées. La régénération de l'épiderme et des poils repose sur la prolifération de cellules vivantes au niveau de la couche basale suivi d'un arrêt de prolifération et d'une différenciation terminale avec compactage des kératines. À cet égard, il est logique de croire que la prolifération des kératinocytes exige une flexibilité plus importante du cytosquelette et que certaines kératines sont plus adaptées à la division cellulaire. Ainsi, le réseau de FIs construit par les K5, K14 et K15, caractéristique des kératinocytes de la couche basale de l'épiderme, est plus lâche que celui constitué de la paire K1/K10, dont l'expression dans les kératinocytes suprabasaux de l'épiderme est concomitante à l'arrêt de leur prolifération et à une augmentation du niveau d'empaquetage des filaments de kératine (Fuchs, 1995).

Des différences plus subtiles de l'arrangement du cytosquelette de FIs par rapport au niveau d'expression d'une même kératine existent. En effet, Coulombe et ses collègues ont observé que plus le niveau de l'ARNm de la K14 était important dans l'ORS des poils humains, plus les paquets de filaments de kératine étaient denses (Coulombe *et al.*, 1989). De plus, les chercheurs ayant étudié les souris déficientes pour le gène de la K14 ont constaté que le réseau de FIs formé par la paire K5/K15, dans les cellules basales de l'épiderme, était moins dense que celui observé dans les cellules correspondantes du type sauvage qui présentent une forte expression de la paire K5/K14 (Lloyd *et al.*, 1995). Lors de certains phénomènes biologiques qui activent la prolifération et la migration des kératinocytes, par exemple la guérison des plaies, ceux-ci expriment les K6, K16 et K17. L'expression de ces kératines est associée à des modifications de l'architecture du cytosquelette de kératines qui favorisent la migration cellulaire (Mazzalupo *et al.*, 2003; Paladini *et al.*, 1996). Tous ces exemples suggèrent que la distribution spécifique des kératines confère une organisation du réseau de FIs adapté au rôle de la cellule.

1.6.1.3.2 Les propriétés mécaniques des kératines

C'est en 1991 que le rôle fondamental des kératines dans l'intégrité structurale des épithélia a été découvert. En effet, l'équipe de Coulombe a démontré qu'une mutation au sein du gène de la K14 est responsable d'une forme d'épidermolyse bulleuse (*epidermolysis bullosa simplex (EBS)*), une maladie associée à une lyse des cellules basales de l'épiderme (Coulombe *et al.*, 1991). Par la suite, la création de souris transgéniques mutantes pour des gènes de kératines a permis de mieux comprendre leurs rôles biologiques (Magin *et al.*, 2000). Notamment, les études des souris déficientes en K14 ou en K10 ont permis d'établir une corrélation négative entre la densité des FIs et la fragilité des cellules épithéliales (Lloyd *et al.*, 1995; Porter *et al.*, 1996). Dans le premier cas, la perte de la K14 fut associée à une lyse des cellules basales. Malgré la présence de la K15, aussi partenaire de la K5 au niveau de la couche basale de l'épiderme, le réseau de FIs formé était plus lâche que celui normalement conféré par la paire K5/K14, et incapable de résister aux contraintes mécaniques subit par la peau. En conséquence, le décès des animaux fut observé au cours des 3 premiers mois de leur vie (Lloyd *et al.*, 1995). Dans le second cas, la perte d'une K10 fonctionnelle a provoqué une diminution du niveau de compactage des kératines au sein des cellules suprabasales de l'épiderme et a entraîné la lyse de plusieurs d'entre elles (Porter *et al.*, 1996).

Lorsqu'une kératine se trouve sans partenaire de polymérisation et qu'aucune autre ne peut la remplacer, la perte complète du réseau de FIs fragilise considérablement la cellule épithéliale. Citons l'invalidation du gène de la K5 chez la souris qui, comme c'est le cas lors de l'invalidation du gène de la K14, mène à une lyse importante des cellules basales des épithélia stratifiés (Lloyd *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 2001). La perte de la K5 provoque la mort de l'animal au cours de ses premières heures de vie car celui-ci est incapable de se nourrir en raison de la perte de l'intégrité de son épithélium buccal (langue et palais) (Lloyd *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 2001). Dans ce cas, aucune autre kératine de type II ne peut polymériser avec les kératines 14 et 15 pour compenser la perte de la K5 (Peters *et al.*, 2001).

Afin de déterminer si une kératine exprimée par une cellule d'un épithélium simple pouvait remplacer une kératine d'un épithélium stratifié, Hutton et ses collègues ont favorisé l'accouplement de souris déficientes en K14 avec des souris exprimant la K18 sous le contrôle du promoteur de la K14 (Hutton *et al.*, 1998). La paire K5/K18 qui s'est formée dans les cellules basales de l'épiderme des souris issues des côtes n'a pas résisté aux contraintes mécaniques qu'a subit leur peau en condition de captivité normale. En conséquence, le réseau de FIs s'est affaissé et une lyse cellulaire fut observée au sein des cellules épidermiques basales, reproduisant ainsi le phénotype d'épidermolyse bulleuse des souris déficientes en K14 (Lloyd *et al.*, 1995). Le même type d'expérience a été mené avec la K16, dont la séquence nucléotidique est très proche de celle de la K14, mais qui est exprimée, entre autres, dans les kératinocytes en bordure des plaies (Paladini *et al.*, 1996). Cette fois-ci, le gène de la K16 fut placé en aval du promoteur du gène de la K14 dans l'épiderme des souris nulles pour la K14 (Paladini et Coulombe, 1999). La formation des filaments K5/K16 dans les cellules basales a permis d'éviter leur lyse. Cependant, des ulcères ont été observés au sein des épithélia stratifiés de ces souris. De plus, elles ont perdu graduellement leurs poils après 4 à 5 semaines de vie. Ces résultats suggèrent que la K14 et la K16 ne sont pas équivalentes d'un point de vue fonctionnel.

L'analyse des souris mutantes pour les kératines comporte une difficulté majeure : il est difficile de prévoir tous les mécanismes de compensation qui s'enclenchent en réponse aux mutations produites. Pour remédier à ces situations, les chercheurs se sont tournés vers des études de polymérisation des FIs *in vitro* qui, même si elles ne représentent pas le contexte cellulaire normal, ont fourni plusieurs éléments de réponse quant aux caractéristiques des différentes paires de kératines. Ainsi, même si la plupart des kératines de type I sont capables de polymériser avec celles du type II *in vitro* (Franke *et al.*, 1983), leurs propriétés d'assemblage varient. Par exemple, les filaments K5/K14 sont plus stables que ceux formés par les paires K5/K18 et K5/K19 lorsqu'ils sont soumis à de hautes concentrations d'urée (Coulombe et Fuchs, 1990; Fradette *et al.*, 1998). Il en est de même pour les kératines Ha1, Hb3, Hb6, propres aux trichocytes du cortex des poils, qui forment des polymères avec K6hf plus difficiles à dénaturer à l'urée que les filaments K6hf/K17 (Hofmann *et al.*, 2002).

L'analyse du comportement mécanique de suspensions de kératines assemblées *in vitro* par un rhéomètre rotatif à cône et plateau, un appareil qui met en mouvement un cylindre tournant dans un liquide à mesurer, a révélé que les filaments de kératine se comportaient comme des solides visco-élastiques et que chaque paire de kératines présentait des propriétés mécaniques intrinsèques distinctes (Bousquet *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2001). Ainsi, il a été observé que les filaments K5/K14 se déformaient moins que les filaments K5/K19 lorsqu'ils étaient soumis à de grandes forces de cisaillement par le rhéomètre. Ce comportement est conféré en grande partie par l'extrémité C-terminale de la K14. En effet, l'introduction dans cette région d'une mutation (K14R₁₂₅-C) retrouvée dans plusieurs cas d'épidermolyse bulleuse simplexe (EBS) réduit grandement la résistance à la déformation des polymère K5/K14R₁₂₅-C (Ma *et al.*, 2001). De plus, les complexes formés à partir de la K5 et d'une K14 sans son domaine C-terminal (K5/K14ΔT) présentent des propriétés visco-élastiques similaires aux filaments produits par l'assemblage de la K5 avec la K19, une kératine naturellement exempte d'extrémité C-terminale (Bader *et al.*, 1986; Bousquet *et al.*, 2001; Eckert, 1988; Stasiak et Lane, 1987).

Ces données, portant sur le comportement viscoélastiques des différents complexes de kératines, suggèrent que l'expression de la K19 dans les cellules souches pourraient leur conférer un réseau de filaments intermédiaires moins résistant aux contraintes mécaniques mais plus facile à déformer (Bousquet *et al.*, 2001). Avec les précédentes observations effectuées à notre laboratoire sur les filaments K5/K19 qui *in vitro*, sont moins stables, plus courts et plus étroits que ceux formés par K5/K14 (Fradette *et al.*, 1998), ces données suggèrent que l'expression de la K19 est liée à une plasticité accrue du réseau de FIs, une caractéristique associée aux cellules souches.

L'analyse des propriétés mécaniques des kératines des épithélia simples K8/K18 a également été effectuée par un rhéomètre rotatif (Yamada *et al.*, 2002). Ces travaux ont permis de constater que les propriétés mécaniques des filaments K8/K18 assemblés *in vitro* étaient très similaires à celles des filaments K5/K14 retrouvés dans les épithélia stratifiés. Cependant, si les partenaires normaux sont intervertis (K5/K18, K8/K14), les propriétés mécaniques sont considérablement modifiées (Yamada *et al.*, 2002). Ces résultats

suggèrent que l'expression des différentes kératines est adaptée aux contraintes mécaniques que subit la cellule ou le tissu.

1.6.1.3.3 La participation des kératines à la régulation d'évènements cellulaires

Le rôle structural des kératines et des FIs des autres groupes est indéniable. Cependant, de plus en plus d'évidences témoignant d'une participation probable des FIs à la modulation et au contrôle d'évènements cellulaires émergent dans la littérature scientifique. Les protéines qui s'associent aux filaments intermédiaires sont appelées IFAP (*intermediate filament associated protein*). En ce qui concerne les kératines, les protéines comme la filaggrine, la BPAG, la plakoglobine, la desmoplakine et les KAPs des kératines dures (Tableau I-3) font partie des IFAPs. Cependant, leur interaction directe avec des molécules de la signalisation cellulaire n'a pas été formellement établie.

Les preuves les plus concrètes de l'interaction des kératines avec les mécanismes de signalisation viennent des études portant sur les kératines 8/18, 10 et 16. Les kératines 8/18 semblent impliquées dans le contrôle de l'apoptose par la voie TNF (*tumor necrosis factor*) (Caulin *et al.*, 2000). En effet, ces kératines sont capables de se lier au domaine cytoplasmique du récepteur TNFR2 (*TNF receptor 2*). Elles semblent fournir à la cellule qui les exprime une certaine résistance à l'apoptose. En effet, les hépatocytes des souris déficientes en K8 et K18 sont 100 fois plus sensibles à l'apoptose induite par la voie TNF (Caulin *et al.*, 2000). La séquestration de la protéine TRADD (*TNF receptor type I-associated death domain*) par la K18 a été proposée comme un mécanisme potentiel de régulation de l'apoptose (Inada *et al.*, 2001). Les kératines K8 et K18 ont également été liées à l'apoptose médiée par Fas (Gilbert *et al.*, 2001).

Les K10 et K16 sont impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire. En effet, les travaux du laboratoire Jorcano ont permis de constater que l'expression de la K16 facilitait la progression du cycle cellulaire des kératinocytes en culture tandis que celle de la K10 l'entravait. Ces kératines semblent régir l'activité de la protéine du rétinoblastome (pRb) et de la cycline D1, deux molécules étroitement impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (Paramio *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2002). L'influence de la K10 sur le cycle se

ferait, du moins en partie, par une interaction de son domaine N-terminal avec Akt et PKC ξ , deux molécules importantes de la voie de signalisation PI-3K (*phosphatidylinositol-3 kinase*) (Paramio *et al.*, 2001).

Les protéines de type 14-3-3 sont d'autres exemples de molécules qui interagissent avec les kératines et qui sont impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire ainsi que de l'activité de la PKC. En effet, une association entre les filaments K8/K18 phosphorylés et 14-3-3 ζ fut observée lors de la progression du cycle cellulaire des cellules HT29, une lignée de cellules épithéliales dérivée du colon (Liao et Omary, 1996). De plus, une forte induction de la protéine 14-3-3 σ a été décrite dans l'épiderme anormalement hyperprolifératif des souris dont le gène de la K10 a été invalidé (Reichelt et Magin, 2002). D'ailleurs, le rôle de 14-3-3 σ dans le processus d'évolution clonale des kératinocytes pourrait s'avérer déterminant. En effet, les travaux de Dellambra ont permis de conclure que la diminution du niveau d'expression de 14-3-3 σ dans les kératinocytes humains en culture les maintient dans un stade peu différencié (Dellambra *et al.*, 2000).

I.6.1.4 La kératine 19 : une kératine exprimée par les cellules souches cutanées aux propriétés particulières

I.6.1.4.1 La distribution de la kératine 19

Notre laboratoire s'intéresse à la kératine 19 parce que nous avons établi, en 1999, que les cellules souches épithéliales cutanées exprimaient cette kératine (Michel *et al.*, 1996). En effet, la K19 a été identifiée au sein de kératinocytes localisés dans le renflement des poils, ainsi que dans le fond des crêtes épidermiques de la peau palmoplantaire (Michel *et al.*, 1996), deux niches de cellules souches reconnues (Akiyama *et al.*, 1995; Blanpain *et al.*, 2004; Cotsarelis *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 2004; Oshima *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2000; Tumber *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2004). Ces travaux ont révélé que les cellules positives à la K19 présentent plusieurs propriétés propres aux cellules souches. Notamment, une expression importante de la sous-unité β 1 des intégrines, un cycle cellulaire long et un fort potentiel clonogénique en culture. L'une des particularités avantageuses de ce marqueur est qu'il identifie les cellules souches autant dans la peau humaine que murine.

Les cellules souches épithéliales du limbe de la cornée expriment aussi la K19 (Germain *et al.*, 1999).

La K19 est très présente lors de l'embryogénèse. En plus d'être exprimée par les cellules du trophoectoderme avec les kératines 8 et 18 dès le stade blastocyste, sa distribution spatio-temporelle est très précise dans l'ectoderme embryonnaire. Vers la 10^{ème} semaine de gestation chez l'homme, les cellules de l'ectoderme, jusqu'alors composé d'une seule assise de cellules possédant les K8/18, commencent à exprimer la K19. Cette séquence concorde avec le début de la stratification. Vers la 20^{ème} semaine de gestation, l'expression des kératines 8, 18 et 19 s'estompe graduellement tandis qu'apparaissent les kératines définitives de l'épiderme (K5/14, K1/K10). En concomitance, le nombre de couche au sein de l'ectoderme se multiplie. La K19 est aussi présente dans les cellules du follicule pileux lors des premières étapes de sa formation (voir Figure I-4). Cependant, une fois la morphogénèse du poil complétée, la K19 ne subsiste que dans la région du renflement, soit dans les cellules souches.

La kératine 15 est une autre kératine qui a été proposée comme marqueur des cellules souches cutanées. En effet, Lyle et son équipe ont constaté par la technique d'immunofluorescence indirecte en 1998, que les anticorps dirigés contre un épitope de la K15 reconnaissaient uniquement les cellules basales de la région du renflement (Lyle *et al.*, 1998). Cependant, les travaux qui ont suivi ont mené à conclure que la transcription du gène de la K15 s'effectuait aussi dans les cellules basales de l'épiderme (Liu *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2004). Ainsi, la K15 ne serait pas exclusive aux cellules souches mais serait plutôt un marqueur de kératinocytes peu différenciés. Cependant, il est possible que cette kératine soit présente en quantité plus importante dans les cellules souches. Ainsi, une explication vraisemblable des résultats de Lyle est qu'une dilution trop importante de la solution d'anticorps dirigés contre la K15 a conduit à son identification spécifique aux cellules souches des poils (Lyle *et al.*, 1998; Lyle *et al.*, 1999).

La K19 n'est pas uniquement exprimée par les cellules souches de la peau. Cette kératine se retrouve dans une très grande variété de tissus épithéliaux. Elle est présente notamment dans l'épithélium intestinal, les canaux collecteurs du rein, le mésothélium du

pancréas, la muqueuse de la bouche, les glandes exocrines, les glandes sudoripares, la glande mammaire, l'épithélium du mamelon, le col de l'utérus et les cellules de Merkel (Moll *et al.*, 1982). L'expression de la K19 est également induite dans plusieurs types de carcinomes (Moll, 1994b). En résumé, la distribution de la K19 dans autant de tissus et de types cellulaires aux rôles distincts soulève plusieurs interrogations sur les avantages que la K19 confère à la cellule qui l'exprime.

1.6.1.4.2 La fonction de la kératine 19

La séquence nucléotidique du gène de la K19 est très conservée entre la souris, l'humain et le bovin (Bader *et al.*, 1986; Eckert, 1988; Lussier *et al.*, 1989). Aucune mutation au sein de la K19 ne fut associée à des maladies humaines et aucun phénotype particulier n'a été observé chez les souris dont le gène de la K19 est invalidé (M. Taketo et Y. Tamai, communications personnelles). Cependant, l'inactivation des gènes codant pour les kératines 18 et 19 empêche la poursuite des premières étapes du développement embryonnaire des souris car la perte de l'intégrité des structures placentaires mène à l'avortement précoce des embryons (Hesse *et al.*, 2000; Tamai *et al.*, 2000).

La K19 se distingue des autres kératines puisqu'elle est naturellement tronquée. En effet, elle ne possède pas de domaine C-terminal mais plutôt une extension de 13 acides aminés dans sa portion hélicoïdale centrale (Bader *et al.*, 1986; Eckert, 1988; Stasiak et Lane, 1987). Tel que discuté dans la section I.6.1.3.2, l'extrémité C-terminale de la K14 est nécessaire à la résistance des complexes K5/K14 soumis à des contraintes de cisaillement de grandes amplitudes, tandis que les complexes K5/K14 Δ T et K5/K19 résistent moins à la déformation (Bousquet *et al.*, 2001). Lorsque soumis à de forte concentration en urée, les filaments K5/K19 assemblés *in vitro* sont moins stables que ceux formés par les K5 et K14 et se désorganisent plus facilement (Fradette *et al.*, 1998). Ces observations suggèrent que les propriétés intrinsèques des filaments formés par la K19 se prêtent à un rôle très particulier. La présence de la K19 pourrait, par exemple, contribuer à la plasticité du phénotype des cellules souches de la peau en leur conférant un réseau de kératine plus facile à déformer et à désorganiser. Une telle propriété pourrait ainsi les aider à répondre rapidement à un stimulus induisant leur prolifération.

I.6.1.5 La kératine 17 : une kératine de contextes spéciaux

La K17 est une kératine retrouvée dans certains contextes cellulaires précis. Sa distribution ressemble à celle des kératines 6 et 16, soit dans les situations associées à une augmentation de la prolifération des cellules cutanées (Jiang *et al.*, 1994; Leigh *et al.*, 1995; Mazzalupo *et al.*, 2003; McGowan et Coulombe, 1998a; Paladini *et al.*, 1996). Les K6, K16 et K17 s'expriment également dans les ongles (McGowan et Coulombe, 2000; Tong et Coulombe, 2004) et dans l'épiderme palmoplantaire (Moll *et al.*, 1983; Troyanovsky *et al.*, 1989). Au niveau des poils, les K16 et K17 sont toutes deux présentes. Cependant, l'expression de la K16 est restreinte à la couche compagne. La K17 quant à elle s'exprime dans toutes les cellules de l'ORS, tout en étant présente dans les cellules de la matrice ainsi que dans celles de la moelle du poil.

Dans certaines situations biologiques particulières, la K17 apparaît indépendamment des K6 et K16. Notamment, la K17 est présente dans les cellules myoépithéliales de nombreuses glandes exocrines (Troyanovsky *et al.*, 1989). En outre, le gène de la K17 est transcrit dans les tissus en développement dont la formation dépend de Lef1. Il n'est donc pas étonnant de la retrouver lors des premières étapes du développement des dents, des glandes mammaires et des follicules pileux (McGowan et Coulombe, 1998b).

Il demeure que le rôle de la K17 est encore peu compris. La K17 semble accomplir une fonction structurale importante. En effet, les pathologies *pachyonychia congenita* et *steatocystoma multiplex*, deux maladies associées à des lyses cellulaires ainsi qu'à une perte de l'intégrité des ongles et des cheveux, sont causées par des mutations au sein du gène de la K17 (McLean *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1997). De plus, l'inactivation du gène de la K17 chez la souris mène à des déformations des follicules pileux et à une perte des poils du pelage (McGowan *et al.*, 2002). La présence de la K17 dans les cellules qui prolifèrent et qui migrent en bordure des plaies cutanées (Mazzalupo *et al.*, 2003) ainsi qu'au niveau des cellules myoépithéliales contractiles des glandes (Schon *et al.*, 1999) est intéressante. En effet, ces états exigent un cytosquelette capable de soutenir des changements de forme cellulaire. À cet égard, la K17 pourrait accomplir un rôle structural adapté à ces situations particulières.

I.7 Le génie tissulaire

Les progrès dans le contrôle de l'expression des gènes à l'intérieur d'organismes vivants aussi complexes que les souris ont permis des avancées considérables dans la compréhension du rôle de plusieurs protéines. Cependant, le nombre important de paramètres pouvant intervenir dans l'animal complexifie considérablement l'analyse des mutations. Les modèles plus simples tels que les cultures monocouches de cellules normales ou provenant de lignées cellulaires transformées, demeurent des outils utiles à l'élucidation de bon nombre de mécanismes cellulaires et moléculaires. Par contre, ils ont le défaut de ne pas recréer adéquatement l'environnement tridimensionnel *in vivo*. Le génie tissulaire est l'application de principes et méthodes du génie ainsi que des sciences de la vie dans le but de comprendre en profondeur les relations entre les structures et les fonctions dans les tissus normaux et de développer des substituts biologiques afin de restaurer, maintenir et améliorer la fonction d'un tissu. Ainsi, les tissus reconstruits par génie tissulaire sont des outils prometteurs pour élucider les interactions entre les différents types cellulaires et leur environnement.

Grâce à la technologie du génie tissulaire, différents modèles de culture tridimensionnels furent créés à notre laboratoire. Ces modèles permettent d'étudier des mécanismes physiologiques et pathologiques aussi complexes que la cicatrisation de la peau (Bellemare *et al.*, 2005; Laplante *et al.*, 2001; Moulin *et al.*, 1996), l'asthme (Paquette *et al.*, 1998; Paquette *et al.*, 2004), l'angiogénèse (Black *et al.*, 1998; Tremblay *et al.*, 2005), le cancer (Wang *et al.*, 2001), la différenciation épidermique (Michel *et al.*, 1995; Robitaille *et al.*, 2005), la réorganisation des tissus suite à leur stimulation par des contraintes mécaniques (Annexe IV) et la vasoconstriction/vasodilatation des vaisseaux (L'Heureux *et al.*, 1998; Laflamme *et al.*, 2005). Les cellules souches de la peau, avec leur vaste potentiel de différenciation et leur multipotentialité, représentent d'excellentes candidates pour la reconstruction de peaux en laboratoire par génie tissulaire. À l'inverse, ces peaux offrent des outils de premier ordre pour étudier les mécanismes sous-jacents à la régulation des cellules souches.

Cette section propose une revue des principaux modèles de peaux reconstruites par génie tissulaire, des méthodes de culture des cellules épithéliales cutanées humaines et murine ainsi que de leur utilisation dans l'étude de la différenciation épidermique et folliculaire.

I.7.1 La peau reconstruite par génie tissulaire

En 1979, Green et son équipe furent les premiers à tirer profit des propriétés remarquables sur le plan clonogénique des kératinocytes de la peau afin de créer des feuillets épidermiques vivants pouvant être utilisés pour le traitement des blessures cutanées sévères (deuxième degré profond et troisième degré, voir tableau) (Green *et al.*, 1979; Rheinwald et Green, 1975). Ces tissus reconstruits par génie tissulaire possèdent une application thérapeutique avantageuse et leur utilisation pour le traitement des grands brûlés est encore aujourd'hui une technique qui permet de sauver des vies (Gallico *et al.*, 1984). Les épidermes cultivés reforment la barrière cutanée *de novo* lorsqu'ils sont greffés sur un patient. Ces tissus sont utilisés pour reconstruire la portion épidermique d'une brûlure du 2^{ème} degré, ou encore celle d'un site donneur suite au prélèvement de sa portion superficielle (comprenant l'épiderme et une partie du derme). Cependant, les épidermes cultivés sont fragiles aux manipulations en raison de l'absence d'une composante dermique.

Pour traiter les blessures cutanées profondes (> 2^{ème} degré superficiel) ou récidivantes, un tissu comprenant un derme en plus de l'épiderme est souhaitable. Un tel tissu, en plus de pallier la fragilité des épithélia cultivés, apporterait plusieurs fonctions physiologiques aux greffons. Notamment, il pourrait être greffés sur un site dont le derme est totalement atteint, comme une brûlure du troisième degré profond, voir), sur lequel les kératinocytes survivent difficilement. Le derme étant le substrat naturel des kératinocytes épidermiques, une matrice dermique bien organisée assurerait l'homéostasie des cellules épidermiques de la peau reconstruite après sa greffe. De plus, la possibilité d'une colonisation rapide de la matrice dermique du tissu reconstruit par les vaisseaux sanguins assurerait sa nutrition.

En ce qui a trait à la reconstruction de substituts cutanés dermo-épidermiques par génie tissulaire, il existe trois approches principales : 1) les gels, 2) les treillis et 3) l'auto-assemblage.

1) Les gels. Vers la fin des années 70, l'équipe de Bell proposa une peau pleine épaisseur (comprenant un derme et un épiderme) reconstruite par l'approche des gels (Bell *et al.*, 1979; Bell *et al.*, 1981). Cette méthode consiste à cultiver des kératinocytes sur un gel de collagène bovin qui a été préalablement colonisé par des fibroblastes. Le premier désavantage de cette méthode est la contraction importante du gel de collagène suite à l'ajout des fibroblastes (Germain et Auger, 1995). Le deuxième problème important est leur faible résistance aux contraintes mécaniques (Lafrance *et al.*, 1995). Néanmoins, le substitut cutané qui utilise un gel de collagène bovin de type I colonisé par des fibroblastes et des kératinocytes allogéniques connu sous le nom commercial de Apligraf™ est actuellement utilisé comme pansement biologique pour le traitement des ulcères veineux ou des brûlures de grande surface (Eaglstein et Falanga, 1997). Cependant, la présence de cellules allogéniques dans le substitut cutané Apligraf™ limite sa survie à long terme sur un patient. En effet, les cellules allogéniques seront tôt ou tard rejetées par le système immunitaire et par conséquent, ne pourront assurer la régénération du greffon.

2) Les treillis. Cette approche consiste à élaborer des matrices dermiques se présentant sous forme d'un réseau poreux colonisées ou non par des cellules cutanées allogéniques. Les substituts cutanés disponibles sur le marché, tels que AlloDerm™, Dermagraft-TC (aussi connu sous le nom de TransCyte™), Dermagraft® et Integra™, font partie de cette catégorie. AlloDerm™ est la matrice résiduelle d'une peau, prélevée sur un cadavre humain, décellularisée, deshydratée et congelée, tandis que Dermagraft-TC, Dermagraft® et Integra™ sont élaborés à partir de fibroblastes humains cultivés à l'intérieur de treillis biosynthétiques (Burke *et al.*, 1981; Hansbrough *et al.*, 1993; Mansbridge *et al.*, 1998; Naughton *et al.*, 1997; Purdue, 1997; Purdue *et al.*, 1997; Yannas *et al.*, 1982; Yannas *et al.*, 1989). Ces substituts cutanés ont de meilleures propriétés mécaniques que les gels de collagène et leur contraction, suite à l'ajout de cellules vivantes, est limitée. Quoique leur utilisation thérapeutique n'est que temporaire, une matrice

Tableau I-6 Classification des blessures cutanées en fonction de leur profondeur

Type de blessure	Description	Manifestation clinique	Conséquences
1 ^{er} degré	L'épiderme seul est atteint.	La peau est rouge, sèche et douloureuse.	Guérison spontanée dans un délai de quelques jours et qui ne laisse aucune cicatrice.
2 ^{ième} degré superficiel	L'épiderme et une partie du derme sont endommagés. Cependant, les poils ne sont pas atteints au-delà du renflement.	Apparition de phlyctènes; la plaie est rouge, humide et très douloureuse car les terminaisons nerveuses sont irritées.	Guérison spontanée mais le risque d'infection et de cicatrices est plus important.
2 ^{ième} degré profond	L'épiderme et une grande partie du derme sont atteints (au-delà du renflement des poils).	La peau est terne ou d'un blanc brillant. La sensation de douleur est atténuée en raison de la destruction des terminaisons nerveuses.	Puisque une partie importante du réservoir des cellules souches des poils est détruit, la guérison de l'épiderme est lente voire impossible*. Une intervention chirurgicale est nécessaire si la plaie couvre une grande surface. Le délai de guérison est long et le risque de cicatrisation vicieuse est important.
3 ^{ième} degré	Toute la peau (épiderme et tout le derme) est brûlée.	La plaie est de couleur blanche, jaune, brune et indolore parce que toutes les terminaisons nerveuses sont détruites.	Une guérison spontanée est impossible et une intervention chirurgicale est nécessaire*. Le risque de cicatrisation vicieuse est important.
4 ^{ième} degré ou carbonisation	La blessure est si profonde que les structures sous-cutanées sont atteintes (muscles, cartilage, os).	La peau est noire et présente un aspect carbonné.	Situation très grave nécessitant une intervention chirurgicale (greffe de peau et reconstruction des autres tissus si possible).

** Ceci est vrai pour les blessures de grande surface*

dermique sans matériel synthétique ou exogène serait préférable pour une utilisation à long terme.

3) L'auto-assemblage. Cette approche tire profit de la propriété intrinsèque que possèdent plusieurs types de cellules vivantes, d'organiser un tissu tridimensionnel en

présence des conditions adéquates. Par exemple, les fibroblastes de la peau ont la capacité de sécréter leur propre matrice extracellulaire en présence d'acide ascorbique et de former des feuillets matriciels pouvant être utilisés comme tissu conjonctif de soutien pour la culture de kératinocytes cutanés (Michel *et al.*, 1999).

Une membrane basilaire complète est une autre qualité souhaitable d'un substitut cutané dermo-épidermique. En effet, en plus d'assurer la cohésion entre le derme et l'épiderme, la membrane basilaire est le siège de nombreuses interactions qui contrôlent la morphogénèse et l'homéostasie de l'épiderme. Le contact entre la membrane basilaire et les intégrines situées à la surface des kératinocytes est un exemple de mécanisme régissant leur état de différenciation (Jones *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 2002; Tani *et al.*, 2000; van der Flier et Sonnenberg, 2001; Watt, 2002b). Or, les gels de collagène, ou encore les dermes dont les fibroblastes ont été tués (décellularisés) et colonisés ensuite par des kératinocytes, offrent des résultats décevants quant à la formation de la membrane basilaire (Lee *et al.*, 2003; Lee et Cho, 2005; Michel *et al.*, 1997). De tels tissus n'assurent probablement pas la conservation des cellules souches qui expriment en grande quantité l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, qui est le récepteur du collagène IV, ainsi que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, qui est le récepteur de la laminine-5 (Bickenbach et Chism, 1998; Jones et Watt, 1993; Jones *et al.*, 1995; Kaur et Li, 2000; Tani *et al.*, 2000).

Lorsque la peau est gravement endommagée, la greffe d'épidermes cultivés permet de reformer la barrière cutanée. Cependant, les annexes cutanées du patient, s'ils ont été détruits, ne se reforment pas. Ainsi, plusieurs fonctions comme l'homéostasie thermique assurée par les glandes sudoripares, ainsi que l'hydratation de la peau par le sébum des glandes sébacées, sont perdues à jamais. De plus, la récupération de la fonction tactile de la peau est souvent complexe et lente. Au sein des substituts cutanés, la présence des poils, qui sont des organes sensitifs importants et qui interagissent avec les nerfs, notamment en sécrétant certaines substances comme le NGF (*nerve growth factor*) (Botchkareva *et al.*, 2000; McElwee et Hoffmann, 2000), pourrait améliorer leur fonctionnalité. Cependant, la morphogénèse des annexes et le cycle du poil sont régis par des échanges moléculaires complexes qui ne sont pas bien compris à l'heure actuelle. Ainsi, une meilleure

connaissance des mécanismes contrôlant la formation de ces structures serait un atout majeur pour la fabrication de peaux comprenant des annexes par la technologie du génie tissulaire.

I.7.2 La culture des cellules cutanées humaines par rapport aux cellules murines

La peau de la souris est différente de celle de l'humain. Par exemple, l'épiderme de la souris est très mince (2-3 couches de cellules vivantes) en raison des poils qui y sont en grande quantité. D'autre part, l'épiderme humain est beaucoup plus épais (5-15 couches) et la densité de distribution des poils est moindre.

Contrairement aux kératinocytes humains, pour lesquels les conditions permettant leur isolement, leur congélation et leur culture de façon efficace sont bien établies (Green *et al.*, 1979; Rheinwald et Green, 1975), les kératinocytes de souris sont beaucoup plus difficiles à manipuler en laboratoire. Il est généralement nécessaire de les utiliser en culture primaire. De plus, pour favoriser leur prolifération, la concentration calcique du milieu de culture doit être diminuée significativement (Hager *et al.*, 1999; Hakkinen *et al.*, 2001). Or, plusieurs des événements de la cornification dépendent du calcium, notamment l'assemblage des desmosomes. La différenciation des kératinocytes murins *in vitro* exige plutôt que la concentration calcique du milieu de culture soit d'ordre physiologique.

I.7.3 L'étude de la différenciation des cellules épithéliales cutanées par génie tissulaire

Une application intéressante du génie tissulaire a été d'ensemencer des cellules souches embryonnaires (ES) de souris sur des dermes reconstruits à partir de fibroblastes humains cultivés en présence d'acide ascorbique (Coraux *et al.*, 2003). Cette expérience a permis de démontrer que les cellules ES pouvaient se différencier en kératinoctyes et reformer un épiderme complet en culture (Coraux *et al.*, 2003).

En ce qui a trait à la culture des follicules pileux, plusieurs modèles ont été proposés dans la littérature scientifique. Les différentes populations des follicules pileux, telles que les cellules de la papille folliculaire (Jahoda *et al.*, 1984; Messenger *et al.*, 1991), les

cellules de la gaine de tissu conjonctif entourant le follicule (membrane vitrée) (McElwee *et al.*, 2003; Reynolds *et al.*, 1999) ainsi que les cellules épithéliales de différents segments du poil (Kobayashi *et al.*, 1993; Limat *et al.*, 1993; Oshima *et al.*, 2001; Rochat *et al.*, 1994), ont été étudiées en culture primaire. Ces cultures ont permis d'établir certaines propriétés des fibroblastes de la papille folliculaire et d'identifier la localisation préférentielle des cellules souches des poils. Toutefois, de telles conditions ne permettent pas de reconstituer les interactions normales d'un environnement naturel tels les contacts et les contraintes physiques.

Pour recréer plus fidèlement les échanges entre les populations fibroblastiques et les cellules épithéliales du poil, plusieurs investigateurs ont fait la culture de poils isolés, entourés ou non par du matériel matriciel (Buhl *et al.*, 1989; Michel *et al.*, 1999; Philpott *et al.*, 1990; Philpott *et al.*, 1992; Philpott *et al.*, 1995; Philpott *et al.*, 1996; Watson *et al.*, 1994). Malheureusement, les follicules pileux ont des exigences particulières qui limitent leur vitalité à une dizaine de jour dans de telles conditions. Même si lors de ces expériences, il a été possible d'évaluer le rôle de certains facteurs de croissance dans le contrôle de la croissance et de la différenciation du poil, ce dernier n'effectue pas normalement ses périodes de croissance (phase anagène), de régression (phase catagène) et de repos (phase télogène) en culture (Philpott et Kealey, 2000). L'incorporation de follicules pileux immatures à l'intérieur d'une matrice de collagène bovin a permis un développement partiel des structures pileuses, mais leur différenciation s'est avérée anormale (Rogers *et al.*, 1987; Yuspa *et al.*, 1993). Pour évaluer à long terme la formation, la survie et la régénération des poils, la meilleure méthode connue à l'heure actuelle consiste à implanter les poils manipulés *ex vivo*, ou encore les cellules cultivées, sur un modèle animal.

Le système idéal pour étudier la morphogénèse des poils serait de recréer les interactions nécessaires pour que les poils se reforment *de novo* à partir de cellules souches en culture. Mais au meilleur de nos connaissances, un tel modèle n'a jamais été publié. La complexité de la régulation du poil dans l'espace et dans le temps explique probablement cette lacune. Au LOEX, nous avons proposé un modèle qui consiste à insérer des cheveux

humains à l'intérieur des peaux reconstruites par auto-assemblage (Michel *et al.*, 1999). Ce substitut cutané est prometteur pour le traitement des brûlures profondes du scalp. Cependant, même si les cheveux se sont bien incorporés dans cette peau reconstruite *in vitro*, il est important de s'assurer que la différenciation des cellules souches y est bien contrôlée avant et après la transplantation. En effet, divers travaux ont permis d'observer qu'une différenciation inadéquate des cellules souches épithéliales cutanées menait à la formation de divers cancers épithéliaux (DasGupta *et al.*, 2002; Gat *et al.*, 1998; Lo Celso *et al.*, 2004; Niemann *et al.*, 2002; Niemann *et al.*, 2003).

I.8 Objectifs des travaux

Les objectifs généraux de mes travaux de thèse étaient : 1) d'étudier le processus de différenciation des cellules souches cutanées à l'intérieur de la peau reconstruite par génie tissulaire, 2) d'approfondir nos connaissances sur les conditions qui contrôlent la différenciation des cellules souches cutanées en épiderme et en follicule pileux et 3) de caractériser les propriétés intrinsèques des cellules souches du follicule pileux.

Avant de me lancer dans la complexe étude de la différenciation des cellules souches en follicule pileux *in vitro*, un des premiers buts visés dans le cadre de mes travaux de thèse, était d'évaluer si la peau reconstruite par la méthode auto-assemblage représente un environnement favorable au maintien des cellules souches. Pour s'y faire, nous avons produit des peaux reconstruites à partir de feuillets de fibroblastes cultivés en présence d'acide ascorbique et de cellules épidermiques humaines provenant d'un tissu riche en cellules souches (peau d'enfant nouveau-né) (Michel *et al.*, 1997). Par la suite, nous avons étudié la maturation *in vivo* de ce modèle unique en le greffant sur des souris athymiques. Finalement, nous avons analysé l'intégrité de la membrane basilaire et la différenciation épidermique et dermique des peaux reconstruites par des techniques histologiques et immunohistochimiques, ainsi que par microscopie électronique. Dans un second temps,

l'influence de la quantité des cellules souches sur la qualité des peaux reconstruites a été évaluée en comparant les peaux comprenant des cellules épidermiques d'enfants nouveaux-nés avec celles fabriquées à partir de cellules épidermiques humaines provenant de prélèvements cutanés moins riches en cellules souches (peaux d'adultes) (Michel *et al.*, 1997). Ces travaux sont présentés dans le Chapitre II.

Jusqu'à aujourd'hui, aucun modèle *in vitro* n'a permis de former des annexes cutanées à partir de cellules souches en culture. Des interactions adéquates avec les cellules, la matrice extracellulaire, les facteurs de croissance, la membrane basilaire et certaines populations dermiques spécifiques telle celle de la papille folliculaire, sont probablement nécessaires à la différenciation des cellules souches en follicules pileux. Dans l'objectif de mieux comprendre le rôle du tissu mésenchymateux dans la coordination de la différenciation des cellules souches des poils, la première étape était de mettre au point une peau reconstruite capable de supporter la formation des follicules pileux après la greffe. Pour s'y faire, nous avons adapté le modèle de peau reconstruite décrit dans le chapitre II à la culture des cellules murines. En effet, les méthodes les plus efficaces pour induire la formation des poils après la greffe utilisent des cellules de souris (Lichti *et al.*, 1993; Weinberg *et al.*, 1993). Ensuite, différentes lignées cellulaires fibroblastiques ont été testées quant à leur influence sur la différenciation des cellules souches au sein des reconstructions tissulaires cultivées ou greffées sur des souris athymiques. La prolifération cellulaire et la différenciation épithéliale (épidermique vs folliculaires vs glandes sébacées) ont été évaluées par des techniques histologiques et immunohistochimiques. Finalement, afin de vérifier si l'environnement créé à l'intérieur des peaux reconstruites permettait une régulation adéquate de la différenciation des cellules souches en poils, nous avons vérifié la présence de quelques une des protéines effectrices de la voie de signalisation Wnt. Les résultats de ces travaux font l'objet du Chapitre III.

Finalement, dans le but de caractériser les propriétés intrinsèques des cellules souches des poils, des études *in situ* ont été menées sur la vibrisse de la souris. Quoique le statut particulier de ce poil soit reconnu, peu de travaux ont porté sur l'évaluation de l'organisation particulière et les propriétés de ses cellules souches. Un autre objectif visé

par ces travaux était de mieux comprendre la fonction des kératines 17 et 19. Nous avons donc analysé les caractéristiques histologiques, l'expression des kératines et l'organisation ultrastructurale du réseau de filaments intermédiaires des cellules composant la niche des cellules souches de vibrisses prélevées sur des souris normales ou des souris déficientes en K17. Afin d'évaluer la fonctionnalité des cellules composant les différentes portions de la vibrisse, le modèle de peau reconstruite par génie tissulaire décrit au Chapitre III fut adapté à leur culture. Les résultats de ces travaux sont présentés au Chapitre IV.

Chapitre II Peau humaine reconstruite in vitro greffée sur la souris athymique

Avant-Propos

Ce chapitre reproduit le manuscrit intégral d'un article intitulé *Reconstructed human skin produced in vitro and grafted on athymic mice* publié en 2002 dans la revue *Transplantation*, volume 73, pages 1751-1757. Ce même article est aussi disponible en ligne par le site : www.transplantjournal.com

Ma participation à ces travaux, qui avaient été entamés principalement par Roxane Pouliot et décrits en partie dans sa thèse déposée en 1999 à l'Université Laval (Pouliot, 1999), consiste à la reproduction de l'expérience initiale et à l'analyse des composantes de la portion dermique des peaux reconstruites incluant les études de microscopie électronique faisant l'objet des figures 5 et 6. J'ai également participé à la rédaction du manuscrit en collaboration et sous la supervision des Docteurs Roxane Pouliot et Lucie Germain.

II.1 Résumé

Introduction La greffe de peau reconstruite fabriquée à partir de cellules cutanées vivantes et autologues est un traitement efficace contre les brûlures graves. En effet, puisque les cellules de la peau reconstruite sont acceptées par le système immunitaire du patient, le greffon est permanent. Dans cette étude, nous avons développé des peaux reconstruites dermo-épidermiques exclusivement à partir de cellules cutanées humaines et avons évalué leur maturation *in vivo* et *in vitro*.

Méthodologie D'une part, la portion dermique des peaux reconstruites a été produite par la superposition de feuillets de fibroblastes humains cultivés avec de l'acide ascorbique. D'autre part, des kératinocytes de sujets nouveau-nés ou adultes ont étéensemencés sur les dermes reconstruits et cultivés pendant 10 jours. Les peaux reconstruites ont ensuite été greffées sur la souris athymique (maturation *in vivo*) ou cultivées à l'interface air-liquide (maturation *in vitro*). Des biopsies cutanées ont été prélevées avant et après 4 jours, 21 jours ou 6 mois de greffe ainsi qu'à 21 jours de culture à l'interface air-liquide. Des analyses histologiques, immunohistochimiques et ultrastructurales ont été menées sur les coupes de peaux reconstruites afin de caractériser leur différenciation.

Résultats Au toucher, les peaux reconstruites étaient remarquablement souples et résistantes avant la greffe, et nous avons constaté que ces propriétés s'amélioraient après la greffe. L'analyse des coupes histologiques des peaux reconstruites cultivées pendant 21 jours à l'interface air-liquide a permis d'y observer la présence de toutes les couches de différenciation épidermique (basale, épineuse, granuleuse et cornée). Quatre jours après la greffe, l'épiderme composé de kératinocytes de nouveau-né était plus épais que celui constitué de kératinocytes adultes. Cependant, l'épaisseur de l'épiderme des deux types de kératinocytes était similaire après 21 jours de greffe. Plusieurs antigènes de la membrane

basilaire (antigène de la pemphigoïde bulleuse, laminine, collagène IV, collagène VII) ont été détectés au niveau de la jonction dermo-épidermique par la technique d'immunofluorescence indirecte, et ce, dès le quatrième jour de greffe. Cependant, l'analyse des peaux reconstruites par microscopie électronique à transmission a permis de constater que son organisation n'était complète qu'après 21 jours de greffe, ou bien 21 jours de culture à l'interface air-liquide. La présence d'un derme bien organisé, comprenant de nombreuses fibres de collagène et des fibres élastiques, a également été observée lors des analyses ultrastructurales.

Conclusion Ce modèle unique de peau reconstruite est facile à manipuler et démontre une excellente maturation après sa greffe. Il est fait entièrement de cellules humaines et de leurs produits de sécrétion, et pourrait être utilisé pour le traitement des blessures cutanées profondes.

II.2 Reconstructed human skin produced in vitro and grafted on athymic mice

Roxane Pouliot^{1,2,3}, Danielle Larouche^{1,3}, François A. Auger¹, Julianna Juhasz², Wen Xu¹, Hui Li¹, and Lucie Germain¹

¹ Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale, Hôpital du Saint-Sacrement du CHA and Département de chirurgie, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada.

² Faculté de pharmacie, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada.

³ The first two authors have contributed equally to the article.

Abbreviations:

RHS: reconstructed Human Skin

HLA: Human Leukocyte Antigen

FITC: Fluorescein isothiocyanate

DME: Dulbecco-Vogt modification of Eagles medium

EGF: Epidermal Growth FactorAbstract

Abstract

Background. The best alternative to a split-thickness graft for the wound coverage of patients with extensive burns should be *in vitro* reconstructed autologous skin made of both dermis and epidermis, and devoid of exogenous extracellular matrix proteins and synthetic material. We have designed such a reconstructed human skin and present here its first *in vivo* grafting on athymic mice.

Methods. The human reconstructed skin was made by culturing newborn or adult keratinocytes on superimposed fibrous sheets obtained after culturing human fibroblasts with ascorbic acid. Ten days after keratinocyte seeding, reconstructed skins were either cultured at the air-liquid interface or grafted on athymic mice. We present the macroscopic, histologic and phenotypic properties of such tissues *in vitro* and *in vivo* after grafting on nude mice.

Results. After maturation *in vitro*, the reconstructed skin exhibited a well developed human epidermis expressing differentiated markers and basement membrane proteins. Four days after grafting, a complete take of all grafts was obtained. Histological analysis revealed that the newly generated epidermis of newborn rHS was thicker than that of adult rHS after 4 days but similar 21 days post-grafting. The basement membrane components; bullous pemphigoid antigens, laminin, and type IV and VII collagens were detected at the dermo-epidermal junction, showing a continuous line 4 days after grafting. Ultrastructural studies revealed that the basement membrane was continuous and well organized 21 days after transplantation. The macroscopic aspect of the reconstructed skin revealed a resistant, supple and elastic tissue. Elastin staining and elastic fibers were detected as a complex network in the rHS that contributes to the good elasticity of this new reconstructed tissue.

Conclusions. This new rHS model gives supple and easy to handle skins while demonstrating an adequate wound healing on mice. These results are promising for the development of this skin substitute for permanent coverage of burn wounds.

Introduction

Deep burns cause dramatic fluid escape, loss of temperature control, drastic disturbances of ion equilibrium, immunodepression, pain, and bacterial invasion. The treatment of these patients requires a fast skin replacement in order to reform the functional and protective barrier that differentiated epidermis provides. The difficulty in the treatment of extensively and deeply burned patients has been the limited number of donor sites available for autografting. Allografts obtained from human cadaver skin, xenografts from animal skin, or synthetic dressing could be used to rapidly cover burn wounds. These treatments will provide protection but they offer only a transitory solution that will necessitate a definitive treatment. The first two (allogeneic and xenogeneic grafts) will be rejected whereas synthetic dressings obviously accomplish temporary covering.

A new avenue for wound treatment arises from the rapidly developing technology of tissue engineering (1-4). The possibility to expand epidermal cells *in vitro* and to produce autologous cultured epithelium represents an important breakthrough in burn therapy since it allows permanent coverage of large burn wounds (5, 6). However, these cultured epithelial sheets reconstruct only the epidermis (the upper layer of skin). They lack dermis and the mechanical properties associated with this connective tissue: suppleness, tensile strength and elasticity (4). Various approaches have been designed to produce dermal substitutes *in vitro* from fibroblasts cultured in collagen gels or collagen-glycosaminoglycan sponges, or seeded on synthetic or polyglycolic acid meshes (3, 7-9). The addition of either extracellular matrix components (animal collagen), synthetic or biodegradable polymers or allogeneic fibroblasts in these models results in a risk of triggering an inflammatory process and/or transferring infectious agents. Therefore, the best skin substitute for permanent replacement would be completely autologous, produced without any synthetic or extracellular matrix components from allogeneic or xenogeneic source.

We have reached this goal recently by setting up a new tissue engineering method named the auto-assembly approach (1, 10). It is based on the production of dermal sheets by culturing fibroblasts in a culture medium containing ascorbic acid which sustains the formation of extracellular matrix by fibroblasts. The cultured keratinocytes are then added on top of three superposed dermal sheets to produce reconstructed human skin (11).

In the present study, reconstructed human skins were produced from adult or newborn keratinocytes. These reconstructed human skins were grafted on athymic mice in order to evaluate their fates after grafting. Our results show that in addition to reforming a permanent coverage with histologically normal and adequately differentiated tissue, the presence of a well developed dermo-epidermal junction as well as collagen network and elastic fibers in the dermis imparts good mechanical properties to these reconstructed human skins after grafting.

Materials and methods

Cell culture media

Keratinocytes were grown as previously described (6, 12) in a complete keratinocyte medium: a combination of Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium (DME) with Ham's F12 in a 3:1 proportion (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada), supplemented with 24.3 µg/ml adenine (Sigma Chemicals, St-Louis, MO), 5 µg/ml insulin (Sigma), 2×10^{-9} M 3, 3', 5' triiodo-L-thyronine (Sigma), 5 µg/ml human transferrin (Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada), 0.4 µg/ml hydrocortisone (Calbiochem, La Jolla, CA), 10^{-10} M cholera toxin (ICN Biochemical, Montréal, Québec, Canada), 10% Fetal Clone II serum (Hyclone, PDI Bioscience, Aurora, Ontario, Canada), 10 ng/ml human epidermal growth factor (EGF) (Austral Biological, San Ramon, CA), 100 UI/ml penicillin G (Sigma) and 25 µg/ml gentamicin sulfate (Schering Inc, Pointe-Claire, Canada). Fibroblasts were cultured in DME, supplemented with 10% fetal calf serum (ImmunoCorp, Montréal, Québec, Canada) and antibiotics.

Cell culture

Human keratinocytes and dermal fibroblasts were obtained from normal adult skin specimens removed during reductive breast surgery or newborn foreskin. Keratinocytes were isolated as previously described. Briefly, skin fragments were digested with 500 µg/ml thermolysin (Sigma) for 2 h at 37°C (12). Then, the dermis was mechanically separated from the epidermis with forceps. Keratinocytes were dissociated from the epidermis with a trypsin solution (0.05% trypsin 1-300 (ICN Biochemical, Montréal, Canada)) containing 0.01% EDTA (Becker Chemical Co., Philisburg, NJ). Cells were seeded at 1×10^6 keratinocytes/cm² on a lethally irradiated 3T3 fibroblast feeder layer in the complete medium and cultured as previously described (12, 13). Keratinocytes were used at their third passage.

Human fibroblasts were obtained from the dermal portion of adult skin biopsies and cultured as previously described (11). Cells were used between their 4th and 8th passage.

All cultures were incubated at 37°C in a 8% CO² air atmosphere and culture media were changed three times a week.

Reconstructed human skin production

Adult fibroblasts were cultured for 35 days in the medium described above, supplemented by 50 µg/ml of ascorbate (Sigma) that supports extracellular matrix production and allows sheet formation. After peeling off from the dishes, three fibroblast sheets were superimposed and the surface area of the construct was maintained by an anchoring ring. One week later, 2X10⁵ human (newborn or adult) keratinocytes/cm² were seeded on the surface of reconstructed dermis and cultured in complete keratinocyte medium. They reached confluence after 8 days of submerged culture and were then either 1) grafted on athymic mice or 2) raised at the air-liquid interface for 21 more days of culture with complete keratinocyte medium containing 50 µg/ml ascorbate, only 5% serum, and no EGF. Media were changed three times a week.

Reconstructed human skin grafting on nude mice

Adult male athymic nu/nu mice (42 days old) were used as graft recipients. They were purchased from Charles River Laboratories of Canada (Lasalle, Québec) and maintained under sterile housing conditions. The mice were injected with ceftazidime (3 mg/mouse, Glaxo, Canada, Toronto) 48 and 24 h before surgery to prevent infections. Antibiotics (100 IU/ml penicillin G and 25 µg/ml gentamicin, Sigma, Mississauga, Canada), were also added to the sterile drinking water. The human rHS was grafted on the dorsal muscular bed as previously described (14). Mice were inspected regularly for visual sign of necrosis. A total of 12 mice were grafted. The graft take was assessed visually by an experienced surgeon. Four mice (2 grafted with newborn and 2 with adult rHS) were killed 4 days, 21 days and 6 months after grafting for histologic analysis of the grafts.

Histology and Immunohistochemistry

For histological analyses, biopsies were excised, fixed in Bouin, and paraffin-embedded. At least 2 sections from 2 different blocks per grafted tissue were studied. Five μm thick tissue sections were processed for standard hematoxylin, phloxine, and saffron staining. Immunohistology was performed on 4 μm thick cryosections fixed with acetone (10 min at -20°C) as previously reported (15). The antibodies used were: mouse monoclonal anti-human collagen VII (Chemicon, Temecula, CA), anti-HLA-A, -B, -C, (gift from Dr. Raynald Roy, Centre Hospitalier de l'Université Laval, Québec, Canada), rat monoclonal anti-laminin, rabbit polyclonal anti-human collagen IV (Chemicon), rabbit anti-human elastin (gift from Dr. Daniel Hartmann, Institut Pasteur, Lyon, France), goat anti-mouse IgG-IgM conjugated with FITC (Caltag, Cederlane Lab., Hornby, Ontario, Canada) or rhodamin, goat anti-rabbit IgG conjugated with DTAF, goat anti-rat IgG conjugated with FITC (Chemicon). Sections were then examined under a Nikon Optiphot microscope (Melville, USA), equipped with epifluorescence, and photographed with Kodak Tmax 400 ASA film.

Transmission electron microscopy

Samples were fixed in 2% glutaraldehyde and processed for electron microscopy as previously described (4).

Results

Macroscopic analysis of reconstructed human skin matured *in vitro* or *in vivo*

The rHS cultured for 21 days at the air-liquid interface appeared macroscopically as a homogeneous tissue resembling human skin. Its reconstructed dermal component was remarkably resistant. When seeded with keratinocytes and cultured submerged in medium, the reconstructed epidermis had a shiny appearance. After culturing at the air-liquid interface to induce epidermal cell differentiation, the epidermal coverage became visible to the eye as a dry, smooth, whitish surface (Figure II-1).

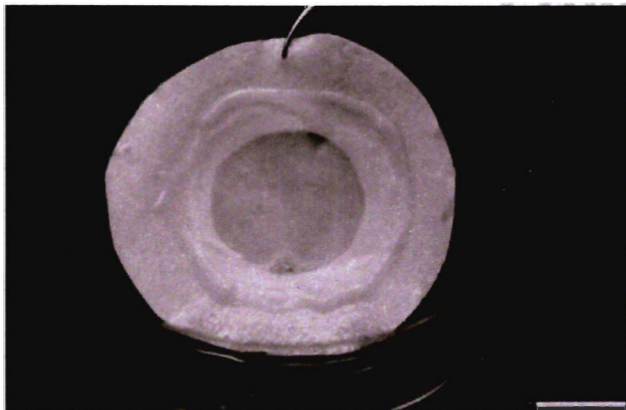


Figure II-1 Macroscopic aspect of the reconstructed human skin after culturing at the air-liquid interface for 21 days *in vitro*. (Scale bar: 1,22 cm)

The early grafting of rHS, cultured under submerged condition for 8 days after keratinocyte addition, resulted in a complete take of all grafts four days after transplantation. All rHS survived for the duration of the experiments. No signs of necrotic zones were seen as judged by visual inspection (nice pinky color, no necrotic or brown zones) (Fig. 2). The graft take was excellent. The gross aspect of rHS after grafting changed from shiny to whitish color indicating the formation of a stratum corneum induced by the contact with the air.

The integrity of the rHS was conserved after grafting. No evidence of dermo-epidermal detachment by the formation of blisters has been observed. Moreover, this rHS exhibited remarkable resistance, elasticity and suppleness as shown in Fig. 2C. These uncommon mechanical properties were further looked at by immunohistological staining

and ultrastructural studies of the dermo-epidermal junction and extracellular matrix components (see below).

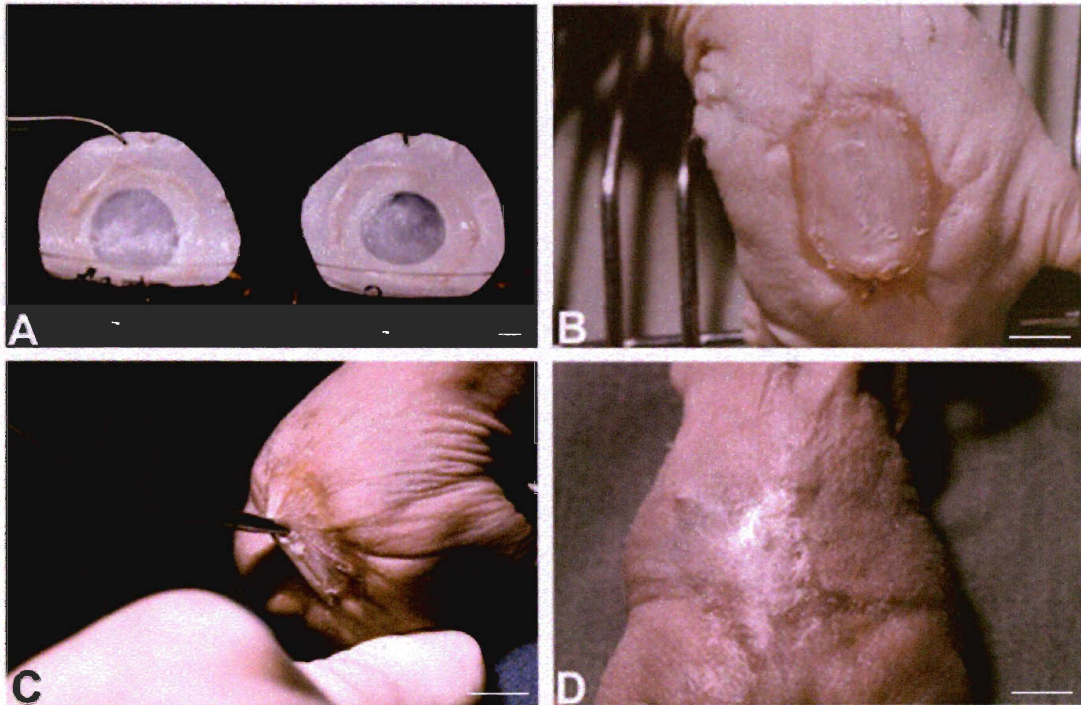


Figure II-2 Macroscopic aspects of reconstructed human skin before grafting (A), 28(B), 35(C) and 6 months (D) after grafting on nude mice. The reconstructed human skins were produced with newborn (A (left) and C) or adult (A (right), B and D) keratinocytes. Note that this rHS was resistant and supple (Fig. 2C). (scale bar, 1 cm)

Histological analyses

The maturation and differentiation *in vitro* and *in vivo* of rHS produced with newborn and adult keratinocytes were followed by histological staining. The rHS were grafted early, after only 8 days of keratinocyte culture under submerged conditions. The epidermis of adult and newborn rHS was then composed of two to three cell layers (Figs. 3A, B). Four days after grafting, both adult and newborn epidermis of rHS were composed of several cell layers, including the spinous and granular layers. The basal cells had retained their cuboidal morphology and the formation of a stratum corneum was in progress. At that

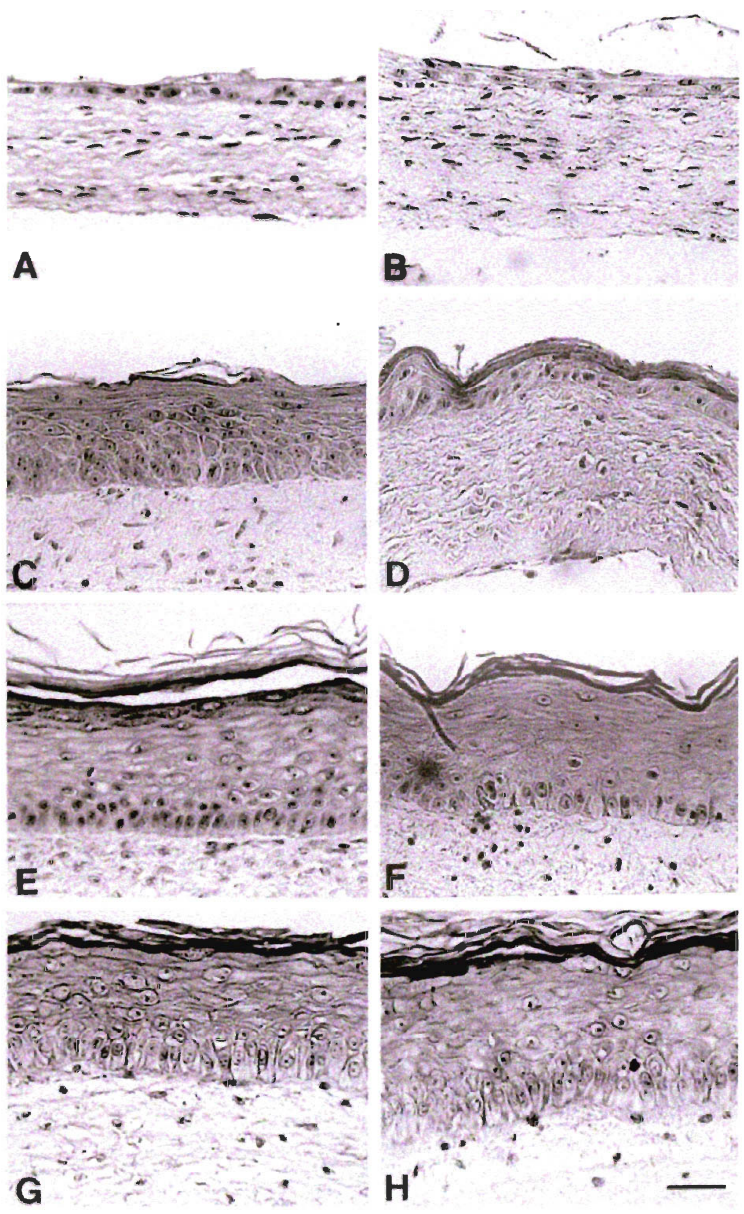


Figure II-3 Histological cross-section of a newborn (A, C, E, G) or adult (B, D, F, H) reconstructed human skin stained by Masson's trichrome. Note that the epidermis of newborn rHS (A) and adult rHS (B) was thin before grafting (8 days of epidermal cell culture in vitro under submerged conditions). Note that 4 days after grafting, the epidermis of newborn rHS (A) was thicker than that from adult rHS (B). A well organized epidermis with a thick stratum corneum was obtained 21 days after grafting (E, F). Note that the thickness of both newborn and adult epidermis was comparable at this time. The in vitro maturation obtained by culturing at the air-liquid interface for 21 days resulted in a well organized epidermis with all layers including a thick stratum corneum (G, H). Note that fibroblasts deposit a dense extracellular matrix forming a reconstructed dermis which provides a substrate for keratinocyte adhesion. (scale bar, 36 μ m)

Four days after grafting, both adult and newborn epidermis of rHS were composed of several cell layers, including the spinous and granular layers. The basal cells had retained their cuboidal morphology and the formation of a stratum corneum was in progress. At that early time after grafting, the epidermis of newborn rHS (Fig. 3C) was thicker than that of

adult rHS (Fig. 3D). However, 21 days after grafting, the thickness of the epidermal layer was similar for both types of rHS. The human epidermis of newborn and adult rHS progressively increased in thickness, leading to the establishment of all stratified layers normally present in human skin, including the stratum corneum (Figs. 3E, F). Both types of rHS comprised 10 to 15 cell layers, a thickness comparable to that of normal human breast skin or foreskin. The persistence of human cells after grafting was ascertained by staining the human histocompatibility complex (HLA-A, B, C). The positive staining of cells even after the removal of the Fusenig's chamber indicates the presence of the rHS at all times after grafting (data not shown). A similar epidermal cell maturation and differentiation was achieved *in vitro* by culturing at the air-liquid interface for 21 days (Figs. 3G, H). The rHS presented a well organized epidermis with all histological layers present. The stratum corneum was sometimes thicker than normal likely because of the absence of desquamation under these *in vitro* culture conditions.

Basement membrane and dermal organization sustaining the mechanical properties

The basement membrane reflects the cohesion between the epidermis and the dermis. It is essential to prevent the mechanical separation of these 2 cutaneous tissues. The new production method of dermis by the auto-assembly approach results in fibroblasts surrounded by a dense extracellular matrix on which keratinocytes can attach and reform the dermo-epidermal junction (Fig. 3). To evaluate the presence of basement membrane components, immunohistochemistry was performed on frozen tissues from biopsies harvested 4 and 21 days after grafting. Laminin, type IV and type VII collagens, and bullous pemphigoid antigen were all present at the dermo-epidermal junction (Fig. 4). Moreover, ultrastructural studies confirmed a very well structured dermo-epidermal junction with the presence of hemidesmosomes, lamina lucida, lamina densa and microfibrils (Fig. 6). Similar results were obtained for rHS produced with adult or newborn epidermal cells. This good organization of the dermo-epidermal junction was maintained for the duration of the experiments (6 months grafting).

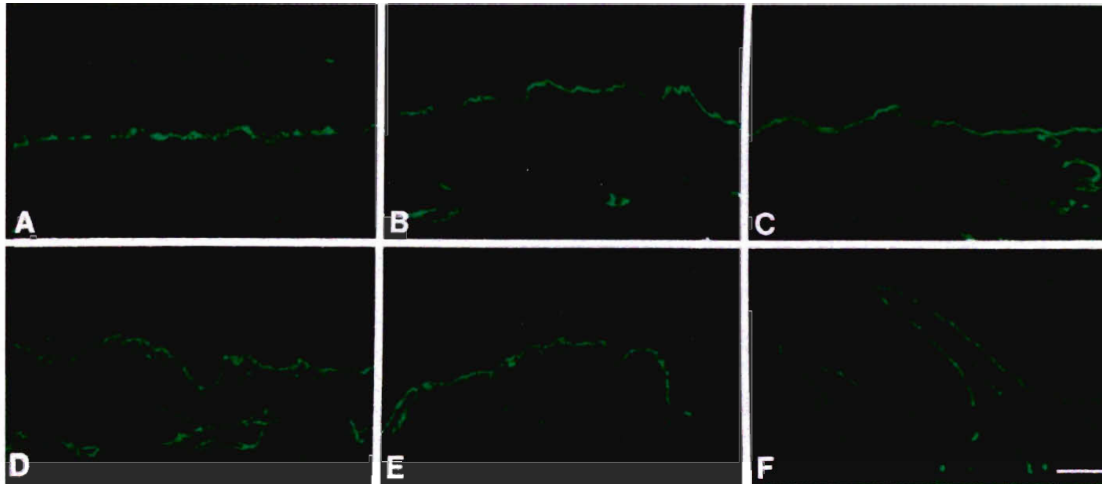


Figure II-4 Basement membrane components were detected in rHS after grafting. Immunofluorescence stainings of adult (A, B, D, E) and newborn (C, F) rHS 4 (A) or 21 days (B-F) days after grafting using rat monoclonal anti-laminin (A, B, C), rabbit polyclonal anti-human collagen IV (D), bullous pemphigoid (E) and anti-human collagen VII (F). (scale bar, 36 μm)

The mechanical properties of the skin rest on the presence and particular organization of collagen fibrils and elastic fibers. To evaluate if elastin could be responsible for the particular elasticity and suppleness observed macroscopically, we have stained this main component of the elastic system in the dermis. Elastin was already detected in the rHS before grafting (Fig. 5A). Twenty-one days after grafting, elastin was remodeled in a network of thin fibrils (Fig. 5B). Six months after grafting, thin fibrils perpendicular to the dermo-epidermal junction were present and thicker elastic fibers forming a network parallel to the basement membrane were observed deeper in the dermis (Figs. 5D, E). Transmission electron microscopy analysis revealed a differentiated epidermis with a well-developed intermediate filament network after a maturation of 21 days at the air-liquid interface *in vitro* or 21 days after grafting (data not shown). At the dermo-epidermal junction, the presence of a discontinuous basement membrane was noted 4 days after grafting (data not shown). However, the basement membrane was continuous with a complete lamina densa and a distinct lamina lucida with maturation (after 21 days of culture *in vitro* at the air-liquid interface (Fig. 6A), or 21 days after grafting (Fig. 6E)). Numerous hemidesmosomes were present along the basement membrane and were shown to be connected with keratin

intermediate filaments of keratinocytes (Fig. 6A), and with collagen fibers of the reconstructed dermis by anchoring fibrils (Fig. 6C). In the dermis collagen fibrils had a typical cross striation periodicity (Fig. 6D). In addition, 10-12 nm microfibrils were observed perpendicularly to the dermo-epidermal junction, consistent with the ultrastructural aspect of oxytalan fibers (Fig. 6B). Bundles of 10-12 nm microfibrils parallel to collagen fibers were also observed within the dermis before (not shown) and after grafting (Figs. 6E, F, G). Moreover, deeper in the dermis, amorphous material was present close to the bundles of parallel microfibrils, indicating that elastin and elastic fibers were present after grafting (Fig. 6).

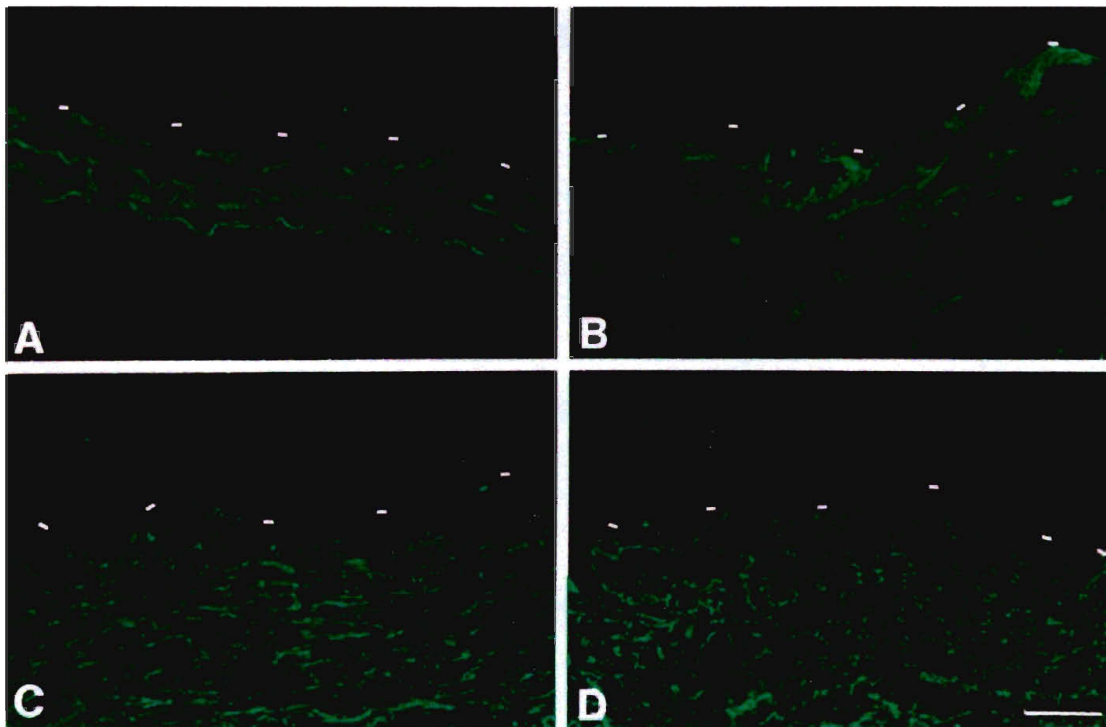


Figure II-5 Elastin was detected in reconstructed human skin. Indirect immunofluorescence stainings of newborn rHS (A, B, D) and adult rHS (C) with anti-human elastin antibody immediately before grafting (A) or 21 days (B) and 6 months (C, D) after grafting. Note the presence of thin fibers containing elastin prior grafting, and the increasing diameter of these fibers with time after grafting. Dashed line represents the dermo-epidermal junction. (scale bar, 45 μm)

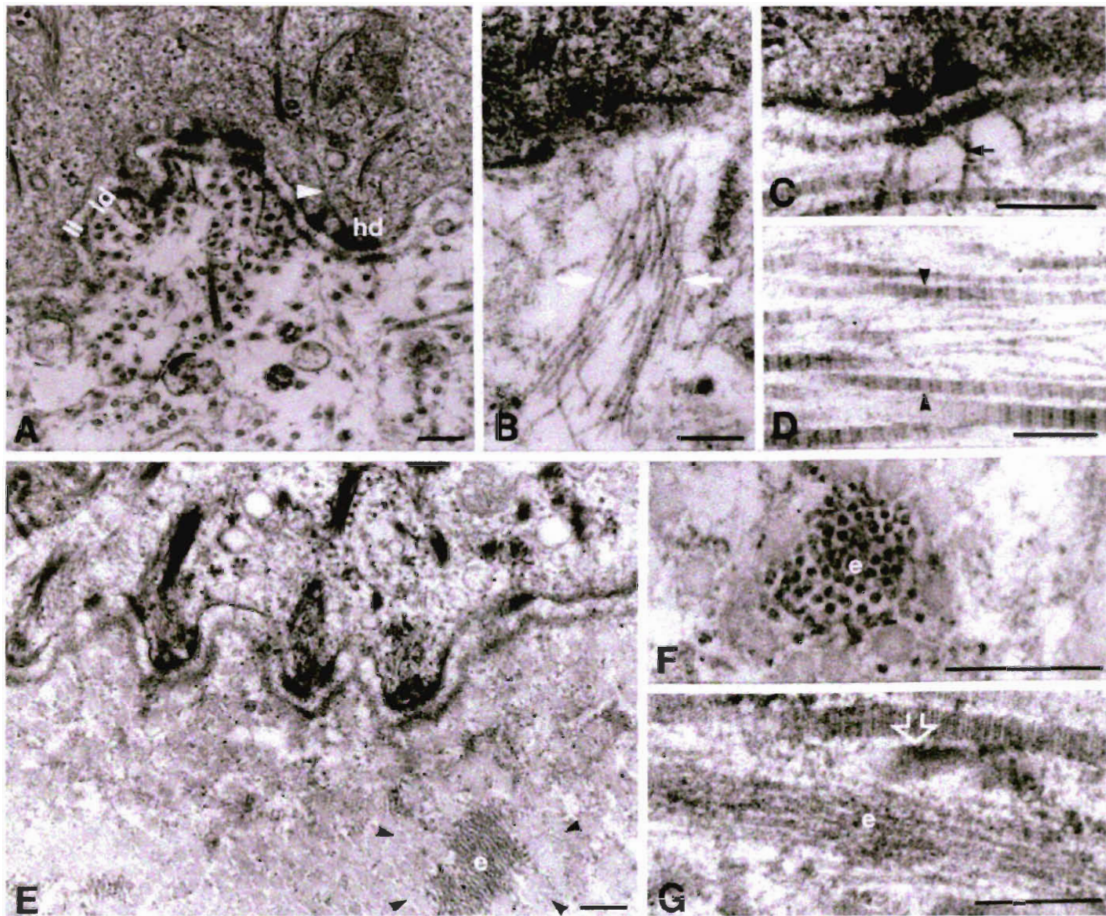


Figure II-6 Transmission electron microscopy observations of reconstructed human skin after 21 days of in vitro culture at the air-liquid interface (A, B, C) or 21 days after grafting (D, E, F). Note the continuous basal membrane with a complete lamina densa (ld) and lamina lucida (ll) and numerous hemidesmosomes (hd) at the dermo-epidermal junction and the well-developed intermediate filament network (white arrowhead) after 21 days of maturation at the air-liquid interface (A). In the dermis, 10-12 nm microfibrils oriented perpendicularly to the dermo epidermal junction were present indicating oxytalan elastic fibers (B, white arrows) and hemidesmosomes were connected with collagen fibers of the reconstructed dermis by anchoring fibrils (C, black arrow). Collagen fibrils with typical 67-nm cross striation periodicity were observed (D, black arrowheads). In the same manner, cross-section (E, F) or longitudinal (G) section of collagen fibers (E, black arrowheads) and bundles of parallel microfibrils (e) were present close to amorphous material (G, open arrow) in rHS dermis 21 days after grafting. (scale bar, 200 nm)

Discussion

The grafting of autologous skin is the treatment of choice for deeply burned patients. However, it necessitates available donor sites and this technique inflicts an additional trauma to the patient since autograft harvesting generates the equivalent of a superficial second-degree burn at the donor site (16). For these patients with extensive burns, the best alternative to split-thickness grafts would be the coverage of their burn wounds with autologous reconstructed skin comprising both the dermis and the epidermis. In this report, we have established the feasibility of producing and grafting a completely biological human skin reconstructed by tissue engineering with good graft take and mechanical properties.

This new tissue-engineered reconstructed skin is entirely made from human cells, devoid of exogenous extracellular matrix proteins and synthetic material. Thus, the auto-assembly approach of tissue engineering diminishes the risk of viral contamination associated with bovine collagen. The main advantage of this new rHS is that it is produced exclusively from human fibroblasts and keratinocytes and does not contain any synthetic material. It is based on the effect of ascorbic acid that increases procollagen mRNA synthesis by human and mouse (17-22). Cultured fibroblasts recreate a physiological environment by secreting and organizing, in the presence of vitamin C, a 3-dimensional extracellular matrix with characteristics similar to those observed *in vivo* (10). The natural sheet formed at the bottom of the dish can be peeled off and stacked to create thick and dense dermal substrates on which keratinocytes are (11). Macroscopically, the rHS mimics the human skin and, from a surgical point of view, it was strong enough to be handled and grafted easily on a wound. The athymic mouse was chosen as an experimental model to follow the *in vivo* evolution of rHS since they do not reject xenogeneic (16, 23-25). Our experimental protocol (Fusenig's silicon chamber and excision to the muscle) ensures a sufficient graft size without any possibility of graft replacement by mouse skin (24, 26). The detection of HLA antigens on the grafts indicate that the human cells were not replaced by mouse cells. The functionality of these xeno- or allo-antigens is revealed by the rejection

of cultured human or mouse keratinocytes when they are grafted on normal immunocompetent mice (27, 28).

The excellent take of the grafted rHS without necrosis was confirmed by the histological analysis. A differentiated epidermis with cuboidal basal cells and several suprabasal layers was observed four days after grafting. At this early time point, the epidermis reconstructed with newborn human keratinocytes was thicker than the epidermis reconstructed with adult human keratinocytes. These age-dependent differences in the thickness of rHS are likely related to the different proportions of stem cells present in the keratinocyte populations seeded on reconstructed dermis (15). The number of skin stem cells in newborn is larger than in adult (29). It is also consistent with the clinical observations that the repair rate decreases with the age (30-32). However, at later time points (from 21 days after grafting), the epidermal layer was similar for both types of rHS, indicating that adult keratinocytes are suitable to produce good rHS after a longer period. This epidermis thickness (10 to 15 cell layers) was comparable to that of human skin. The same phenomenon was observed *in vitro* and with rHS put at the air-liquid interface.

The mechanical stability represents a challenging problem for biological tissues produced by tissue engineering. The new method of tissue reconstruction by auto-assembly approach produces tissue with elevated mechanical resistance as demonstrated previously for blood (10, 33). In the present study, the rHS presented strength, cohesion, good suppleness, and elasticity as shown in Fig. 1C. These macroscopic observations were in accordance with the microscopic organization and composition of the rHS. The quality of the adhesion between the epidermis and the dermis was likely due to the presence of laminin, types IV and VII collagens, and bullous pemphigoid antigens (Fig. 5) which organized in a complete basement membrane as demonstrated by electron microscopy (Fig. 6).

The elastin immunostaining performed to determine whether the particular suppleness and elasticity observed after grafting this new rHS was due to the presence of a good elastic network shows that elastin, the major component of elastic fibers, was present in the dermal layer of the rHS. The maturation of elastic fibers was well detected by a

positive and intense elastin labeling which formed a dense network after grafting. Oxytalan fibers, composed mainly of microfibrils which are perpendicularly oriented to the dermal-epidermal junction and which contribute to the connection between dermis and epidermis were detected before grafting, as observed in other skin substitutes (34, 35). However, oxytalan fibers (34, 35) are composed of only small amounts of elastin as well as the elaunin fibers (34, 35) disposed parallel to the dermo-epidermal junction. The intense elastin staining likely represents the network of elastic fibers observed as amorphous material in electron microscopy. The presence of keratinocytes may have contributed to the expression and organization of elastin and fibrillin in our skin model produced by the auto-assembly approach since Duplan-Perrat *et al.* observed that fibroblasts in bi-dimensional fibroblast cultures do not produce mature elastic fibers as they do in skin reconstructed with collagen-GAG-chitosan sponges (36). The complex network that contributes to the elasticity of connective tissue necessitated the presence of keratinocytes (36) and could be seen in our new skin model produced without exogenous matrix proteins or synthetic materials. In our rHS model, the elastogenesis is probably initiated in culture, and the elastic network maturation completed after grafting since microfibrils which are a template for elastin deposition (37, 38) are detected in culture together with elastin before grafting. The observation of amorphous material indicates maturation after grafting.

In conclusion, we present a novel approach in the production of reconstructed human skin exclusively based on the use of cultured human cells, without any synthetic or exogenous biomaterials. This model demonstrates a good handling with enhanced elasticity and suppleness while it promotes good healing of the wound in mice. Therefore, these results warrant further investigation of this promising technique for the application of human reconstructed skin for the permanent coverage of patients suffering from deep and extensive burns.

Acknowledgments

We are grateful to Drs. Alphonse Roy, Félix-André Têtu, Gabriel Gosselin for skin biopsies and Dr. Raynald Roy for the antibody. We sincerely thank Dr. Vincent Bernier for his expert advice on histological results.

References

1. Auger FA, Rémy-Zolghadri M, Grenier G, Germain L. The self-assembly approach for organ reconstruction by tissue engineering. *e-biomed: a Journal of Regenerative Medicine* 2000; 1: 75.
2. Black AF, Berthod F, L'Heureux N, Germain L, Auger FA. *In vitro* reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *Faseb J* 1998; 12: 1331.
3. Damour O, Augustin C, Black AF. Applications of reconstructed skin models in pharmaco-toxicological trials. *Med Biol Eng Comput* 1998; 36: 825.
4. Germain L, Auger FA. Tissue engineered biomaterials: biological and mechanical characteristics. *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, part B; Applications, vol 1: Marcel Dekker, inc. Publishers, NY USA, 1995: 699.*
5. Gallico GG, 3rd, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984; 311: 448.
6. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 5665.
7. Naughton G, Mansbridge J, Gentzkow G. A metabolically active human dermal replacement for the treatment of diabetic foot ulcers. *Artif Organs* 1997; 21: 1203.
8. Auger FA, Lopez Valle CA, Guignard R, *et al.* Skin equivalent produced with human collagen. *In vitro Cell Dev Biol Anim* 1995; 31: 432.
9. Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* 1981; 211: 1052.
10. L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *Faseb J* 1998; 12: 47.

11. Michel M, L'Heureux N, Pouliot R, Xu W, Auger FA, Germain L. Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In vitro Cell Dev Biol Anim* 1999; 35: 318.
12. Germain L, Rouabhia M, Guignard R, Carrier L, Bouvard V, Auger FA. Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns* 1993; 19: 99.
13. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6: 331.
14. Germain L, Guignard R, Rouabhia M, Auger FA. Early basement membrane formation following the grafting of cultured epidermal sheets detached with thermolysin or Dispase. *Burns* 1995; 21: 175.
15. Michel M, L'Heureux N, Auger FA, Germain L. From newborn to adult: phenotypic and functional properties of skin equivalent and human skin as a function of donor age. *J Cell Physiol* 1997; 171: 179.
16. Li H, Berthod F, Xu W, Damour O, Germain L, Auger FA. Use of *in vitro* reconstructed skin To cover skin flap donor site. *J Surg Res* 1997; 73: 143.
17. Geesin JC, Gordon JS, Berg RA. Regulation of collagen synthesis in human dermal fibroblasts by the sodium and magnesium salts of ascorbyl-2-phosphate. *Skin Pharmacol* 1993; 6: 65.
18. Lamandé SR, Bateman JF. A mouse 3T6 fibroblast cell culture model for the study of normal and protein-engineered collagen synthesis and deposition into the extracellular matrix. *Matrix* 1993; 13: 323.
19. Franceschi RT. The role of ascorbic acid in mesenchymal differentiation. *Nutr Rev* 1992; 50: 65.

20. Phillips CL, Tajima S, Pinnell SR. Ascorbic acid and transforming growth factor-beta 1 increase collagen biosynthesis via different mechanisms: coordinate regulation of pro alpha 1(I) and Pro alpha 1(III) collagens. *Arch Biochem Biophys* 1992; 295: 397.
21. Grinnell F, Fukamizu H, Pawelek P, Nakagawa S. Collagen processing, crosslinking, and fibril bundle assembly in matrix produced by fibroblasts in long-term cultures supplemented with ascorbic acid. *Exp Cell Res* 1989; 181: 483.
22. Geesin JC, Darr D, Kaufman R, Murad S, Pinnell SR. Ascorbic acid specifically increases type I and type III procollagen messenger RNA levels in human skin fibroblast. *J Invest Dermatol* 1988; 90: 420.
23. Berthod F, Damour O. *In vitro* reconstructed skin models for wound coverage in deep burns. *Br J Dermatol* 1997; 136: 809.
24. Auger FA, Guignard R, Lopez Valle CA, Germain L. Role and innocuity of Tisseel, a tissue glue, in the grafting process and *in vivo* evolution of human cultured epidermis. *Br J Plast Surg* 1993; 46: 136.
25. Berthod F, Hayek D, Damour O, Collombel C. Collagen synthesis by fibroblasts cultured within a collagen sponge. *Biomaterials* 1993; 14: 749.
26. Worst PK, Valentine EA, Fusenig NE. Formation of epidermis after reimplantation of pure primary epidermal cell cultures from perinatal mouse skin. *J Natl Cancer Inst* 1974; 53: 1061.
27. Rouabhia M, Germain L, Bergeron J, Auger FA. Allogeneic-syngeneic cultured epithelia. A successful therapeutic option for skin regeneration. *Transplantation* 1995; 59: 1229.
28. Rouabhia M. Permanent skin replacement using chimeric epithelial cultured sheets comprising xenogeneic and syngeneic keratinocytes. *Transplantation* 1996; 61: 1290.

29. Michel M, Torok N, Godbout MJ, *et al.* Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells *in vivo* and *in vitro*: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci* 1996; 109: 1017.
30. Grove GL. Age-related differences in healing of superficial skin wounds in humans. *Arch Dermatol Res* 1982; 272: 381.
31. Levenson SM, Birkhill FR, Waterman DF. The healing of soft tissue wounds: effect of nutrition, anemia and age. *Surgery* 1950; 28: 905.
32. Levenson SM, lund CC. Dermatome skin grafts for burns in patients prepared with dry dressings and with and without penicillin. *New Eng J Med* 1945; 233: 607.
33. L'Heureux N, Germain L, Labbe R, Auger FA. *In vitro* construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study. *J Vasc Surg* 1993; 17: 499.
34. Fleischmajer R, Contard P, Schwartz E, MacDonald ED, 2nd, Jacobs L, 2nd, Sakai LY. Elastin-associated microfibrils (10 nm) in a three-dimensional fibroblast culture. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 638.
35. Cotta-Pereira G, Guerra Rodrigo F, Bittencourt-Sampaio S. Oxytalan, elaunin and elastic fibers in the human skin. *J Invest Dermatol* 1976; 66: 143.
36. Duplan-Perrat F, Damour O, Montrocher C, *et al.* Keratinocytes influence the maturation and organization of the elastin network in a skin equivalent. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 365.
37. Frances C, Robert L. Elastin and elastic fibers in normal and pathologic skin. *Int J Dermatol* 1984; 23: 166.
38. Albert EN. Developing elastic tissue. An electron microscopic study. *Am J Pathol* 1972; 69: 89.

Chapitre III La composition du derme à l'intérieur d'une peau reconstruite par génie tissulaire influence la voie de différenciation des cellules souches du poil

Avant-Propos

Ce chapitre fait l'objet d'un article intitulé *The dermis composition within a tissue engineered skin influences the differentiation lineage of hair follicle stem cells* qui sera prochainement soumis pour publication dans la revue *Journal of Investigative Dermatology*.

J'ai conçu et réalisé la majorité des expériences et effectué la rédaction du manuscrit en collaboration et sous la supervision du Dr Lucie Germain. Kristine Cuffley a repris une partie des expériences dans le cadre de ses études de maîtrises et s'est grandement impliquée dans le projet, particulièrement au niveau des travaux portant sur l'étude de la voie Wnt.

III.1 Résumé

Dans ces travaux, une peau reconstruite par génie tissulaire capable de soutenir la croissance des follicules pileux a été mise au point. Différentes combinaisons cellulaires ont été utilisées pour fabriquer des peaux reconstruites : des kératinocytes isolés ou des follicules pileux immatures de souris ensemencés sur des feuillets de fibroblastes murins (derme reconstruit murin) ou humains (derme reconstruit humain) cultivés en présence d'acide ascorbique. Après 10 jours de culture en condition immergée, les différentes peaux reconstruites ont été greffées sur des souris athymiques ou cultivées à l'interface air-liquide. Autant *in vitro* (air-liquide) que *in vivo* (greffe), les kératinocytes épidermiques cultivés sur les deux types de dermes reconstruits ont formés un épiderme possédant les caractéristiques histologiques de la peau *in situ*. Cependant, les épidermes formés sur les dermes humains étaient plus épais que ceux formés sur les dermes murins. Après la greffe, des appareils pilo-sébacés complets se sont développés dans les peaux reconstruites contenant des follicules pileux immatures en contact avec des dermes murins tandis que les follicules pileux immatures ensemencés sur les dermes humains ont formé des structures anormales (kystes) présentant plusieurs caractéristiques de la différenciation épidermique. La présence de ces kystes a été reliée à l'absence d'expression des molécules Lef1 et β -caténine dans le noyau des kératinocytes. Dans les peaux reconstruites cultivées *in vitro*, les follicules pileux immatures en contact avec les dermes humains ont aussi formé des kystes à caractère épidermique tandis que ceux en contact avec les dermes murins ont formé des kystes présentant certaines propriétés de la gaine folliculaire externe du follicule pileux. Dans l'ensemble, ces résultats révèlent que les interactions mésenchyme-épithéliales recréées dans la peau reconstruite par génie tissulaire ont un impact important sur la différenciation des cellules souches épithéliales. De plus, les peaux reconstruites développées lors de ces travaux représentent de nouveaux outils qui pourront servir à l'analyse des facteurs impliqués dans les processus régissant la différenciation des cellules souches de la peau.

III.2 The dermis composition within a reconstructed skin influences the differentiation lineage of hair follicle stem cells

Danielle Larouche, Kristine Cuffley and Lucie Germain

Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale / LOEX Hôpital du Saint-Sacrement du
CHA, Québec, Québec, G1S 4L8 and Département de Chirurgie, Université Laval,
Sainte-Foy, Québec, Canada

Short title: Dermis influences skin stem cells differentiation

Abbreviations:

bK: Bulge keratinocyte

eAP: Endogenous alkaline phosphatase

EGF: Epidermal growth factor

FCS: Fetal calf serum

HFB: Hair follicle bud

hFS: Human fibroblast sheets

iK: Isolated keratinocytes

IRS: Inner root sheath

K: Keratin

mFS: Murin fibroblast sheets

ORS: Outer root sheath

PBS : Phosphate buffer saline

Key words: Stem Cells, Skin Substitute, Tissue Engineering, Mouse Cells, Culture, Hair follicle, Differentiation

Abstract

In this report, we have established the feasibility of producing a living tissue-engineered skin able to sustain the growth of hair follicles. Different reconstructed skins were designed: mouse isolated keratinocytes or mouse hair follicles buds (HFB) were added on top of superimposed fibroblast sheets obtained after culturing either mouse or human fibroblasts with ascorbic acid. After ten days of culture immersed in medium, reconstructed skins were grafted on athymic mice or cultured at the air-liquid interface. *In vivo* as well as *in vitro*, mouse fibroblast sheets (mFS) and human fibroblast sheets (hFS) promote the formation of a histologically normal and well differentiated epidermis from keratinocytes or hair follicle buds. However, human fibroblast sheets promoted a thicker epidermis than with murin fibroblast sheets. After grafting, complete pilo-sebaceous units were formed in skin reconstructed from hair follicle buds and murin fibroblast sheets (HFB/mFS). Alternatively, hair follicle buds in association with human fibroblast sheets (HFB/hFS) developed cysts instead of normal hairs, which correlated with the absence of the nuclear Lef1/ β -catenin complex in keratinocyte nuclei. In HFB/hFS skins cultured *in vitro*, hair follicle buds developed cysts featuring epidermal characteristics while in HFB/mFS skins, hair follicle buds rather formed cysts presenting bulge outer root sheath-like characteristics. These results 1) revealed that epithelial-mesenchymal interactions recreated in skin reconstructed by tissue engineering have a significant impact on the differentiation of epithelial cells, 2) provide useful tools for the analysis of factors implicated in the underlying physiology of stem cells differentiation towards epidermal or follicular lineage.

Introduction

Tissue engineering is a technology based on the capacity of cells to self-organize in a three-dimensional tissue under proper conditions. Thus, several type of skin substitutes were proposed (Auger *et al.*, 1995; Auger *et al.*, 2004; Bell *et al.*, 1981; Black *et al.*, 1998; Burke *et al.*, 1981; Cooper *et al.*, 1991; Damour *et al.*, 1994; Mansbridge *et al.*, 1998; Michel *et al.*, 1999; Pouliot *et al.*, 2002). However, none allows skin appendages formation in culture. Given that hair follicle morphogenesis is a complex process involving mesenchyme-epithelial interactions, adequate contacts between neighboring cells, extracellular matrix substrates and growth factors are likely required to the commitment of skin stem cells towards the hair follicle lineage in culture.

These past years, great progress has been made in understanding the mechanisms controlling the skin stem cells lineage commitment and it revealed the implication of the Wnt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal exchanges that specify morphogenesis of the hair follicles (Alonso and Fuchs, 2003; DasGupta and Fuchs, 1999; Gat *et al.*, 1998; Huelsken *et al.*, 2001; Jamora *et al.*, 2003; van Genderen *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1995). Cell receiving a Wnt signal responds by stabilizing the excess of β -catenin that is not used for cell-cell junctions. Thereafter, β -catenin translocates to the nucleus and binds to the transcription factors of the Tcf/Lef family. In the skin, the β -catenin/Lef1 complex has been implicated in the hair lineage commitment of skin stem cells (DasGupta and Fuchs, 1999; DasGupta *et al.*, 2002; Gat *et al.*, 1998; Huelsken *et al.*, 2001; Merrill *et al.*, 2001) and orchestrates the differentiation of the inner root sheath (IRS) and the hair shaft (DasGupta and Fuchs, 1999; Kaufman *et al.*, 2003; Kobiela *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 1995).

The self-assembly technique is a new approach of tissue engineering developed at the LOEX laboratory (Auger *et al.*, 2002; L'Heureux *et al.*, 1998). This method allows the reconstruction of living tissues such as reconstructed blood vessels, cornea or skin (Gaudreault *et al.*, 2003; L'Heureux *et al.*, 1998; Laflamme *et al.*, 2005; Michel *et al.*, 1999; Pouliot *et al.*, 2002), and the integration and the survival of dissected human pilo-sebaceous units following their insertion *in vitro* (Michel *et al.*, 1999). However, for a

grafting purpose, it is essential to ensure that the differentiation of stem cells is properly regulated in the hairy reconstructed skin given that aberrant activation or inhibition of the Wnt signaling pathway have been implicated in skin tumorigenesis (Bhatia and Spiegelman, 2005; Gat *et al.*, 1998; Huelsken *et al.*, 2001; Lo Celso *et al.*, 2004; Niemann *et al.*, 2002).

In order to evaluate the capacity of reconstructed skin to sustain the differentiation of stem cells in complete pilo-sebaceous units, we adapted the LOEX self-assembly approach to mouse hair follicle bud (HFB) and keratinocyte culture. Two dermal substitutes were compared in regard to their influence on mouse keratinocytes or HFB differentiation: dermal substitutes prepared by the superimposition of newborn mouse fibroblast sheets (mFS) or adult human fibroblast sheets (hFS). To follow their maturation, reconstructed skins were grafted on athymic mice or cultured *in vitro*.

We found that the type of fibroblasts used to reconstruct the dermis have a major influence on epithelial cell differentiation. Skins reconstructed from HFBs and mFS (HFB/mFS) can sustain the formation of complete pilo-sebaceous units after grafting, whereas HFBs develop cysts featuring epidermal characteristics when they are in association with hFS (HFB/hFS). The failure to form hairs in HFB/hFS skins correlated with the absence of the nuclear Lef1/ β -catenin complex in matrix cells of the HFB-derived cysts. This work revealed that epithelial-mesenchymal interactions recreated in skin reconstructed by tissue engineering influence the differentiation lineage of stem cells.

Materials and methods

Cells preparation

Murine keratinocytes (iK) were freshly extracted from the trypsin-separated epidermis of C3H/Hen newborn mice (0-2 days old) according to the method of Yuspa and Harris 1974 (Yuspa and Harris, 1974). The epidermal cells were washed in complete keratinocyte medium (cDME Ham): a combination of Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium (DME) with Ham's F12 in a 3:1 proportion (Gibco BRL, Burlington, Ontario), supplemented with 24.3 µg/ml adenine (Sigma, Oakville, Ontario), 5 µg/ml insulin (Sigma), 2×10^{-9} M 3, 3', 5' triiodo-L-thyronine (Sigma), 5 µg/ml human transferrin (Boehringer Mannheim, Laval, Québec), 0.4 µg/ml hydrocortisone (Calbiochem, La Jolla, California), 10^{-10} M cholera toxin (ICN Biochemical, Montréal, Quebec), 10% Fetal Clone II serum (Hyclone, PDI Bioscience, Aurora, Ontario), 10 ng/ml murine epidermal growth factor (EGF) (Sigma), 100 UI/ml penicillin G (Sigma) and 25 µg/ml gentamicin sulfate (Schering Inc, Pointe-Claire, Quebec) and filtered in 100 µm cell strainer (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New-Jersey). HFBs (0-2 days old C3H/Hen mice) and newborn mouse fibroblasts (2 days old FVB/N mice) were obtained by collagenase digestion of trypsin-separated dermis as described (Lichti *et al.*, 1993; Weinberg *et al.*, 1993). Three low-speed centrifugations (400 rpm, 3 min) in cDME Hams were performed to sediment HFBs. Fibroblasts were recuperated in supernatant after washing with DME supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) to remove collagenase and the final suspension was filtered in a 40 µm cell strainer (Falcon). bK from vibrissae of FVB/N mice (12 days old) were obtained following bulge dissection under a Nikon Smz-2T binocular microscope (Nikon, Mississauga, Ontario). Bulges sections were explanted on tissue-engineered dermis (see below) and cultured in cDME Hams. Human fibroblasts were obtained from the dermal portion of skin biopsies and cultured as described (Germain *et al.*, 1995). Cells were used between their 4th and 8th passages. All cultures were incubated at 37°C in a 8% CO² air atmosphere and culture media were changed three times a week.

Skin reconstruction and grafting procedure

Murine or human fibroblasts were cultivated 28-35 days in DME 10% FCS supplemented by 50 µg/ml of ascorbate which allows the production of ECM and the formation of a fibroblast sheet. Accordingly to the self-assembly approach (Michel *et al.*, 1999; Pouliot *et al.*, 2002), fibroblast sheets (two for *in vitro* experiments and four for *in vivo* experiments) superimposed to obtain a tissue-engineered dermis on which epithelial cells were seeded 1 week later to obtain reconstructed skins. 600 000 iKs, 10 % of the HFBS collected from each newborn dermis or 2 bulge explants per cm² were seeded on the surface of reconstructed dermis. To obtain complete maturation of the reconstructed skins *in vivo*, samples were cultured 10 days immersed in cDME Ham's, prior to the grafting on the dorsal muscular bed of adult (42 days old) male athymic nu/nu mice, Charles Rivers) as previously described (Germain *et al.*, 1995; Pouliot *et al.*, 2002). 2-8 mice were grafted for each condition. Animals were killed 1 and 6 months after transplantation. Biopsies were embedded in Tissue-Tek® OCT Compound (Miles Inc, Elkhart, Indiana) or processed for histological analysis. To study maturation of the reconstructed skins *in vitro*, samples were cultured immersed in cDME Ham's until the formation of a 2-3 layers thick epithelium (7 days for reconstructed skins with iKs and HFBS, 14 days for reconstructed skin with bKs) and were raised at the air-liquid interface in DME Ham's 5% serum free of EGF for 21 days. Biopsies were taken 7, 14 and 21 days later. 5-9 reconstructed skins were produced for each condition, with the exception of bK/mFS cultured 7 days at the air-liquid interface, where 3 reconstructed skins were produced.

Histological analysis, oil red O staining and endogenous phosphatase activity revelation

For histological analysis, biopsies were fixed with Histochoice™ MMB® fixative (Amresco, Solon, Ohio) and embedded in paraffin. Six-µm thick sections were processed for standard Masson's trichrome staining. Standard oil red O staining was performed to reveal lipid droplets. The endogenous alkaline phosphatase activity was detected as described (Handjiski *et al.*, 1994).

Immunolabelings

Indirect immunofluorescence stainings were performed on 5 µm-thick, acetone-fixed (10 min at -20°C) frozen sections of tissues as described (Michel *et al.*, 1996). Primary antibodies used were rabbit polyclonal anti-K5 (AF 138) (BabCO, Richmond, California), anti-human Collagen IV (Chemicon, Temecula, California), anti-β-catenin (Cell signaling, Beverly, Maryland) and anti-mouse loricrin AF 62 (Covance, Princeton, New Jersey), goat polyclonal anti-Lef1 (Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, California), guinea-pig polyclonal anti-K19 (Michel *et al.*, 1996) and anti-human recombinant K15 (Progen Biotechnik, Heidelberg) and rat monoclonal anti-Laminin-5 (Chemicon). Goat secondary antibodies were used: anti-rabbit conjugated with DTAF or rhodamin (Chemicon), anti-guinea pig conjugated with FITC (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania) and anti-rat conjugated to Alexa 594 (Molecular Probe™, Invitrogen, Burlington, Ontario). In some instances, Hoechst stain was applied to visualize nuclei. For immunoperoxidase stainings, slides were sequentially incubated with Formol (1%, 10 minutes), methanol (100%, 10 minutes), NaOH (0,07N, 15 seconds) and the Vector® M.O.M Basic Kit to reduce non-specific staining arising from endogenous mouse immunoglobins in the tissue. Then, the sections were labeled with mouse anti-cytokeratin 8.60 (Sigma), anti-Ki67 (BD Biosciences, San Diego, California), anti-human K20 (IT-Ks 20.10, ARP) and anti-desmosomal protein (Sigma) and revealed using the Ultra HRP peroxidase detection system (ID Labs Inc, London, Ontario) and incubation with 3-3'-diaminobenzidine (Sigma). Each incubation was separated by phosphate buffer saline (PBS) washing. Harris's hematoxylin staining procedure was used to color nuclei. The slides were examined under a Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon) equipped with a SenSys® digital camera (Photometrics®, Tucson, Arizona) for immunofluorescence pictures and a Coolsnap™ digital camera (Photometrics®) for color pictures. Multi-colored pictures and adjustments of brightness and contrast (applied to the whole image to obtain picture corresponding to observations) were made using Adobe® Photoshop 7.0 software (San Jose, California).

Western blot

On ice, reconstructed samples were fragmented in small pieces, lysed in TRIS-HCl buffer containing 1% SDS, 10% glycerol, 0,5 mM DTT, 2 mM Na₃VO₄, and Complete™ protease inhibitor cocktail (Roche diagnostics, Mannheim, Germany), homogenized using Polytron PT 3100 (Brinkmann, Mississauga, Ontario) (27 000 rpm, 30 sec) and sonicated with Sonifer 250 (Branson, Danbury, Connecticut). The concentration of total proteins in the supernatants was measured using the Micro BCA Protein Assay Reagent kit (Pierce, Rockford, Illinois). Proteins (20 µg in Laemmli buffer) were separated under reducing conditions on a 7,5% polyacrylamide gel and immunoblotting as previously described (Germain *et al.*, 2000). Primary antibodies used were guinea-pig anti-hK6irs1 (American Research Products Inc™, Belmont, Maryland), mouse anti-actin (Cedarlane, Hornby, Ontario). Goat secondary antibodies were anti-guinea pig (Chemicon) and anti-mouse (chemicon) conjugated to peroxydase.

Epidermal thickness measurement and statistical analysis

The thickness of the epidermal portion of reconstructed skin was calculated from histological slide pictures (magnification 20X) using Metaview software version 4.5.R2 (Universal Imaging Corp™, Dawningtown, Pennsylvania). A minimum of 50 measures were taken for each sample. Each reconstructed condition was repeated 5 to 9 times (n=3 for bK/mFS skins cultured 7 days at the air-liquid interface). The data obtained were analyzed statistically using a bilateral student t test. Standard deviation brackets were evaluated on the average thickness of 5-9 (n) reconstructed skins by condition, with the exception of bK/mFS skins cultured 7 days at the air-liquid interface (n=3).

Results

Production of hairy reconstructed skin

In order to evaluate the long-term capability of stem cells to generate pilo-sebaceous units in reconstructed skin, newborn mouse HFBs or isolated keratinocytes (iK), that are able or not able respectively to generate hair follicles when they are grafted directly on the dorsal muscle of athymic mice (Weinberg *et al.*, 1993), were seeded on superimposed sheets obtained after culturing fibroblasts with ascorbic acid. Two kinds of reconstructed dermis were compared: the mFS dermis, reconstructed from fibroblasts of newborn mouse skin and the hFS dermis, reconstructed from fibroblasts of adult human breast skin. After 10 days of immersed culture, reconstructed skins were transplanted onto athymic mice. 1 month after grafting, pigmented hair follicles typical of the C3H/Hen mice fur emerged on the surface of HFB/mFS skins (Fig. 1A, panel b). The hairs were maintained for at least 6 months (data not shown) indicating a functional pool of stem cells. Histological analysis of the transplants 1,5 months after grafting revealed a completely differentiated epidermis as well as hair follicles containing black pigments in their cortex (Fig. 1B, panel c, asterisks) with annexed sebaceous glands (Fig. 1B, panel c, open arrow) containing cytoplasmic lipid droplets stained by oil red O (Fig. 1B, panel e, arrowheads). Furthermore, no tumor formation was detected within these grafts. Macroscopic examination of grafted iK/mFS (Fig. 1A, panel a), iK/hFS (not shown) and HFB/hFS (Fig. 1A, panel c) skins revealed pigmentation of the grafted site, confirming the C3H/Hen origin of epithelial cells, but no hair was visible. At histological level, the epidermis of iK/mFS and HFB/mFS skins was composed of 2-3 cell layers typical of mouse skin (Fig. 1B, panels a and c, respectively) while the epidermis of iK/hFS skins was generally thicker (5-10 cell layers) (Fig. 1B, panel b). In HFB/hFS skins, instead of a structure presenting the typical characteristics of a mature hair follicle, we observed dermal inclusions (cysts) composed of epithelial cells surrounding enucleate material (Fig. 1B, panel d, open asterisks). Sebaceous glands close or annexed to the inclusions were also seen (Fig. 1B, panel d, open arrow). These results indicate that reconstructed skin can sustain the formation and the maintenance of hair follicles after grafting when the appropriate fibroblasts are employed and that stem cells of

the HFBs maintain their potential to differentiate in hair follicles and annexes when they are cultured *in vitro* on mFS for 10 days and thereafter grafted on athymic mice.

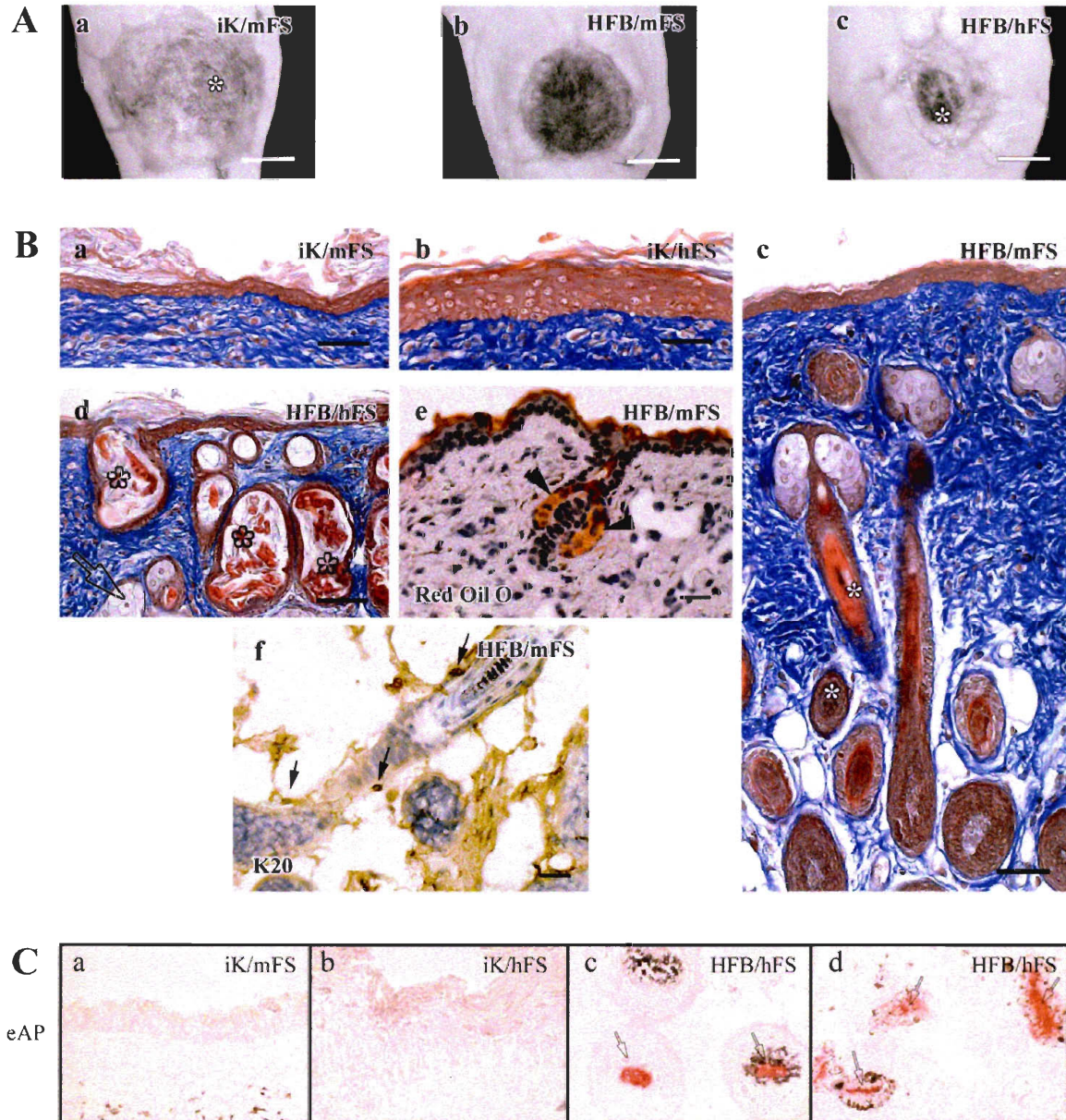


Figure III-1 Macroscopic and microscopic analysis and detection of the endogenous alkaline phosphatase activity of reconstructed skins after grafting on athymic mice A) Macroscopic aspects of reconstructed skins 1 month after grafting on athymic mice. The reconstructed skins were produced with freshly isolated keratinocytes (iK) (a) or HFBs (b, c) from newborn pigmented mice (C3H/Hen), seeded on tissue-engineered reconstructed dermis produced with newborn mouse fibroblasts (a, b) or adult human fibroblasts (c) cultured in presence of ascorbic acid in order to produce mFS or hFS respectively. Note

that hair were formed exclusively when HFBs were associated to mFS (b). Pigmentation of the grafts confirmed their C3H/Hen origin (a, b, c, asterisk). B) Microscopic aspects of grafted (1,5 months) reconstructed skins. Cross-sections of skins reconstructed from freshly isolated keratinocytes (a, b) or HFB (c, d) cultivated on mFS (a, c) or hFS (b, d) stained by Masson's trichrome. Note that a well organized epidermis was observed 1,5 months after grafting in iK/mFS (a), iK/hFS (b), HFB/mFS (c) and HFB/hFS (d) but that the epidermis of iK/mFs (a) was tinner than that from iK/hFS (b). Complete pilo-sebaceous units were formed 1,5 months after grafting in HFB/mFS (c). Their C3H/hen origin was confirmed by the presence of black pigments in some of their cells (c, asterisks). Note that hFS did not sustain the formation of normal hair follicles from HFBs (d). Instead, dermal inclusions or cysts presenting an accumulation of anucleated material in their center were observed (d, open asterisks). Note that structures with the histological aspects of sebaceous glands were observed in HFB/hFS skins (d, open arrow). Red Oil O coloration of cross-sections of HFB/mFS skin revealed lipids within sebaceous glands annexed to hairs (e, arrowheads) and immunolabeling with antibodies directed against the neuroepithelial Merkel cells marker K20 (f, arrows) indicated that hair follicles conserved Merkel cells. C) Detection of the activity of the endogenous phosphatase alkaline in grafted (1,5 months) reconstructed skins. Cross-sections of iK/mFS (a), iK/hFS (b), HFB/mFS (c) and HFB/hFS (d) subjected to the Handjiski's method allowing the detection of the eAP activity. Note that the eAP activity was only detected in reconstructed skins comprising HFBs (c, d), and that this activity was restricted to a subset of dermal cells surrounded by epithelial cells (open arrows).

EAP, endogenous alkaline phosphatase; iK, isolated keratinocytes; HFB, hair follicle bud; hFS, human fibroblast sheets; mFS, mouse fibroblast sheets. Harris's hematoxylin coloration: (B, panels e and f). Hoechst nuclear staining: (B, panels g and h). Scale bars: 1 cm in A; 50 μ m in B, C.

Considering the tactile function of hair follicles, we evaluated the presence of Merkel cells in grafted HFB/mFS using antibodies directed against keratin (K) 20 (Fradette *et al.*, 2003; Moll *et al.*, 1995). K20-expressing cells were found in the basal layer of the hair follicles (Fig. 1B, panel f, arrows). Furthermore, nerves were observed around the hair follicles one month after grafting (François Berthod and Vicky Gagnon, personal communication) suggesting that hair follicles present in the graft were functional for the detection of mechanical stimuli.

The pioneer study of Jahoda and colleagues in 1984 (Jahoda *et al.*, 1984) showed the importance of dermal papilla cells for the orchestration of hair growth. Given that dermal papilla fibroblasts are known to express phosphatase alkaline (Handjiski *et al.*, 1994), we probed the activity of this enzyme in grafted reconstructed skins. Endogenous

phosphatase alkaline activity was not detected in grafted reconstructed skins made from isolated keratinocytes either with mFS (Fig. 1C, panel a) or hFS (Fig. 1C, panel b). In contrast, aggregates of cells similar to dermal papilla presenting a strong alkaline phosphatase activity were detected in HFB/mFS (Fig. 1C, panel c, open arrows) as well as in HFB/hFS (Fig. 1C, panel d, open arrows) skins. These observations suggested that the lack of mature hair follicles in HFB/hFS is not caused by the absence of the dermal papilla cells, which remained associated to epithelial cells in HFBs.

Differentiation of the grafted reconstructed skins

To better understand the influence of the composition of reconstructed dermis on the differentiation of epithelial cells in grafted reconstructed skins, frozen sections of reconstructed skins (1,5 months post-grafting) were stained with antibodies directed against K10 and loricrin, two proteins associated with the epidermal proliferation program (Fuchs, 1995; Hohl *et al.*, 1991). In grafted keratinocytes/mFS, keratinocytes/hFS, HFB/mFS and HFB/hFS skins, K10 was detected in suprabasal layers of the epidermis (Fig. 2a, 2b and 2c, arrows) while loricrin expression was restricted to cells of the granular and cornified layers (Fig. 2d, 2e and 2f, open arrows). In hair follicles of grafted HFB/mFS skins, K10 and loricrin were not detected (Fig. 2b and 2e, respectively). However, loricrin expression was noted in some suprabasal epithelial cells of the HFB-derived cysts within HFB/hFS (Fig. 2c, arrowheads and 2f, open arrowhead) and suggested that instead of being differentiated in hair follicles, cells composing HFBs adopted epidermal characteristics when they are in contact with hFS.

The Wnt signaling operates as a key regulator of hair follicle differentiation (for review see Alonso and Fuchs, 2003). Thus, the expression of β -catenin and Lef1 in reconstructed skins matured 1,5 months onto athymic mice was evaluated by immunofluorescence. As expected, β -catenin was detected at epithelial cell-cell junctions (Fig. 3A, panels e, g, i, k, m and o). However, its nuclear expression was only observed in the matrix cells of the hair follicles of grafted HFB/mFS skins (Fig. 3A, panels i and k, arrows). Furthermore, nuclear β -catenin co-localized with the transcription factor Lef1 (Fig.

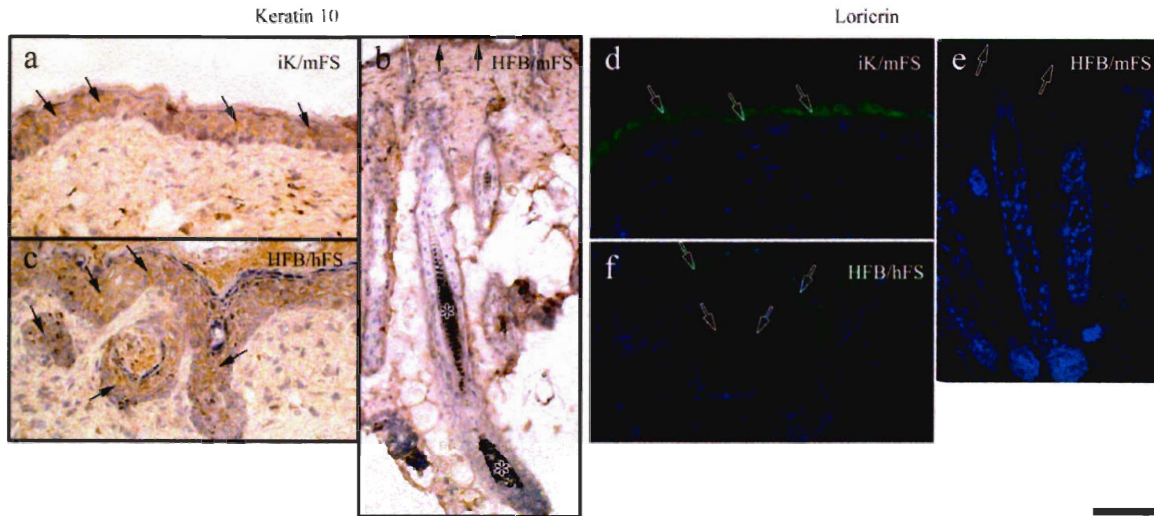


Figure III-2 Keratin 10 and loricrin expression analysis of reconstructed skins 1,5 months after grafting Cross-sections of iK/mFS (a, d), HFB/mFS (b, e) and HFB/hFS (c, f) stained for K10 (a, b, c) loricrin (d, e, f) revealed with peroxydase or fluorescein respectively. Note that K10 expression was found in suprabasal cells of the epidermis in iK/mFS (a, arrows), HFB/mFS (b, arrows) and HFB/hFS (c, arrows) while loricrin was expressed in granulous layer (d, e and f, respectively, open arrows). Note the lack of K10 and loricrin expression in hair follicles of the HFB/mFS (b, e) while epithelial cysts of the HFB/mFS present K10 (c, arrowheads) and loricrin (f, open arrowhead) staining in some of their suprabasal cells suggesting that cells of the HFBS in association with hFS adopted an epidermal differentiation fate.

* , pigment; iK, isolated keratinocytes; HFB, hair follicle bud; hFS, human fibroblast sheets; mFS, mouse fibroblast sheets. Harris's hematoxylin coloration: (a, b, c). Hoechst nuclear staining: (d, e, f). Scale bars: 50 μ m.

3A, panels i, j and k, arrows) as normally observed *in situ* (Fig. 3A, panels a, b, c, arrows). In contrast, β -catenin and Lef1 were absent in the nucleus of cells surrounding dermal papilla in HFBS matured on hFS 1,5 months after grafting (Fig. 3A, panels m-o) suggesting that hair follicle formation defect could be caused by an interruption of the Wnt signaling pathway.

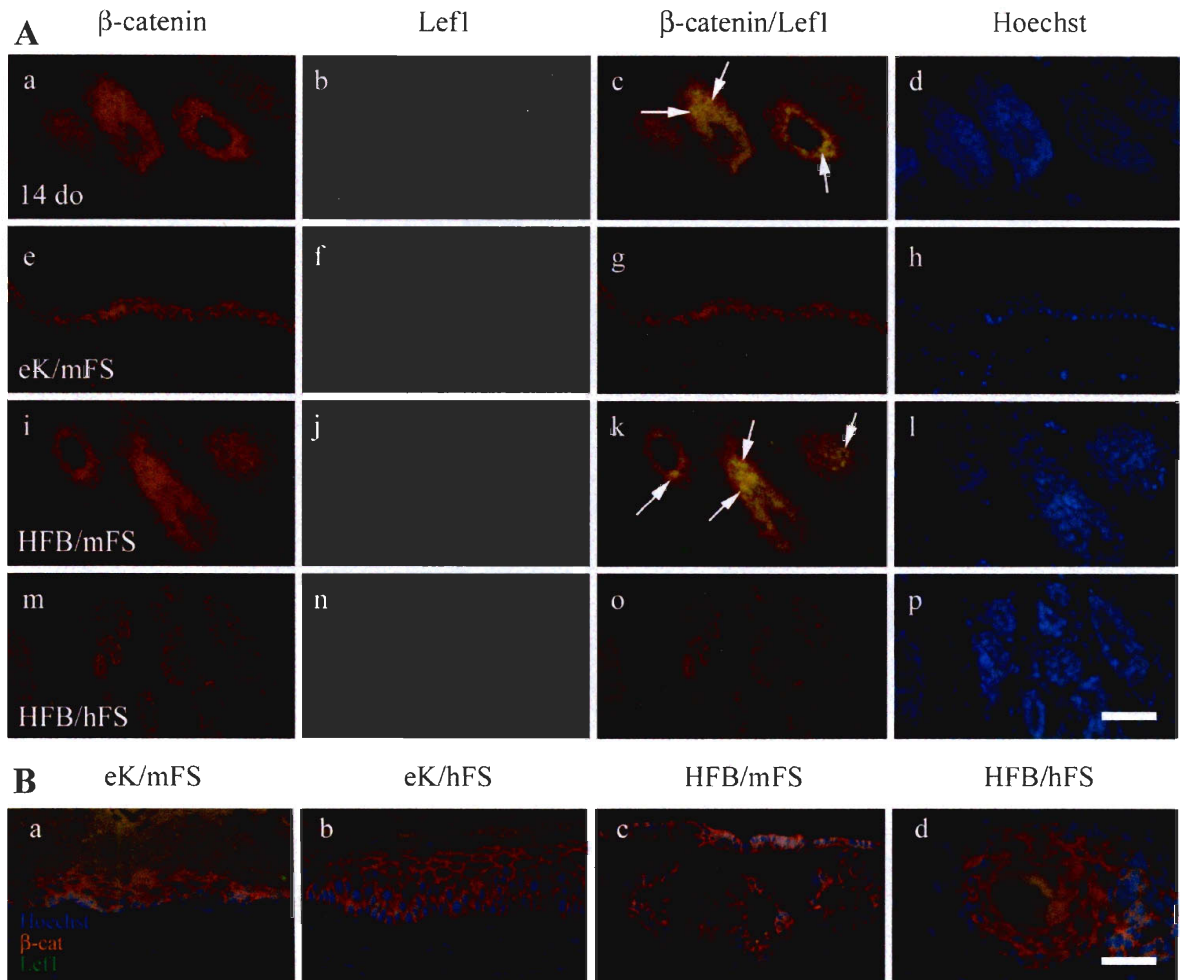


Figure III-3 Lef1 and β -catenin expression within reconstructed skins matured *in vivo* and *in vitro* A) Lef1 and β -catenin expression analysis of reconstructed skins 1,5 months after grafting on athymic mice. Cross-sections of C3H/Hen mouse (14 days old) back skin (a-d), iK/mFS (e-h), HFB/mFS (i-l) and HFB/hFS (m-p) double-labeled for β -catenin with rhodamin (a, e, i and m, red staining) and Lef1 with DTAF (b, f, j, n, green staining). (c, g, k, o) Pictures a, e, i, m overlying b, f, j, n respectively, and corresponding Hoechst nuclear staining (d, h, l, p, respectively). Note that in addition to cell-cell junction (a, c, e, g, i, k, m, o), β -catenin expression was detected with Lef1 in some nuclei of matrix cells which surround dermal papilla in mouse back skin (a, b, c, arrows) as well as HFB/mFS skin (i, j, k, arrows) hair follicles. Alternatively, neither nuclear Lef1 nor β -catenin protein expression were detected in keratinocytes of iK/mFS (e, f, g) and HFB/hFS (m, n, o) grafted skins. B) Lef1 and β -catenin expression analysis of reconstructed skins cultured *in vitro*. Cross-sections of iK/mFS (a), iK/hFS (b), HFB/mFS (c) and HFB/hFS (d) cultured for 7 days at the air-liquid interface, double-labeled for β -catenin with rhodamin (a, e, i, m, red staining) and Lef1 with DTAF (b, f, j, n, green staining). Note that β -catenin protein expression was detected at cell-cell junctions in reconstructed skins (a, b, c, d, red staining), but neither β -catenin nor Lef1 were expressed in the nuclei of keratinocytes (a, b, c, d). iK, isolated keratinocytes; HFB, hair follicle bud; hFS, human fibroblast sheets; mFS, mouse fibroblast sheets. Hoechst nuclear staining: (B, panels a, b, c, d). Scale bars: 50 μ m.

Differentiation of reconstructed skins cultured *in vitro*

To better characterize the influence of the dermal composition on mouse epithelial cells differentiation, the maturation of reconstructed skins was followed *in vitro*. After culturing at the air-liquid interface for 21 days, murine epidermal keratinocytes formed a fully differentiated epidermis when cultivated on mFS or hFS (Fig. 4a and 4b). Furthermore, the expression of a desmosomal epitope was immunodetected at cell-cell junctions (Fig. 4c, and 4d) on biopsies taken after 14 days of air-liquid interface culture. The newly generated epidermis of iK/hFS skins were significantly thicker than those of iK/mFS skins during the first two weeks of culture at the air-liquid interface, but similar after 21 days (Fig. 5A). This discrepancy was more pronounced when keratinocytes from stem cell-rich bulge sections of mouse vibrissae were used to reconstruct the epidermis (Fig. 5A) and suggested that the fibroblasts composing the tissue-engineered dermis influence the proliferation/differentiation balance of the epidermal stem cells within the tissue. Thus, after 14 days of culture at the air-liquid interface, mFS supported the formation of an epidermis morphologically related of mouse epidermis (3-5 cell layers, epidermal thickness: $33,7 \pm 9,1 \mu\text{m}$), while hFS supported the formation of a thicker epidermis (5-10 cell layers, epidermal thickness: $53,1 \pm 4,7 \mu\text{m}$), which more resembles human skin.

Histological analysis of HFB/mFS skins matured *in vitro* revealed the presence of tubular epithelial structures in the dermal portion (Fig. 4e). However, concentric epithelial cell layers typical of a mature hair follicle were not observed. In HFB/hFS, epithelial inclusions (cysts), were seen in the dermis (fig. 4f), but their histological aspect was distinct and revealed a resemblance to the epidermis of iK/mFS and iK/hFS skins such as basal cuboidal cells expressing the cell proliferation-associated nuclear antigen Ki-67 (Gerdes *et al.*, 1983)(Fig. 4j, arrowheads), followed inward by spinosous and granulous layers (Fig. 4f and 4j, open arrowhead). The innermost cell layers were formed by anucleate squames detaching into the center of these HFB-derived cysts (Fig. 4f, asterisk). The size of cysts increased with time, probably as a result of the accumulation of squames in their center. In

contrast, cysts of HFB/mFS skins, which were smaller, conserved relatively the same size after 21 days of culture at the air-liquid interface (Fig. 4e). This feature does not seem associated to a proliferation defect as it was suggested by the detection of Ki-67 in the nucleus of the cyst basal cells of the HFB/mFS skins (Fig. 4 i, arrowheads).

To further characterize the HFBs maturation in cultured reconstructed skins, frozen sections of reconstructed skin cultured for 7 days at the air-liquid interface were stained with antibodies directed against proteins associated with different skin compartments. Laminin-5 and collagen IV, two basement membrane components, were detected at the dermo-epidermal junction in iK/mFS and iK/hFS skins (Fig. 4 k and 4l, open arrows and data not shown) reflecting the cohesion between the epidermis and the dermis. In HFB/mFS and HFB/hFS skins, laminin-5 and collagen IV were also detected around the HFB-derived cysts (Fig. 4m and 4n, open arrows). Keratin 5 expression was found in living basal keratinocytes of reconstructed epidermis (Fig. 4o and 4p) as well as basal cells of the HFB-derived cysts of HFB/mFS and HFB/hFS skins (Fig. 4q and 4r). In the epidermis of iK/mFS and iK/hFS skins, keratin 10 was identified in suprabasal layers (Fig. 4s and 4t, open arrowheads), while loricrin was restricted to the granular and cornified layers (Fig. 4w and 4x). Interestingly, the expression of K10 and loricrin was also found in the epithelial cysts of HFB/hFS skins (Fig. 4v, open arrowheads and 4z, respectively). In contrast, neither K10 (Fig. 4u) nor loricrin (Fig. 4y) expression was detected in cysts of HFB/mFS skins further suggesting that cysts in HFB/mFS resemble hair follicle epithelium, whereas in HFB/hFS they resemble epidermis.

We next evaluated the expression of K19, a marker of skin stem cells (Michel *et al.*, 1996; Stasiak *et al.*, 1989) and K15, strongly expressed in hair follicle stem cells and also found in basal cells of the outer root sheath (ORS) and the interfollicular epidermis (Lyle *et al.*, 1998; Porter *et al.*, 2000; Waseem *et al.*, 1999). In the epidermis of iK/mFS and iK/hFS skins, K19 was identified in some basal keratinocytes even after 21 days of culture at the air-liquid interface (Fig. 4ee and 4ff, arrows) suggesting that stem cells were conserved in reconstructed skins. Interestingly, in cysts of the HFB/mFS skins, K19 was expressed in the majority of cells (Fig. 4gg), in contrast to HFB/hFS skins, where only few

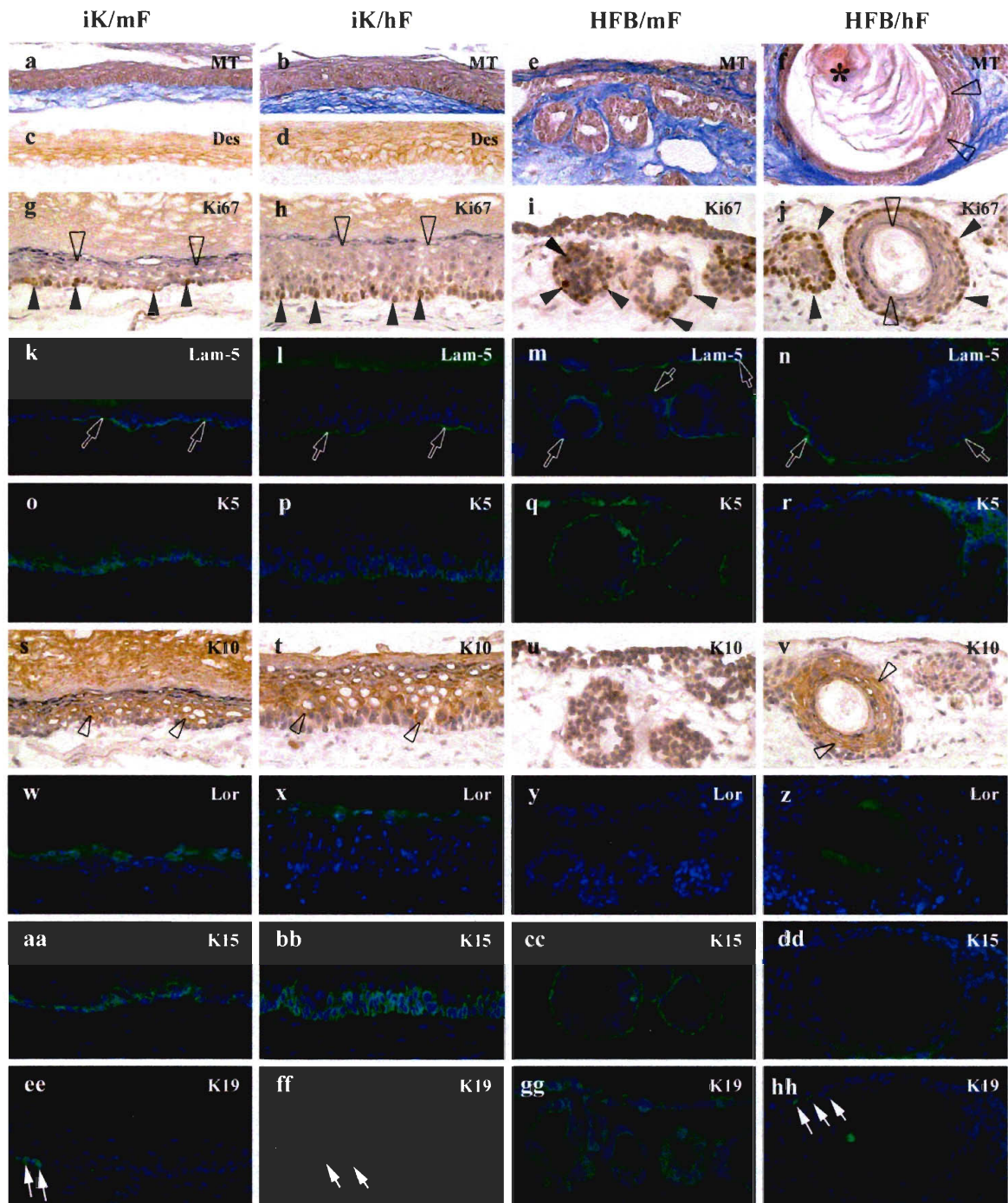


Figure III-4 Characterization of histological and phenotypic properties of reconstructed skins cultured *in vitro* Cross-sections of iK/mF (a, c, g, k, o, s, w, aa, ee), iK/hF (b, d, h, l, p, t, x, bb, ff), HFB/mFS (e, i, m, q, u, y, cc, gg) and HFB/hFS (f, j, n, r, v, z, dd, hh) cultured for 7 (g-hh), 14 (c, d) or 21 days (a, b, e, f) at the air-liquid interface. Paraffin sections stained with Masson's trichrome showing a well-organized epidermis with a stratum corneum in iK/mFS (a) and iK/mFS (b) and dermal inclusions or cysts in the dermis of HFB/mFS (e) and HFB/hFS (f). Note that the epidermis of iK/mFS (a) was

thinner than that of iK/hFS (b). After 21 days of culture at the air-liquid interface, HFB-derived cysts in HFB/mFS were tubular structures composed of cuboidal cells (e), while those associated to HFB/hFS rather presented epidermal features such as spinous, granulous, corneal layers and squame production (f, asterisk). Frozen sections immunolabeled for desmosomal proteins (c, d), Ki-67 (g-j), laminin-5 (k-n), K5 (o-r), K10 (s-v), loricrin (w-z), K15 (aa-dd) and K19 (ee-hh) with peroxydase (c, d, g-j, s-v) or DTAF (k-r, w-hh). Note that Ki-67 was detected in basal cells of the epidermis in iK/mFS (g, arrows) and iK/hFS (h, arrows) skins as well as basal cells of HFB-derived cysts from HFB/mFS (i, arrowheads) and HFB/hFS (j, arrowheads) showing that proliferation occurs in cysts. Laminin-5 was detected at the dermo-epidermal junction in iK/mFS (k, open arrows) and iK/hFS (l, open arrows) skins and surrounding HFB-derived cysts in HFB/mFS (m, open arrows) and HFB/hFS (n, open arrows) suggesting the formation of a basement membrane. In contrast to the strong K10 and loricrin expression in suprabasal cells of reconstructed epidermis and cysts in iK/mFS (s, open arrowheads), iK/hFS (t, open arrowheads), HFB/hFS (v, open arrowheads), these proteins were not detected in cysts associated to HFB/mFS (u). In reconstructed epidermis of iK/mFS and iK/hFS skins, and in cysts associated to HFB/hFS skins, a subset of basal cells expressed K19 (ee, ff, and hh, arrows). However, K19 was expressed in the majority of the cells forming the cysts found in the dermis of HFB/mFS (gg). K5 and K15 were present in basal cells in iK/mFS (aa), iK/hFS (bb), HFB/mFS (cc) and HFB/hFS (dd). iK, keratinocytes; HFB, hair follicle bud; hFS, human fibroblast sheets; mFS, mouse fibroblast sheets. Harris's hematoxylin coloration: (g-j, s-v). Hoechst nuclear staining: (k-r, w-hh). Scale bars: 50 μ m.

K19 expressing cells were observed in the periphery of cysts (Fig. 4hh, arrows). The K15 expression occurs in the majority of cells of the basal layer in iK/mFS and iK/hFS skins cultured for 7 days at the air-liquid interface (Fig. 4aa and 4bb). In HFB/mFS and HFB/hFS, K15 was found in the basal cells of the HFB-derived cysts (Fig. 4cc and 4dd). Collectively, the immunofluorescence results along with the histological data suggested that the dermis composition in reconstructed skins cultured *in vitro* influences the differentiation program of HFB cells. In association with mFS, HFBs formed cysts composed of cells expressing the bulge-associated K19 (Michel *et al.*, 1996), while HFBs of HFB/hFS skins adopted features proper to the epidermis differentiation program such as the expression of K5 in basal cells and K10 (Fuchs, 1995; Moll *et al.*, 1982) and loricrin (Hohl *et al.*, 1991) in suprabasal cell layers and squame production.

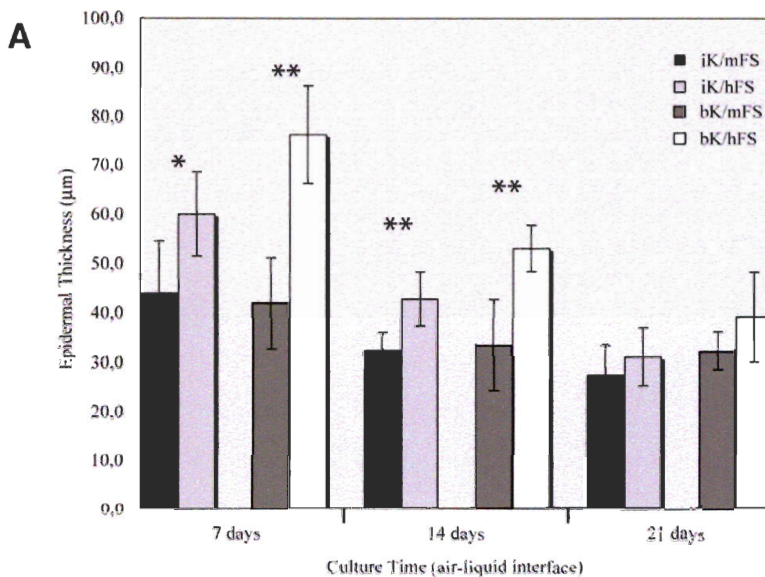
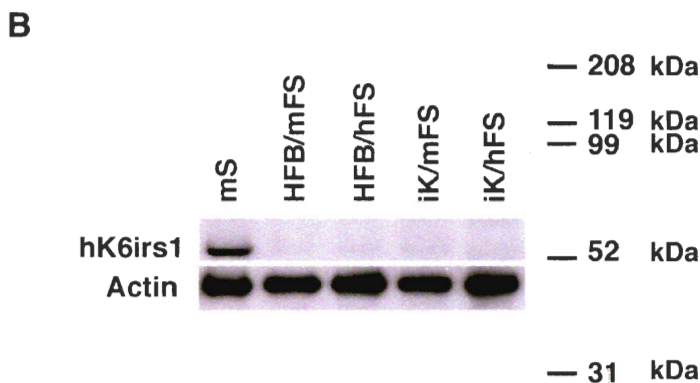


Figure III-5 Influence of the fibroblast composition of the reconstructed dermis on the thickness of the epidermis and western blot analysis of hK6irs1 expression in reconstructed skins cultured *in vitro*

A) Reconstructed epidermis resulting of isolated keratinocytes or bulge keratinocytes cultured on hFS were significantly thicker than those cultured on mFS after 7 and 14 days of culture at the air-liquid interface.

Data were analysed statistically using a bilateral student t test. **: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$. B) After 7 days of culture at the air-liquid interface, proteins from reconstructed skins were extracted in Tris-HCl buffer (see materials and methods), and run on a 7.5% acrylamide SDS gel. After transfer to nitrocellulose membrane, western blot analysis was performed using antibodies



raised against hK6irs1. Detection of actin was performed for loading control. 50 measures were taken for each reconstructed skin. Standard deviation brackets were evaluated on the average thickness of 5-9 reconstructed skins, with the exception of bK/mFS skins cultured 7 days at the air-liquid interface (n=3).

iK, keratinocytes; HFB, hair follicle bud; hFS, human fibroblast sheets; mFS, mouse fibroblast sheets.

In HFB/mFS skins cultured *in vitro*, keratinocytes of the cysts exhibited an ORS-like morphology. However, cysts lacked typical IRS and hair shaft structures. Thus, the IRS-associated K6irs1 (Langbein *et al.*, 2002) expression in reconstructed skins was assessed by western blotting. In contrast to 14 days old mouse skin where the K6irs1 positive signal was identified at the level of 57 kDa, only a weak signal was obtained in samples of reconstructed skins matured 7 days at the air-liquid interface (Fig. 5B),

suggesting that the IRS differentiation was compromised. Given that Wnt signaling triggers features of hair cell fate such as the differentiation of the hair shaft (Kobielak *et al.*, 2003), we evaluated the nuclear co-expression of β -catenin and Lef1 in reconstructed skins matured *in vitro*. Neither the expression of Lef1 nor of nuclear β -catenin was found in cultured reconstructed skins (Fig. 3B, panels a-d) even in those composed of HFB and mFS suggesting that the failure to differentiate in mature hair follicle in culture could be caused in part by the deregulation of the Wnt signaling pathway.

Discussion

Tissue-engineering technology takes advantage of the capacity of cells to self-assemble in a three-dimensional tissue under appropriate conditions, and represents a promising research field to elucidate the interactions between various cellular types and their microenvironment. In this study, reconstructed models were designed by the LOEX self-assembly approach (Auger *et al.*, 2002; L'Heureux *et al.*, 1998) in order to recreate epithelial-mesenchymal interactions that regulate skin stem cell differentiation toward epidermis or hair follicle. Our results show that fibroblasts composing the dermal portion of reconstructed skin have an obvious impact on the differentiation fate of keratinocytes.

In our reconstructed skin models, isolated keratinocytes or HFBs containing stem cells were taken from newborn mouse skin and seeded on dermal substitutes reconstructed from either, adult human fibroblasts or newborn mouse fibroblasts, cultured with ascorbic acid that allows them to secrete and organize a three-dimensional extracellular matrix (L'Heureux *et al.*, 1998; Michel *et al.*, 1999). A complete basement membrane is reconstituted when reconstructed skin produced by the self-assembly approach are matured *in vitro* or *in vivo* (Laplante *et al.*, 2001; Michel *et al.*, 1999). After 10 days of culture, reconstructed skins were grafted on athymic mice to follow their *in vivo* maturation. No graft was rejected or replaced by host skin, and their long-term regeneration indicated that SCs were conserved and functional in our reconstructed skins.

We have achieved the creation of a physiological environment allowing growth, differentiation, and long-term survival of complete pilo-sebaceous units with our reconstructed skin model using newborn mouse fibroblasts. Indeed, 1 month after transplantation, hairs emerged on the surface of HFB/mFS transplanted skins. Furthermore, these grafts did not develop any tumor or abnormal hairs indicating that the differentiation of stem cells in hair or epidermis is accurately regulated. In contrast, dermal substitutes reconstructed from adult human fibroblasts did not sustain the development of mature hair follicles from mouse HFBs. It is possible that messages between two species were too different to correctly orchestrate the differentiation of HFB cells in a complete hair follicle. However, it seems unlikely since Jahoda and colleagues have shown that human hair

follicle dermal papillae induced new fiber-producing follicles when they are implanted in contact with mouse epithelium (Jahoda *et al.*, 2001). Alternatively, histological analysis of grafted HFB/hFS skins showed that the HFB-derived epithelial cysts featured epidermal histological features. The appearance of these cysts was very similar to the structure developed from hair follicles following either β -catenin deletion (Huelsenken *et al.*, 2001) or expression of Lef1 transgene which lacks the β -catenin binding site (Niemann *et al.*, 2002). Absence of the nuclear complex β -catenin/Lef1 expression in the cysts observed in grafted HFB/hFS skin suggested an interruption of the Wnt signaling and could explain why stem cells are unable to adopt the fate of hair keratinocytes. Given that suspensions of newborn dermal mouse fibroblasts mixed with mouse isolated keratinocytes or skin stem cells are able to induce hair follicle formation *in vivo* (Lichti *et al.*, 1993; Weinberg *et al.*, 1993), further experiments are necessary to evaluate if the capacity of mFS to support hair growth in reconstructed skin is lost with age.

Although cell culture and tissue engineering have allowed the creation of various three-dimensional skin culture models, most of them are produced from human cells and mouse keratinocytes are rarely used (Carroll and Moles, 2000; Dunnwald *et al.*, 2001; Rogers *et al.*, 1987; Rouabhia *et al.*, 1992; Yuspa *et al.*, 1993). In our *in vitro* model, keratinocytes harvested from both newborn mouse epidermis or HFBs were able to reform a fully differentiated epidermis when they were seeded on dermal substitutes reconstructed from mouse or human fibroblasts. However, epidermis regenerated on hFS were significantly thicker than those observed on mFS indicating that the fibroblasts used for the reconstruction of living dermal substitutes affect the differentiation/proliferation balance of mouse keratinocytes. Furthermore, fibroblasts composing tissue-engineered dermis induced the formation of an epidermis presenting histological aspect of the respective species. This observation is in accordance with the notion that the dermal component is mainly responsible for determining the nature of the associated epithelia (Ferraris *et al.*, 2000; Olivera-Martinez *et al.*, 2004).

The *in vitro* maturation obtained by culturing reconstructed skins at the air-liquid interface further emphasizes the distinct influence of human fibroblast sheets and mouse

fibroblast sheets on HFB differentiation. Indeed, different types of HFB-derived epithelial cysts were observed within the dermis of HFB/mFS and HFB/hFS skins. Although no mature hair follicle was formed in HFB/mFS skins cultured *in vitro*, mFS seem to favor a follicular differentiation fate. Cysts associated to HFB/mFS skin featured ORS-like characteristics such as 2-3 layers of cells with cuboidal morphology and expressed K19, a keratin found in a subset of cells presenting stem cell characteristics localized in the ORS of the bulge region of the hair follicles *in situ* (Michel *et al.*, 1996). No sign of IRS or hair shaft differentiation was observed in the center of these cysts. Given that both, hair shaft and IRS form through terminal differentiation of matrix cells (Oliver and Jahoda, 1988) and that these events are orchestrated in large part by the Wnt signaling pathway (DasGupta and Fuchs, 1999; Kobiela *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 1995), our observations reporting no Lef1/ β -catenin expression in keratinocyte nuclei of reconstructed skin cultured *in vitro*, suggested an obstruction with the Wnt pathway in our culture conditions. On the other hand, cysts associated to HFB/hFS contained more epithelial layers and their size increased with time and correlated with the accumulation of enucleated cells or squames in their center. Their histological aspect as well as the expression of proteins related to the specialization program of the epidermis such as K10 and loricrin (Fuchs, 1995; Hohl *et al.*, 1991) suggested that stem cells within HFBs rather adopted an epidermal fate.

In conclusion, we produced reconstructed skin models that allowed us to recreate conditions affecting the keratinocyte differentiation program in different ways depending on the types of epithelial and fibroblastic cells chosen. These models could be very useful in understanding factors that regulate epidermis versus hair follicle differentiation and they represent a tool to further analyze genetically modified fibroblasts or keratinocytes from transgenic mice.

Acknowledgments

We are grateful to Israël Martel and Anne-Marie Moisan for their technical support. We also thank Dr. François Berthod for their advice concerning the regeneration of cutaneous nerves. This work was supported by the Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). D.L. is

recipient of scholarships from the IRSC. L.G. is the holder of a Canadian research chair on stem cells and tissue engineering and was the recipient of scholarships from the IRSC and the FRSQ.

References

Alonso, L. and Fuchs, E. (2003). Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev* 17, 1189-200.

Auger, F., Lopez Valle, C., Guignard, R., Tremblay, N., Noël, B., Goulet, F. and Germain, L. (1995). Skin equivalent produced with human collagen. *In vitro Cellular Developmental Biology-Animal* 31, 432-439.

Auger, F. A., Berthod, F., Moulin, V., Pouliot, R. and Germain, L. (2004). Tissue-engineered skin substitutes: from *in vitro* constructs to *in vivo* applications. *Biotechnol Appl Biochem* 39, 263-75.

Auger, F. A., Remy-Zolghadri, M., Grenier, G. and Germain, L. (2002). A truly new approach for tissue engineering: the LOEX self-assembly technique. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 73-88.

Bell, E., Ehrlich, H. P., Buttle, D. J. and Nakatsuji, T. (1981). Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* 211, 1052-4.

Bhatia, N. and Spiegelman, V. S. (2005). Activation of Wnt/beta-catenin/Tcf signaling in mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* 42, 213-21.

Black, A., Berthod, F., L'heureux, N., Germain, L. and Auger, F. (1998). *In vitro* reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB Journal* 12, 1331-1340.

Burke, J. F., Yannas, I. V., Quinby, W. C., Jr., Bondoc, C. C. and Jung, W. K. (1981). Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg* 194, 413-28.

Carroll, J. M. and Moles, J. P. (2000). A three-dimensional skin culture model for mouse keratinocytes: application to transgenic mouse keratinocytes. *Exp Dermatol* 9, 20-4.

Cooper, M. L., Hansbrough, J. F., Spielvogel, R. L., Cohen, R., Bartel, R. L. and Naughton, G. (1991). *In vivo* optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable polyglycolic acid or polyglactin mesh. *Biomaterials* 12, 243-8.

Damour, O., Gueugniaud, P. Y., Berthin-Maghit, M., Rousselle, P., Berthod, F., Sahuc, F. and Collombel, C. (1994). A dermal substrate made of collagen--GAG--chitosan for deep burn coverage: first clinical uses. *Clin Mater* 15, 273-6.

DasGupta, R. and Fuchs, E. (1999). Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development* 126, 4557-4568.

DasGupta, R., Rhee, H. and Fuchs, E. (2002). A developmental conundrum: a stabilized form of beta-catenin lacking the transcriptional activation domain triggers features of hair cell fate in epidermal cells and epidermal cell fate in hair follicle cells. *J Cell Biol* 158, 331-44.

Dunnwald, M., Tomanek-Chalkley, A., Alexandrunas, D., Fishbaugh, J. and Bickenbach, J. R. (2001). Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering. *Exp Dermatol* 10, 45-54.

Ferraris, C., Chevalier, G., Favier, B., Jahoda, C. A. and Dhouailly, D. (2000). Adult corneal epithelium basal cells possess the capacity to activate epidermal, pilosebaceous and sweat gland genetic programs in response to embryonic dermal stimuli. *Development* 127, 5487-95.

Fradette, J., Larouche, D., Fugere, C., Guignard, R., Beauparlant, A., Couture, V., Caouette-Laberge, L., Roy, A. and Germain, L. (2003). Normal human Merkel cells are present in epidermal cell populations isolated and cultured from glabrous and hairy skin sites. *J Invest Dermatol* 120, 313-7.

Fuchs, E. (1995). Keratins and the skin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 11, 123-153.

Gat, U., DasGupta, R., Degenstein, L. and Fuchs, E. (1998). De novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated b-catenin in skin. *Cell* 95, 605-614.

Gaudreault, M., Carrier, P., Larouche, K., Leclerc, S., Giasson, M., Germain, L. and Guerin, S. L. (2003). Influence of sp1/sp3 expression on corneal epithelial cells proliferation and differentiation properties in reconstructed tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 1447-57.

Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H. and Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31, 13-20.

Germain, L., Fradette, J., Robitaille, H., Guignard, R., Grondin, G., Nadeau, A. and Blouin, R. (2000). The mixed lineage kinase leucine-zipper protein kinase exhibits a differentiation-associated localization in normal human skin and induces keratinocyte differentiation upon overexpression. *J Invest Dermatol* 115, 860-7.

Germain, L., Guignard, R., Rouabhia, M. and Auger, F. A. (1995). Early basement membrane formation following the grafting of cultured epidermal sheets detached with thermolysin or Dispase. *Burns* 21, 175-80.

Handjiski, B. K., Eichmuller, S., Hofman, U., Czarnetzki, B. M. and Paus, R. (1994). Alkaline phosphatase activity and localization during the murine hair cycle. *British Journal of Dermatology* 131, 303-310.

Hohl, D., Mehrel, T., Lichti, U., Turner, M. L., Roop, D. R. and Steinert, P. M. (1991). Characterization of human lorincrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. *J Biol Chem* 266, 6626-36.

Huelsken, J., Vogel, R., Erdmann, B., Cotsarelis, G. and Birchmeier, W. (2001). beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* 105, 533-45.

Jahoda, C. A., Oliver, R. F., Reynolds, A. J., Forrester, J. C., Gillespie, J. W., Cserhalmi-Friedman, P. B., Christiano, A. M. and Horne, K. A. (2001). Trans-species hair growth induction by human hair follicle dermal papillae. *Exp Dermatol* 10, 229-37.

Jahoda, C. A. B., Horne, K. A. and Oliver, R. F. (1984). Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. *Nature* 311, 360-362.

Jamora, C., DasGupta, R., Kocieniewski, P. and Fuchs, E. (2003). Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* 422, 317-22.

Kaufman, C. K., Zhou, P., Pasolli, H. A., Rendl, M., Bolotin, D., Lim, K. C., Dai, X., Alegre, M. L. and Fuchs, E. (2003). GATA-3: an unexpected regulator of cell lineage determination in skin. *Genes Dev* 17, 2108-22.

Kobielak, K., Pasolli, H. A., Alonso, L., Polak, L. and Fuchs, E. (2003). Defining BMP functions in the hair follicle by conditional ablation of BMP receptor IA. *J Cell Biol* 163, 609-23.

L'Heureux, N., Paquet, S., Labbe, R., Germain, L. and Auger, F. A. (1998). A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *Faseb J* 12, 47-56.

Laflamme, K., Roberge, C. J., Labonte, J., Pouliot, S., D'Orleans-Juste, P., Auger, F. A. and Germain, L. (2005). Tissue-engineered human vascular media with a functional endothelin system. *Circulation* 111, 459-64.

Langbein, L., Rogers, M. A., Praetzel, S., Aoki, N., Winter, H. and Schweizer, J. (2002). A novel epithelial keratin, hK6irs1, is expressed differentially in all layers of the inner root sheath, including specialized huxley cells (Flugelzellen) of the human hair follicle. *J Invest Dermatol* 118, 789-99.

Laplanche, A. F., Germain, L., Auger, F. A. and Moulin, V. (2001). Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *Faseb J* 15, 2377-89.

Lichti, U., Weinberg, W. C., Goodman, L., Ledbetter, S., Dooley, T., Morgan, D. and Yuspa, S. H. (1993). *In vivo* Regulation of Murine Hair Growth: Insights from grafting Defined Cell Populations onto Nude Mice. *Journal of Investigative Dermatology* 101, 124s-129s.

Lo Celso, C., Prowse, D. M. and Watt, F. M. (2004). Transient activation of beta-catenin signalling in adult mouse epidermis is sufficient to induce new hair follicles but continuous activation is required to maintain hair follicle tumours. *Development* 131, 1787-99.

Lyle, S., Christofidou-Solomidou, M., Liu, Y., Elder, D. E., Albelda, S. and Cotsarelis, G. (1998). The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. *Journal of Cell Science* 111, 3179-2188.

Mansbridge, J., Liu, K., Patch, R., Symons, K. and Pinney, E. (1998). Three-dimensional fibroblast culture implant for the treatment of diabetic foot ulcers: metabolic activity and therapeutic range. *Tissue Eng* 4, 403-14.

Merrill, B. J., Gat, U., DasGupta, R. and Fuchs, E. (2001). Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev* 15, 1688-705.

Michel, M., L'Heureux, N., Pouliot, R., Xu, W., Auger, F. A. and Germain, L. (1999). Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In vitro Cellular Developmental Biology-Animal* 35, 318-326.

Michel, M., Torok, N., Godbout, M. J., Lussier, M., Gaudreau, P., Royal, A. and Germain, L. (1996). Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells *in vivo* and *in vitro*: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci* 109 (Pt 5), 1017-28.

Moll, I., Kuhn, C. and Moll, R. (1995). Cytokeratin 20 is a general marker of cutaneous Merkel cells while certain neuronal proteins are absent. *J Invest Dermatol* 104, 910-5.

Moll, R., Franke, W. and Schiller, D. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 81, 11-24.

Niemann, C., Owens, D. M., Hulsken, J., Birchmeier, W. and Watt, F. M. (2002). Expression of *DeltaN*Lef1 in mouse epidermis results in differentiation of hair follicles into squamous epidermal cysts and formation of skin tumours. *Development* 129, 95-109.

Olivera-Martinez, I., Thelu, J. and Dhouailly, D. (2004). Molecular mechanisms controlling dorsal dermis generation from the somitic dermomyotome. *Int J Dev Biol* 48, 93-101.

Oliver, R. F. and Jahoda, C. A. (1988). Dermal-epidermal interactions. *Clin Dermatol* 6, 74-82.

Porter, R. M., Lunny, D. P., Ogden, P. H., Morley, S. M., McLean, W. H., Evans, A., Harrison, D. L., Rugg, E. L. and Lane, E. B. (2000). K15 expression implies lateral differentiation within stratified epithelial basal cells. *Lab Invest* 80, 1701-10.

Pouliot, R., Larouche, D., Auger, F. A., Juhasz, J., Xu, W., Li, H. and Germain, L. (2002). Reconstructed human skin produced *in vitro* and grafted on athymic mice. *Transplantation* 73, 1751-7.

Rogers, G., Martinet, N., Steinert, P., Wynn, P., Roop, D., Kilkenny, A., Morgan, D. and Yuspa, S. H. (1987). Cultivation of murine hair follicles as organoids in a collagen matrix. *J Invest Dermatol* 89, 369-79.

Rouabhia, M., Germain, L., Belanger, F., Guignard, R. and Auger, F. A. (1992). Optimization of murine keratinocyte culture for the production of graftable epidermal sheets. *J Dermatol* 19, 325-34.

Stasiak, P., Purkis, P., Leigh, I. and Lane, B. (1989). Keratin 19: predicted amino acid sequence and broad tissue distribution suggest it evolved from keratinocyte keratins. *Journal of Investigative Dermatology* 92, 707-716.

Van Genderen, C., Okamura, R. M., Farinas, I., Quo, R. G., Parslow, T. G., Bruhn, L. and Grosschedl, R. (1994). Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev* 8, 2691-703.

Waseem, A., Dogan, B., Tidman, N., Alam, Y., Purkis, P., Jackson, S., Lalli, A., Machesney, M. and Leight, I. M. (1999). keratin 15 expression in stratified epithelia: Downregulation in activated keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 112, 362-369.

Weinberg, W. C., Goodman, L. V., George, C., Morgan, D. L., Ledbetter, S., Yuspa, S. H. and Lichti, U. (1993). Reconstitution of Hair Follicle Development *In vivo*: Determination of Follicle Formation, Hair Growth, and Hair Quality by Dermal Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 100, 229-236.

Yuspa, S. H. and Harris, C. C. (1974). Altered differentiation of mouse epidermal cells treated with retinyl acetate *in vitro*. *Exp Cell Res* 86, 95-105.

Yuspa, S. H., Wang, Q., Weinberg, W. C., Goodman, L., Ledbetter, S., dooley, T. and Lichti, U. (1993). Regulation of hair follicle development: An *in vitro* model for hair follicle invasion of dermis and associated connective tissue remodeling. *Journal of Investigative Dermatology* 101, 27s-32s.

Zhou, P., Byrne, C., Jacobs, J. and Fuchs, E. (1995). Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate. *Genes Dev* 9, 700-13.

Chapitre IV Deux populations de cellules souches épithéliales se distinguant par l'expression et l'organisation des kératines sont présentes dans la vibrisse

Avant-propos

Ce chapitre fait l'objet d'un article intitulé *Keratin profiling defines distinct populations of presumptive epithelial stem cells in the vibrissae hair bulge* qui a été soumis pour publication dans la revue *Development*, en septembre 2005.

J'ai participé à la conception et réalisé la majorité des expériences, excepté la génération des souris transgéniques et la réalisation de la technique d'hybridisation *in situ*, qui ont été effectuées par Xuemei Tong au laboratoire du Dr Pierre Coulombe. J'ai effectué la rédaction du manuscrit en étroite collaboration et sous la supervision des Drs Pierre Coulombe et Lucie Germain. Julie Fradette a participé à la pré-lecture et à la correction du manuscrit.

IV.1 Résumé

Les cellules souches adultes sont essentielles à l'homéostasie des tissus en régénération. Définir leurs propriétés intrinsèques est donc d'un grand intérêt. Les cellules souches de la peau se situent dans une région spécialisée du follicule pileux appelée renflement. Dans ces travaux, nous avons caractérisé les propriétés des cellules souches de la vibrisse. Nous avons observé que les cellules souches, identifiées sur la base de leur propriété à se diviser lentement et, par conséquent, de conserver à long terme le BrdU (*LRC* pour *label-retaining cell*), forment deux populations distinctes dans la région du renflement. La première population est en contact avec la membrane basilaire entourant la gaine folliculaire externe (*ORS*, pour *outer root sheath*). Nous avons dénommé ces cellules *Bb* pour *bulge basal*. Les cellules *Bb* expriment les kératines (K) de type I K19, K15 et K17 avec la kératine de type II K5, mais n'expriment pas la K14. Cependant, des études *in vitro*, consistant à cultiver des portions de renflement de vibrisse sur des dermes reconstruits par génie tissulaire, ont révélé que la K14 était réexprimée quand les cellules *Bb* entament un cycle cellulaire. La seconde population de kératinocytes *LRC* n'est pas en contact avec la membrane basilaire. Nous avons appelé ces cellules *Bs1* pour *bulge suprabasal 1*. De façon surprenante, seule la paire de kératines K5/K17 a été identifiée dans les cellules *Bs1*. L'analyse ultrastructurale des kératinocytes de la vibrisse a révélé que les cellules *Bb* présentaient un réseau de filaments intermédiaires lâche tandis que les cellules *Bs1* avaient un réseau de filaments intermédiaires très compact. L'étude des souris déficientes en K17 (*K17^{-/-}*) a permis de confirmer le rôle crucial de la K17 dans les cellules *Bs1*. En effet, la portion externe des vibrisses est complètement absente chez ces souris et la structure du follicule interne est altérée. Notamment, le réseau de kératine des cellules *Bs1*, très compact chez la souris de type sauvage, est très peu développé dans les vibrisses *K17^{-/-}*. En résumé, ces observations ont permis d'identifier deux populations distinctes de cellules *LRC* dans la vibrisse de la souris, les cellules *Bb* et les cellules *Bs1*, et de révéler que la paire de kératines K5/K17 était essentielle à la formation de la vibrisse ainsi qu'à l'intégrité structurale des cellules *Bs1*.

IV.2 Keratin profiling defines distinct populations of presumptive epithelial stem cells in the vibrissae hair bulge

Danielle Larouche[#], Xuemei Tong[¶], Julie Fradette[#],

Pierre A. Coulombe[¶] and Lucie Germain[#]

[#]Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale / LOEX Hôpital du Saint-Sacrement du CHA, Québec, Québec, G1S 4L8 and Department of Surgery, Laval University, Sainte-Foy, Québec, Canada

[¶]Departments of Biological Chemistry and Dermatology, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland 21205

Short title: Keratin organization in mouse vibrissae follicle

Abbreviations:

BM: Basement membrane

Bb: Bulge basal

Bs1: Bulge suprabasal 1

Bs2: Bulge suprabasal 2

BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine

cl: Companion layer

DME: Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium

DTAF: Fluorescein dichlorotriazine

EGF: Epidermal growth factor

FITC : Fluorescein isothiocyanate

IF: Intermediate filament

IRS: Inner root sheath

K: Keratin

LRC: Label-retaining cells

ORS: Outer root sheath

PBS: Phosphate buffer saline

SC: Stem cell

Key words: Keratin, Stem Cell, Intermediate Filament, Vibrissae, Bulge, Reconstructed Skin, Transmission Electron Microscopy, Rodent

Abstract

Defining the intrinsic features of post-natal stem cells (SC) is of great interest given their relevance for tissue homeostasis and therapeutic applications. The bulge, a specialized region of the outer root sheath (ORS) in hair follicles, houses a large fraction of stem cells in hair-covered skin. We exploited the prominent bulge area in rodent vibrissae follicles to typify, using light and electron microscopy along with keratin expression profiling, presumptive epithelial stem cells exhibiting slow-cycling properties. Two types of slow-cycling cells occur in the vibrissae bulge. Bb cells occur in the outermost basal layer of the bulge and feature a loosely organized keratin network, correlating with expression of K5, K15, K17 and K19. Bs1 cells, on the other hand, localize to the suprabasal layers proximal to Bb cells and show a network of densely bundled keratin filaments, correlating with K5/K17 expression. These prominent filament bundles are entirely missing in the absence of K17, giving rise to cell fragility that likely accounts for the absence of vibrissa in K17 null mice. Bulge epithelial cells located in the innermost suprabasal layers, Bs2 cells, are contiguous with and similar to ORS from the lower portion of the follicle. Bs2 cells are not slow-cycling and contain K5, K6, K14, K15, and K17, which presumably yields a keratin filament network of intermediate density. These findings extend recent studies pointing to heterogeneity within the hair follicle stem cell niche, identify specific keratins as effectors of this heterogeneity, and point to a special role for K5/K17 filaments in a newly defined subset of presumptive stem cells.

Introduction

The hair follicle is a topologically complex epithelial appendage consisting of a central hair fiber surrounded by three concentric epithelial structures: the inner root sheath (IRS), the companion layer (cl) and the outer root sheath (ORS). Vibrissae are specialized hair follicles with a crucial role in the transmission of mechanical vibrations to the nervous system. Vibrissae follicles are surrounded by a capsule conferring the rigidity and other properties necessary for mechanical signal transduction. Hair vibrations are transmitted to the follicle, which features a large number of Merkel cells in the bulge area, and then to the numerous mechanoreceptors located near the sinus complex (Ebara *et al.*, 2002). All hair follicle types undergo repeated cycles of growth (anagen), involution (catagen), and quiescence (telogen). A permanent pool of epithelial stem cells (SC) ensures the production of cells to regenerate new hair at the beginning of each cycle (Cotsarelis *et al.*, 1990; Oshima *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2000; Tumber *et al.*, 2004). The ability to retain nucleotide analogues over long time periods, a signature feature of slow-cycling SCs, provided the initial evidence that the bulge area houses epithelial SCs (Bickenbach *et al.*, 1986; Cotsarelis *et al.*, 1990; Michel *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2000; Tumber *et al.*, 2004). Accordingly, these cells are also called label-retaining cells (LRC). Bulge SC have the capacity to self-renew, and give rise to transit-amplifying cells that actively proliferate and differentiate into cell lineages that constitute hair follicle, epidermis and sebaceous glands (Blanpain *et al.*, 2004; Ghazizadeh and Taichman, 2001; Morris *et al.*, 2004; Oshima *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2000; Tumber *et al.*, 2004).

What constitutes intrinsic "stemness features"? This issue is under intense investigation. Recent findings emphasized the importance of the specialized microenvironment of the niche for the establishment of a transcriptional program unique to hair follicle SC (Blanpain *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2004; Tumber *et al.*, 2004). At another level, the identification of two distinct populations of SCs, one basal in which cells are in direct contact with the basement membrane and another located suprabasally (Blanpain *et al.*, 2004), raises questions about their similarity and differences. Type I and type II keratins represent the most abundant proteins in epithelial cells, in which they heteropolymerize to form cytoplasmic intermediate filaments (IFs). They are encoded by a

large family of conserved genes, with a total of ~50 functional loci known so far in mammalian genomes (Coulombe *et al.*, 2001; Hesse *et al.*, 2001). Of interest here, the pairwise and differentiation-related regulation of type I (K9-K23; Ha1-Ha8; irs1-4) and II (K1-K8; Hb1-Hb6; K6irs1-4) keratin genes provides a unique handle to track lineage specification and differentiation within epithelia (Fuchs, 1995). Moreover, differential distribution of keratin proteins is often associated with defining characteristics in the keratin filament networks they form. Protein replacement studies (Hutton *et al.*, 1998; Paladini and Coulombe, 1999) as well as ectopic keratin expression (Albers *et al.*, 1995; Blessing *et al.*, 1993; Paladini and Coulombe, 1998; Santos *et al.*, 2002) in transgenic mice have hinted at the importance of proper keratin regulation for normal epithelial cytoarchitecture and function. This said, it has proven difficult to pinpoint the significance associated with differential keratin gene regulation (e.g., Coulombe *et al.* (2004)).

To learn more about the properties of epithelial SCs located in hair follicles, we analyzed bulge epithelial cells of mouse vibrissae follicles with respect to their proliferative status, histology, keratin expression, and keratin filament organization. These criteria helped define three distinct subpopulations of epithelial cells within vibrissae bulge. Two of these subpopulations consisted of LRCs as follows: Basal keratinocytes (designated Bb for "bulge basal") expressing K5, K15, K17, K19, and featuring a loosely arranged keratin IF network; and suprabasal keratinocytes (designated Bs1 for "bulge suprabasal 1"), comprised of cells strongly expressing the keratin pair K5/K17 and which exhibit a high density of IFs and high affinity for eosin. Remarkably, K14 mRNA and protein could not be detected in either Bb or Bs1 cells, but occurred in the third compartment, designated Bs2 (for "bulge suprabasal 2"). In mice lacking K17 (McGowan *et al.*, 2002), vibrissa were absent or rudimentary, correlating with a profound disruption of the histological and ultrastructural features of Bs1 cells, thereby confirming the significance of K17 expression in this compartment. Altogether, the findings reported provide additional evidence in support of cellular heterogeneity within the pool of epithelial SCs in the hair follicle bulge, and differentiate them with regards to keratin expression, filament organization, and function.

Materials and Methods

In situ labeling with 5-bromo-2'-deoxyuridine

Slow cycling cells (label-retaining cells, LRC) were localized according to Bickenbach and colleagues (Bickenbach and Chism, 1998; Bickenbach *et al.*, 1986) with some modifications. Briefly, newborn (1 day old (P1)) and adult (3 months old) FVB/N mice were injected with 50 mg/kg bodyweight of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (Sigma, Oakville, Ontario) every 12 hours for five consecutive days. Mice were sacrificed 1 or 7 months later and whisker pads were embedded in Tissue-Tek® OCT Compound (OCT) (Miles Inc, Elkhart, Indiana). Actively proliferating cells were localized by injecting 1 month old FVB/N, C57Bl/6 and C57Bl/6K17^{-/-} mice with 50 mg/kg bodyweight of BrdU at 0h and 12h and processed for analysis as described above at 24 h.

Immunolabeling for light microscopy

Indirect immunofluorescence was performed on 5 µm-thick, acetone-fixed (10 min at -20°C) frozen sections prepared from adult (3 months old) FVB/N, C3H/Hen, C57Bl/6 (Charles River, Saint-Constant, Quebec) mice, adult C57Bl/6 K17^{-/-} mice (McGowan *et al.*, 2002), Fisher rats (Charles River), and cultured skin tissue, as described (Michel *et al.*, 1996). According to Ibrahim and Wright's classification of vibrissa in whisker pads (Ibrahim and Wright, 1975), only E, G, G, H, Ia-Va and Ib-Vb vibrissae follicles were included in this study. The rabbit polyclonal antisera used were directed against K14 (Royal *et al.*, 1995) (gift from N Marceau, Centre de Recherche Hôtel-Dieu-de-Québec, Quebec), C-terminal peptide of K14 (Stoler *et al.*, 1988) (gift from E Fuchs, Rockefeller University, New-York), K6 and K17 (McGowan and Coulombe, 1998b), mouse K16 (Bernot *et al.*, 2002), mouse K5 (AF138; BabCO, Richmond, California), human Collagen IV (Chemicon, Temecula, California) and mouse loricrin AF 62 (Covance, Princeton, New Jersey). Other primary antibodies included guinea-pig polyclonals raised against mouse K19 (Michel *et al.*, 1996), K8/18 (ARP, Belmont, Massachusetts) and human K15 (Progen Biotechnik, Heidelberg), mouse monoclonal raised against K14 (Sigma) and a rat monoclonal raised against laminin (Chemicon). Secondary antibodies used were goat anti-

rabbit conjugated with DTAF (fluorescein dichlorotriazine) or rhodamin (Chemicon), goat anti-guinea pig conjugated with FITC (fluorescein isothiocyanate) (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania), and goat anti-rat conjugated with DTAF (Chemicon). In some instances, Hoechst stain was applied to visualize nuclei. Following observation, sections were counterstained with hematoxylin-eosin. For immunoperoxidase stainings, slides were sequentially incubated with formol (1%, 10 minutes), methanol (100%, 10 minutes), NaOH (0,07N, 15 seconds) and the Vector® M.O.M Basic Kit to reduce non-specific binding with endogenous immunoglobins. These sections were labeled with mouse monoclonal antibodies raised against BrdU, cytokeratin 8.60 (Sigma) and human K20 (IT-Ks 20.10, ARP) and revealed using the Ultra HRP peroxidase detection system (ID Labs Inc, London, Ontario) and 3-3'-diaminobenzidine (Sigma). The Harris's hematoxylin staining procedure was used to stain nuclei. Slides were examined under a Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon, Mississauga, Ontario) equipped with a SenSys® digital camera (Photometrics®, Tucson, Arizona) for immunofluorescence pictures and a Coolsnap™ digital camera (Photometrics®) for color pictures. Image reconstitution of consecutive fields, multi-colored pictures and adjustments of brightness and contrast (applied to the whole image to generate micrographs corresponding to observations) were made using Adobe® Photoshop 7.0 software (San Jose, California).

Immunolabeling for transmission electron microscopy

Frozen sections (8 µm-thick) of vibrissae follicles from adult (2-3 months) FVB/N mice, and from adult C57Bl/6 K17^{-/-} and wildtype C57Bl/6 mice were incubated for 5 minutes in 10 mM Tris-HCl (pH 7.2) buffer containing 1% Triton, 1.5 M KCl and 10 mM EDTA. After phosphate buffer saline (PBS) washing, the sections were fixed with acetone for 10 minutes at -20°C. For double-labeling, sections were sequentially incubated for 1 hour with rabbit anti-K14 (Royal *et al.*, 1995), goat anti-rabbit coupled to 10 nm colloidal gold particles (British Biocell International, Cedarlane, Hornby), guinea-pig anti-K19 and goat anti-guinea pig coupled to 5 nm colloidal gold particles (British Biocell International). All steps were separated by PBS-bovin serum albumin (BSA) rinses. After labeling, the sections were fixed with 2.5% glutaraldehyde for 15 minutes, washed with cacodylate 0.2

M buffer, post fixed with 2% OsO₄ for 30 minutes and embedded in LRWhite. Thin sections stained with lead citrate were observed with a JEOL 1200 EX transmission electron microscope.

***In situ* hybridization and terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL)**

In situ hybridization was performed on frozen sections prepared from paraformaldehyde-fixed, OCT-embedded whisker pad samples from 1 month old C57Bl/6 mice. Digoxigenin-labeled sense (control) and antisense probes corresponding to 3' end of exon 8 in either *mK17* (284 bp), *mK16* (208 bp) or *mK14* (206 bp) were made according to the MAXIscript™ protocol (Ambion Inc, Austin, Texas) and hybridized to sections. After washes, bound probe was revealed by alkaline phosphatase activity (Bio-Rad Labs, Richmond, California). The templates selected for probe synthesis correspond to a portion of the C-terminal tail domain and most of the 3' noncoding region in each of *mK17*, *mK16*, and *mK14* (Bernot *et al.*, 2002; Tong and Coulombe, 2004). TUNEL staining was performed as described (McGowan *et al.*, 2002) using 4% paraformaldehyde-fixed paraffin-embedded skin samples according to the manufacturer's instructions (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

Analysis of cell proliferation and skin reconstruction

Under a Nikon Smz-2T binocular microscope, vibrissae follicles from FVB/N mice (12 days old) were dissected and fragmented according to Kobayashi and colleagues (Kobayashi *et al.*, 1993). Ten individual fragments of bulge- and bulb-containing segments, and the intermediate region in-between (Fig. 1A, panel a) were explanted onto a tissue-engineered dermal surface of 5 cm², prepared using the self-assembly approach (Michel *et al.*, 1999; Pouliot *et al.*, 2002), and cultured in complete keratinocyte medium as follows: Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium (DME) combined with Ham's F12 in a 3:1 proportion (Gibco BRL, Burlington, Ontario), and supplemented with 24.3 µg/ml adenine (Sigma), 5 µg/ml insulin (Sigma), 2X10⁻⁹ M 3, 3', 5' triiodo-L-thyronine (Sigma), 5 µg/ml human transferrin (Boehringer Mannheim, Laval, Québec), 0.4 µg/ml hydrocortisone

(Calbiochem, La Jolla, California), 10^{-10} M cholera toxin (ICN Biochemical, Montréal, Québec), 10 % Fetal Clone II serum (Hyclone, PDI Bioscience, Aurora, Ontario), 10 ng/ml murine epidermal growth factor (EGF) (Sigma), 100 UI/ml penicillin G (Sigma) and 25 µg/ml gentamicin sulfate (Schering Inc, Pointe-Claire, Québec). Growth of the migrating epithelial sheet emanating from hair tissue explants was monitored between days 5 and 10 after seeding using a Nikon Diaphot phase contrast microscope equipped with a Nikon Coolpix 995 digital camera. The Metaview software version 4.5.R2 (Universal Imaging Corp.™ Dawningtown, Pennsylvania) was used to quantify the area covered by the epithelial outgrowth. The rate of epithelial migration was estimated by dividing the difference in surface area at two sequential time intervals by their perimeter average. In order to visualize cycling cells in bulge explants, 10 µM BrdU was added to the culture medium one day prior to harvest. To foster a full epidermal reconstruction, hair explants were placed in submerged cultures for 14 days, at which time the samples were raised at the air-liquid interface for 7 days in EGF-free keratinocyte medium. Biopsies were then embedded in OCT. For histological analysis, reconstructed skin tissues were fixed with Histochoice™MB® fixative (Amresco, Solon, Ohio) and embedded in paraffin. Six-µm thick sections were processed for standard Masson's trichrome staining.

Results

Basal and suprabasal LRCs with distinct histological features within the vibrissae bulge

The bulge area of hair follicles contains pluripotent epithelial SCs (Blanpain *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2004; Oshima *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2000; Tumber *et al.*, 2004). In vibrissae follicles, the bulge forms a distinct protuberance in the upper third of the hair follicle ORS and comprises multiple cell layers (Fig. 1A, panel a,d), making it a convenient setting in which to characterize its cellular constituents. Hematoxylin-eosin staining of vibrissae frozen sections reveals morphological heterogeneity within this region. The histological features of basal (designated Bb for bulge basal cells) and the internal-most suprabasal cells (designated Bs2 for bulge suprabasal 2) are very similar to those of cells making up the ORS in the intermediate portion of the vibrissae follicle (Fig. 1A, panels a,d). In contrast, the cells located in between these two compartments are markedly more eosinophilic (Fig. 1A, panels a,d) and present a denser cytoplasm when viewed by phase contrast microscopy. These cells, designated Bs1 cells for bulge suprabasal 1, are confined to the bulge area.

To define the proliferation status of Bb, Bs1, and Bs2 cells, we injected newborn (P1) mice with the nucleotide analogue BrdU using an established protocol allowing the labeling and subsequent localization of LRCs (Bickenbach and Chism, 1998; Larouche *et al.*, 2004). After a chase period of 1 or 7 months, labeled cells were seen to occur in the basal layer of the bulge (Fig. 1A, panels b,f,g, arrows), as expected (Cotsarelis *et al.*, 1990; Michel *et al.*, 1996; Morris and Potten, 1999). Moreover, BrdU-labeled cells also consistently occurred in the Bs1 compartment (Fig. 1A, panels b,f,g, arrowheads). Bb or Bs1 cells are not actively proliferating since they exhibit no labeling at 24h following a single BrdU injection (Fig. 1A, panel c). Yet, unlike fibroblasts (Fig. 1A, panel b, asterisks), these cells have not stopped proliferating altogether, since labeled cells can easily be detected in both the Bb and Bs1 compartments one month after repeated BrdU injections to adult mice (Fig. 1A, panel h). These findings establish that *bona fide* LRCs exhibiting slow-cycling properties occur in the basal as well as suprabasal compartments

within the vibrissae bulge, and that Bs1 suprabasal cells are distinct by virtue of their optically dense and eosinophilic cytoplasm.

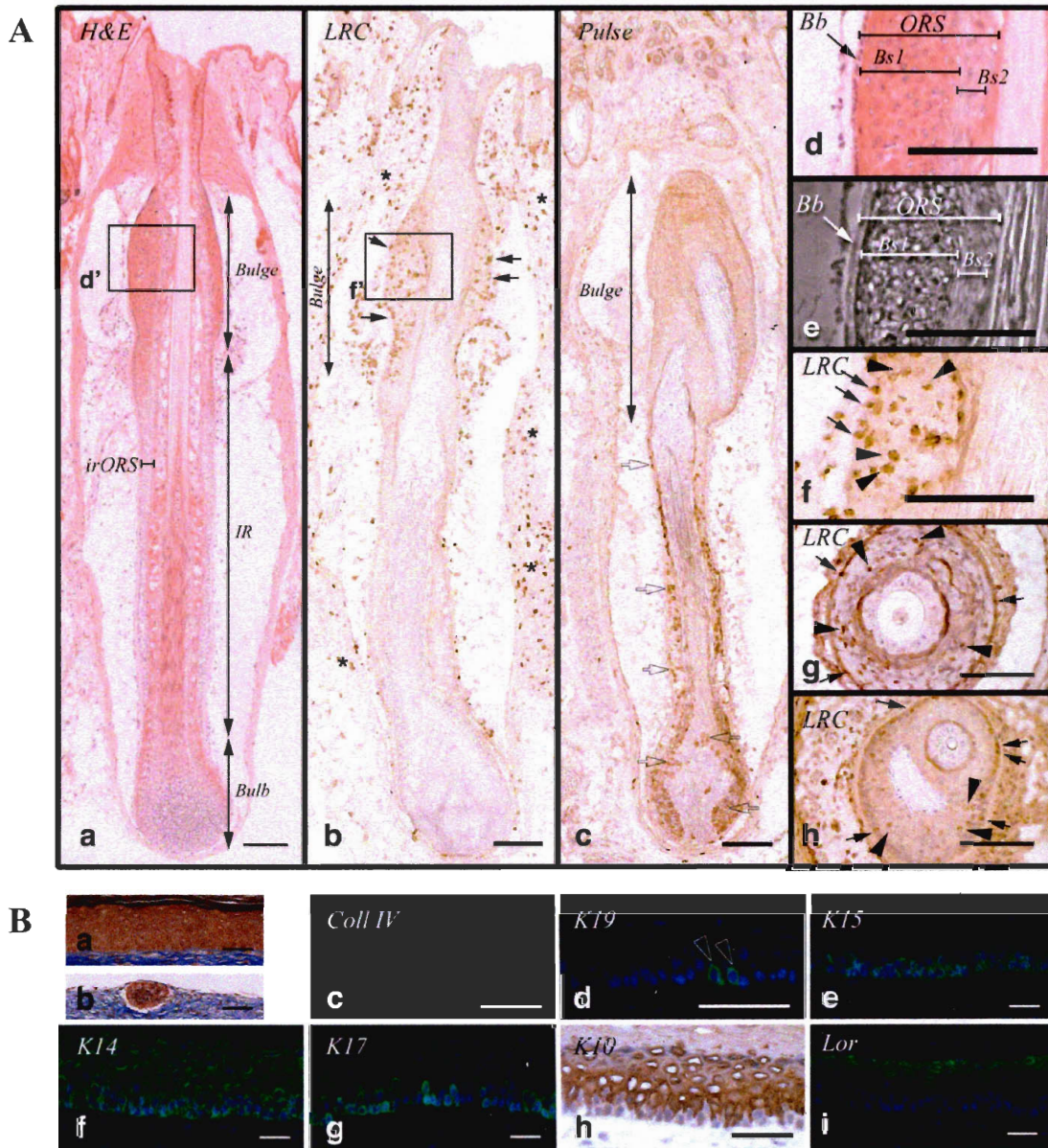


Figure IV-1 Putative stem cells of the vibrissae follicle (A) LRCs of the vibrissae follicle represent a heterogeneous population as reflected by distinct histological features. (a) Hematoxylin-eosin staining of vibrissae follicle section from FVB/N mouse. (d) High magnification of boxed area in a (d'). (e) Phase contrast micrograph corresponding to d. (b,c,f-h) represent vibrissae follicle sections labeled for BrdU. (f) High magnification of boxed area in b (f'). To generate LRCs, newborn (1-5 days old) (b,f,g) or adult (3 months old) (h) FVB/N mice received repeated injections of BrdU (see Materials and Methods).

Following a chase period of 1 month (b,f,h) or 7 (g) months, basal keratinocytes (arrows) as well as those of the first suprabasal layers (arrowheads) conserved labeling. Note that dermal cells also retained the BrdU label (b; asterisks). To visualize actively dividing cells, 1 month old mice received two BrdU-injections 1 day before biopsy harvesting. (c) Actively dividing cells were located in the intermediate and bulb regions (open arrows), while non-labeled-cells were found in the bulge region of the hair follicle. (B) Vibrissae bulge cells can give rise to a well-differentiated epidermis. (a,c-i) Tissue sections of dissected vibrissae bulges or (b) bulbs explanted onto tissue-engineered dermis and cultured *in vitro*. (a,b) Masson's trichrome staining. Immunolabeling (green or brownish staining) of collagen IV (c), K19 (d, arrows), K15 (e), K14 (f), K17 (g), K10 (g) and loricrin (i). Sections were counterstained with Hoechst (c-g,i) or Harris's hematoxylin (h) to visualize cell nuclei. IR, intermediate region; Bb, bulge basal; Bb1, bulge suprabasal 1; irORS, intermediate region of the ORS; Bs2, bulge suprabasal 2; ORS, outer root sheath. Scale bar: 100 μm in A, panels a-h; 50 μm in B, panels a-i.

Bulge cells possess an extensive proliferation potential and can give rise to epidermis

In mouse pelage hair follicles, bulge-derived SCs can give rise to epidermis (Blanpain *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2004; Oshima *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2000; Tumber *et al.*, 2004). We evaluated the potential of bulge vibrissae cells to reconstruct a fully differentiated epidermis in the context of an *in vitro* skin reconstruction assay. We explanted dissected bulges from vibrissae follicles onto tissue-engineered dermis, an excellent substrate for the proliferation of epithelial cells (Laplante *et al.*, 2001; Michel *et al.*, 1999). In parallel, dissected bulbs and intermediate regions of vibrissae follicles were explanted. Eleven days later, 10/10 bulges, 2/20 bulbs and 0/10 intermediate regions had generated migrating epithelial tongues. An average time of 2.2 ± 0.4 days ($n=10$) was needed for cells to migrate out of the bulge and bulb explants, after which the epithelial sheet migrated at a steady rate of $240 \mu\text{m}/\text{day} \pm 80$ ($n=31$). Such migration was sustained until confluence (11 days) in bulge explants, but it stopped after 5 days and well prior to reaching confluence in hair bulb explants.

After 14 days of culture, with the bulge explants immersed in medium, a 2-3 layer thick epithelium completely covered the dermal surface (5 cm^2) (data not shown). After an additional 7 days of culture at the air-liquid interface, a stratified epithelium composed of all the major compartments normally present in interfollicular epidermis, including the granular layer and stratum corneum, had formed (Fig. 1B, panel a). This tissue was

embedded, sectioned, and processed for immunodetection of relevant markers of epidermal differentiation. Collagen IV (Fig. 1B, panel c) and laminin (data not shown), two basement membrane components, were detected at the dermo-epithelial junction as expected. K19 was identified in a small subset basal keratinocytes (Fig 1B, panel d, open arrowheads) while K15 was expressed in the majority of basal cells (Fig. 1B, panel e). K14 (Fig 1B, panel f) and K5 (data not shown) were found in the basal and suprabasal living keratinocytes. Bright K17 staining occurred in most basal cells and, in a more sporadic fashion, in lowermost suprabasal cells (Fig. 1B, panel g). K10 and loricrin, which respectively mark early and late stages of differentiation, occurred in the lower and upper suprabasal layers of the epithelium (Fig. 1B, panels h and i), as expected.

Keratinocytes from the other portions of the vibrissae, such as bulb (Fig. 1B, panel b) and intermediate region (data not shown), did not proliferate enough to entirely cover the surface of the dermis, and completely failed to form an epidermis over the same period. Collectively, these data indicate that cells of the bulge region of mouse vibrissae follicles can proliferate to generate a stratified epithelia exhibiting several of the key properties specific to epidermis.

Asymmetry of keratin distribution in the stem cell niche of the vibrissae follicle

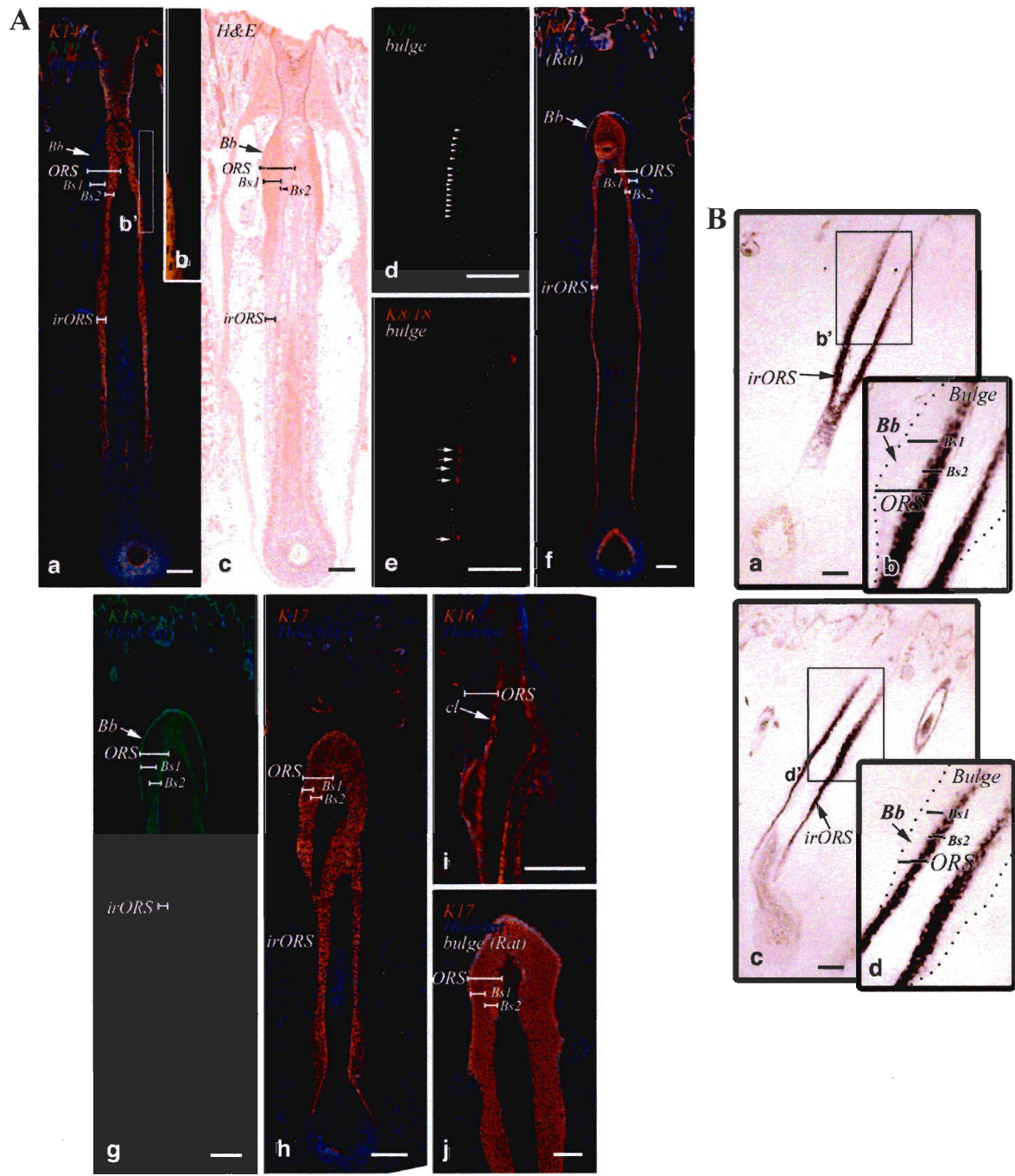
To better characterize the SC niche of the vibrissae follicle, we took advantage of the tight differentiation-related regulation of keratin genes within epithelia (Moll *et al.*, 1982). Frozen sections of adult murine vibrissae follicles were immunostained for K19 and K15, which are putative SC markers (Lyle *et al.*, 1998; Michel *et al.*, 1996), and for the other main keratins occurring in the ORS, including K5, K6, K14, K16, K17 (Fuchs, 1995; Heid *et al.*, 1988a; Heid *et al.*, 1988b; Lynch *et al.*, 1986; Stark *et al.*, 1987). We found that K19 was exclusively localized in basal cells of the bulge area (Fig. 2A, panels a,b). A subset of these K19-expressing cells (Fig. 2A, panel d, arrowheads) reacted as well with antibodies directed against K8/K18 (Fig. 2A, panel e, arrows) and K20 (not shown), indicating that they likely corresponds to neuroepithelial Merkel cells (Fradette *et al.*, 1995; Fradette *et al.*, 2003; Moll *et al.*, 1984). Unlike the situation prevailing in epidermis (Moll *et al.*, 1982; Nelson and Sun, 1983), cells within both the Bb and Bs1 compartments were

negative for K14 (Fig. 2A, panels a,b). K14 immunoreactivity was prominent, however, in the Bs2 compartment of the bulge (Fig. 2A, panels a,b), and in the intermediate region of the ORS (Fig. 2A, panel a). Similar findings were obtained when using three distinct antibodies raised against different K14 epitopes (data not shown), and in vibrissae follicles from FVB/N, C57Bl/6 (Fig. 2C, panel f) and C3H/He mice. Follow-up studies showed that K14 mRNA distribution, as assessed by *in situ* hybridization, emulated that of the protein, in that it is missing from the Bb and Bs1 compartments but easily detected in Bs2 cells and in other locations in hair tissue. This distribution did not change as a function of the vibrissae growth cycle (Fig. 2B; compare panels a,b with c,d). Remarkably, therefore, the slow-cycling cells contained within the Bb and Bs1 compartments of the bulge do not express K14.

In contrast to K19 (Fig. 2A panels a,b), immunostaining for K15 gave rise to a signal in all basal cells of the ORS (Fig. 2A, panel g). K15 was also expressed in Bs2 cells in addition to all suprabasal cells in ORS from the intermediate region of the vibrissae follicle (Fig. 2A, panel g). Bs1 cells were distinctly devoid of K15 (Fig. 2A, panel g). K16 antigens (Fig. 2A, panel i) and mRNA (data not shown) were restricted to the companion layer. In contrast, K17 antigens (Fig. 2A, panel h) and mRNA (data not shown) occurred throughout the bulge (Bb, Bs1, Bs2 cells alike; Fig. 2A, panel h) and in the remainder of the ORS. The unique character of Bs1 cells, with strong expression of K17 but little if any K14, was observed in adult rat vibrissae as well (Fig. 2A, panels f,j).

We also performed immunostainings for conventional K6 isoforms and K5, the type II keratins most frequently co-regulated with K17 *in vivo* (McGowan and Coulombe, 1998a; Wang *et al.*, 2003). K5 immunoreactivity occurred in all three compartments of the vibrissae bulge and throughout the remaining ORS (Fig. 2C, panel a). On the other hand, K6 protein expression was restricted to the innermost layers of the ORS (Fig. 2C, panel c) that also expressed K16 (Fig. 2C, panel e). K5 thus represents the likely polymerization partner of K17 in Bs1 cells of the vibrissae bulge. Based on type I keratin expression, two distinct populations of LRCs can thus be distinguished in the SC niche of rodent vibrissae

follicles: a) basal (Bb) keratinocytes expressing K15, K17 and K19 but devoid of K14; and b) suprabasal (Bs1) cells featuring K17 as their main type I keratin.



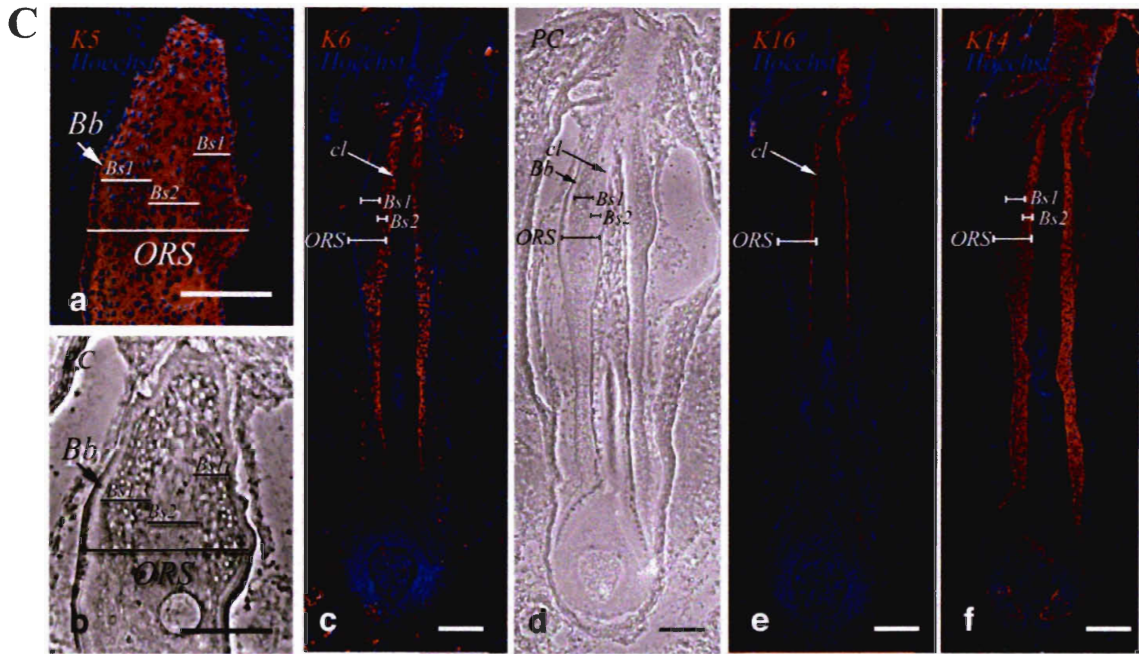


Figure IV-2 Keratin expression in rodent vibrissae follicles (A) Type I keratin expression in rodent vibrissae follicles. (a-e,g,h,i) Vibrissae follicle sections from adult FVB/N mouse and (f,j) Fisher rat. (a) Immunofluorescence labeling of K19 (a,b,d, arrowheads), K8/18 (e, arrows), K14 (a,f), K15 (g), K17 (h,j) and K16 (i). Note the absence of K14 (a,b,f), K15 (g) and K16 (i) in Bs1 cells and the exclusive localization of K19 in basal cells of the bulge area (a,b,d). (b) High magnification of boxed area in a (b'). (c) is corresponding hematoxylin-eosin staining micrographs of a. (B) K14 mRNA expression in mouse vibrissae follicles. K14 gene expression of anagen (a) and catagen (c) vibrissae follicle sections from C57Bl/6 mice were analyzed by *in situ* hybridization (see Materials and Methods). (b and d) High magnification of boxed area b' and d' respectively. Note the complete lack of K14 mRNA expression in Bb and Bs1 cells (a-d). (C) Keratin expression in C57Bl/6 mouse vibrissae follicles. (a,c,e,f) Immunofluorescence labeling of K5 (a), K6 (c), K16 (e) or K14 (f). (b and d) Phase contrast micrographs corresponding to a and c respectively. (e, f) Consecutive sections to c. Note that K5 expression occurs in Bb, Bs1 and Bs2 cells (a,b), while K6 protein expression was restricted to the innermost layers of the ORS (c) that also expressed K16 (e). Dotted line, basement membrane. Bb, bulge basal; Bs1, bulge suprabasal 1; Bs2, bulge ORS suprabasal 2; cl, companion layer; irORS, intermediate region; ORS, outer root sheath. Scale bars: 100 μ m in A, panels a,c-e,g-i, B panels a, c, C, panels a-f; 50 μ m in A, panel f,j.

Activation of dormant slow-cycling cells *ex vivo* correlates with expression of K14

The slow-cycling nature of keratinocytes located in the Bb and Bs1 compartments of the bulge may be related to the conspicuous absence of K14 expression. To address this possibility, we analyzed Bb and Bs1 cells when dissected murine vibrissae bulges are

explanted on tissue-engineered dermis *ex vivo*. BrdU was added to the culture medium 24h prior to harvesting to monitor active proliferation of these cells. After 1 day of culture, K19 expression was still restricted to Bb (Fig. 3D). In contrast to intact follicles *in situ*, occasional Bb cells were immunoreactive for K14 staining. Typically, such cells also had incorporated BrdU (Fig. 3, A,D, arrows), indicating a newly acquired proliferative status. During days 2 and 3 of culture, the co-expression of K14 with K19 expanded to include the majority of BrdU-positive basal cells (Fig. 3B,C,E,F, arrows). Co-expression of K19 and K14 also occurred in the migrating sheet of keratinocytes forming after 8 days of culture (Fig. 3L), further supporting the notion that induction to proliferate causes LRCs to activate K14 expression.

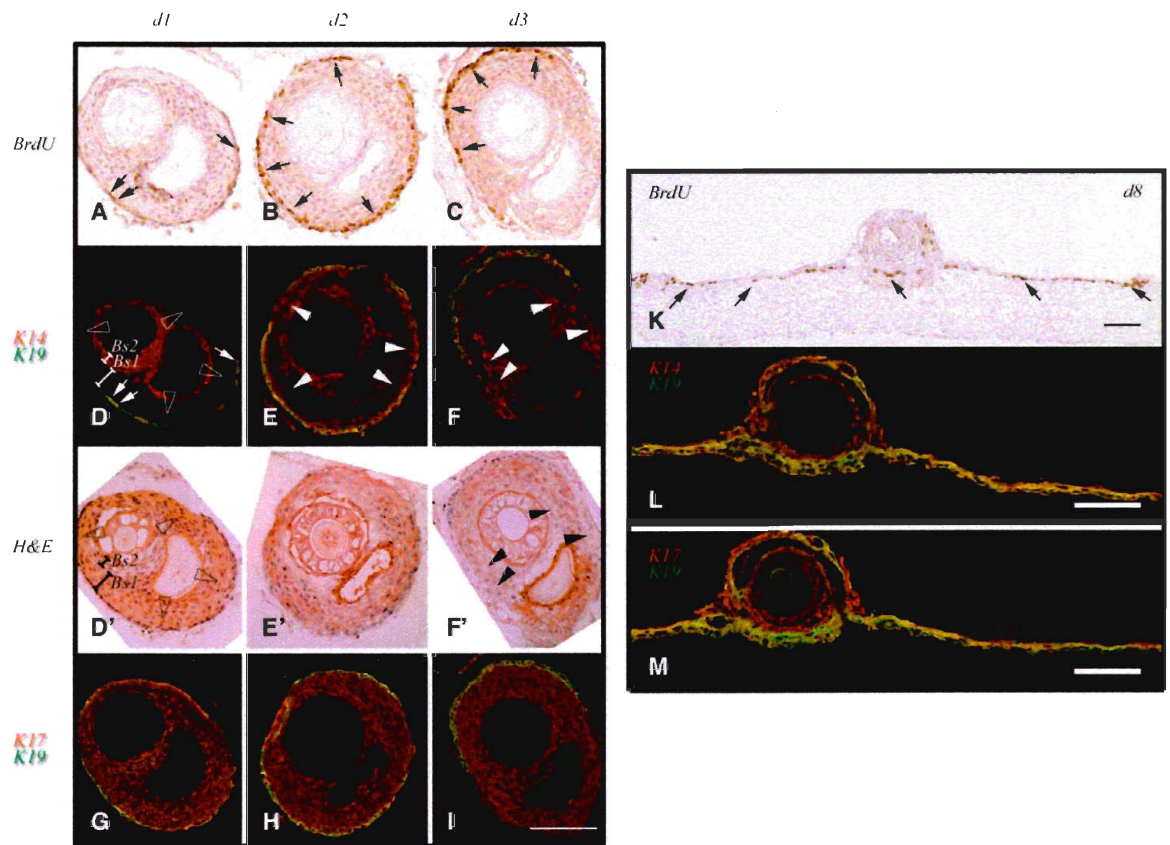


Figure IV-3 Re-emergence of K14 in Bb and Bs1 cells in vibrissae bulges explanted *ex vivo* Tissue sections of dissected vibrissae bulges explanted for 1 (A,D,D',G), 2 (B,E,E',H), 3 (C,F,F',I) and 8 (K,L,M) days onto tissue-engineered dermis. BrdU (10 μ M) was added to the culture medium 1 day before harvesting the biopsies in order to visualize cycling cells. (A,B,C,K) show immunoperoxidase detection of BrdU (brownish colored nuclei, arrows).

(D,E,F,L) and (G,H,I,M) Double immunofluorescence labeling of K14 (arrowheads), K17 and K19 on sections consecutive to A,B,C,K respectively. (D',E',F') Hematoxylin-eosin staining of D,E,F respectively. After 1 day of culture, the majority of basal and suprabasal cells lacked K14-labeling (D, open arrowheads). However, co-expression of K14 with K19 was observed in occasional BrdU-positive basal cells (A,D, arrows). Note the appearance of K14 expression in Bs1 cells (D,E,F, arrowheads) correlating with the loss of their strong eosinophilic character (F', arrowheads). Bs1, bulge suprabasal 1; Bs2: bulge suprabasal 2. Scale bars: 50 μ m.

K17 immunoreactivity occurred in all cells of the ORS within the bulge explants and remained present after 1, 2 or 3 days of culture (Fig. 3G, H, I) as well as in cells of the migrating epithelial tongue (Fig. 3M). Of note, the strong eosinophilic character of Bs1 cells *in situ* progressively disappeared over the initial three days of bulge explant culture (Fig. 3D', E', F'). Such a change correlated with the appearance of K14 expression (Fig. 3E, F arrowheads), and suggests that the phenotype of Bs1 cells is modulated upon activation of proliferation.

Establishing a parallel between keratin protein distribution and filament organization

Transmission electron microscopy in association with immunogold labeling for K19 and K14 was carried out in an attempt to determine whether the differential distribution of keratin proteins has any impact on the ultrastructural organization of keratin filaments. In accordance with immunofluorescence observations, bulge basal (Bb) cells exhibited gold labeling for K19 but much less so for K14 (Fig. 4A,B), correlating with a network of IFs of modest density and loose organization. In stark contrast, Bs1 cells exhibited a very dense network of heavily bundled filaments that did not stain for K19 nor K14 (Fig. 4A',C). Bs2 cells, which are immunopositive for K14 but not K19, displayed a keratin filament network of an intermediate density relative to the Bb and Bs1 cells (Fig. 4A'',D), reminiscent of basal cells in other regions of the ORS (Fig. 4E,F) and epidermis. Thus, the differential distribution of type I keratins is mirrored by striking differences in the density and organization of keratin filaments in the three major subcompartments forming the vibrissae bulge.

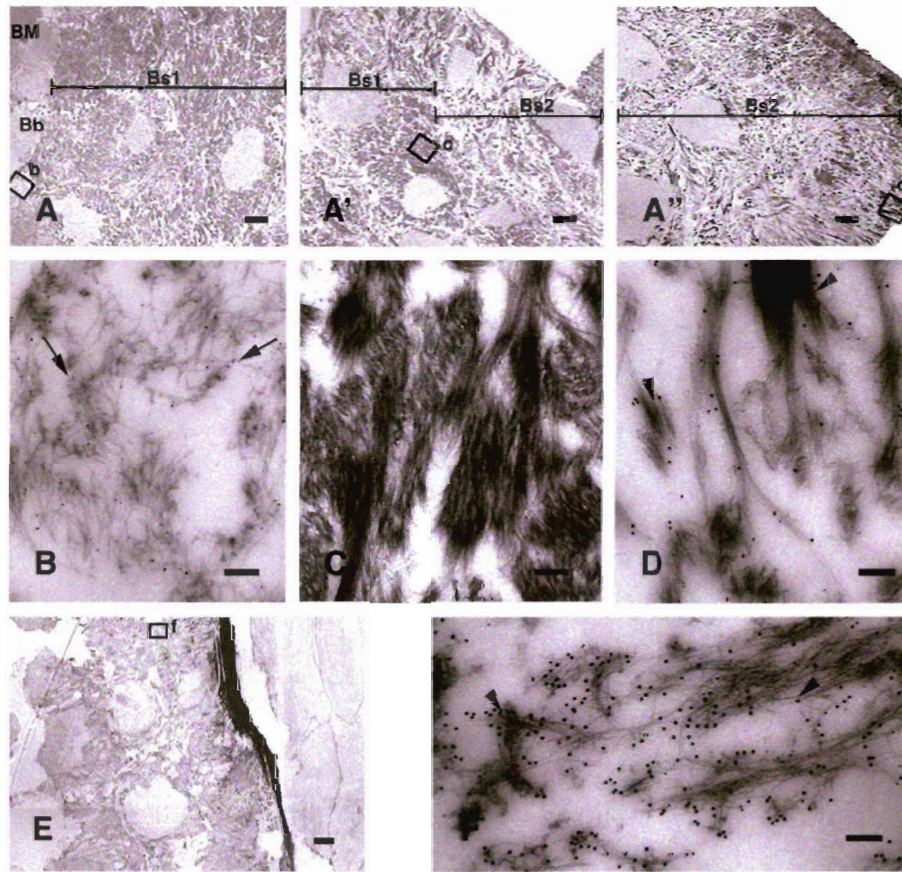


Figure IV-4 Keratin filament ultrastructural organization of vibrissae follicle (A-F)

Vibrissae follicle sections from FVB/N mouse double-immunolabeled for K14 (10 nm-gold particles, arrowheads) and K19 (5 nm-gold particles, arrows) and processed for electron microscopy analysis (see Materials and Methods). (A,A',A'') Micrographs showing different fields of the same bulge region. (B,C,D,F) High magnification of boxed areas in A (b), A' (c), A'' (d) and E (f) respectively. (E) View of the intermediate region. Note that Bb cells labeled for K19 (B, arrows) displayed a loosely organized keratin filament network, while Bs1 cells had densely bundled filaments and did not stain for K19 nor K14 (C). Bs2 cells expressed K14 (D, arrowheads) and displayed a filament network of an intermediate density similar to those of the K14-positive cells of the intermediate region (F, arrowheads). BM, basement membrane; Bb, bulge basal; Bs1, bulge suprabasal 1; Bs2, bulge suprabasal 2. Scale bars: 2 μ m in A,A',A'',E); 100 nm in B,C,D,F.

Lack of K17 causes acute epithelial fragility in the vibrissae bulge

Availability of K17 null mice (McGowan *et al.*, 2002) provides an opportunity to assess the consequences with loss of this keratin in vibrissae bulge epithelial cells. These K17 null mice lack most of their vibrissae hairs (Fig. 5A, panel b). In contrast to the previously

reported phenomenon of partial alopecia affecting the pelage coat (McGowan *et al.*, 2002), the vibrissae phenotype shows a high, strain-independent penetrance, and does not ameliorate with age (data not shown). Histological analyses showed that vibrissae follicles frequently presented alterations including deformation of the hair shaft, defects in the hair fiber (Fig. 5B, panel b, open asterisk), and destruction of the outer root sheath, including the bulge. Some K17^{-/-} vibrissae follicles appeared histologically normal (Fig. 5B, panel c). However, close examination of their bulge area showed that lack of K17 is associated with loss of the Bs1-associated features such as strong eosin affinity (Fig. 5B, compare panels a,d with b-f) and unusually dense cytoplasm under phase contrast microscopy (data not shown). Instead, cells located in the Bs1 compartment of the bulge in K17^{-/-} vibrissae follicles were similar in appearance to ORS cells located in the intermediate portion (Fig. 5B, panels b,c,e,f). TUNEL stainings revealed no significant differences between null and wild-type samples (data not shown) which, along with the absence of aberrations in nuclear morphology (Fig. 5B panel b,c,e,f), suggested that apoptosis did not contribute significantly to the histological defects in K17^{-/-} vibrissae. Additional stainings of vibrissae follicle sections were performed to assess whether lack of K17 causes alterations in keratin markers. K16 was distinctly found to be upregulated in the innermost (hair-proximal) portion of the Bs1 compartment (Fig. 5C, panel d, arrows), instead of being restricted to companion layer (Fig. 2C panel e). The outermost layers of the K17^{-/-} Bs1 compartment were, however, distinctly devoid of staining for K16 (Fig. 5C, panel d, open arrowheads). Another notable difference was the presence of K14-immunopositive cells in the Bb (basal) compartment of K17^{-/-} preparations (Fig. 5C, panel b, arrow). This correlated with the presence of a small number of actively proliferating cells in this layer, as shown by acute BrdU incorporation studies (data not shown). This phenomenon likely reflects an attempt towards tissue repair (see Discussion). The distribution of K19, K15, and K6 was largely unchanged in K17^{-/-} (Fig. 5C, panels b-f) relative to wild-type vibrissae follicles (Fig. 2). K5 staining was reduced, absent, and/or atypical in the Bs1 compartment of K17^{-/-} follicles (Fig. 5C, panel e, open arrowheads), supporting the notion that K17 normally acts as a polymerization partner for K5 in this compartment. The distribution of K6 was not significantly altered (Fig. 5C, panel f).

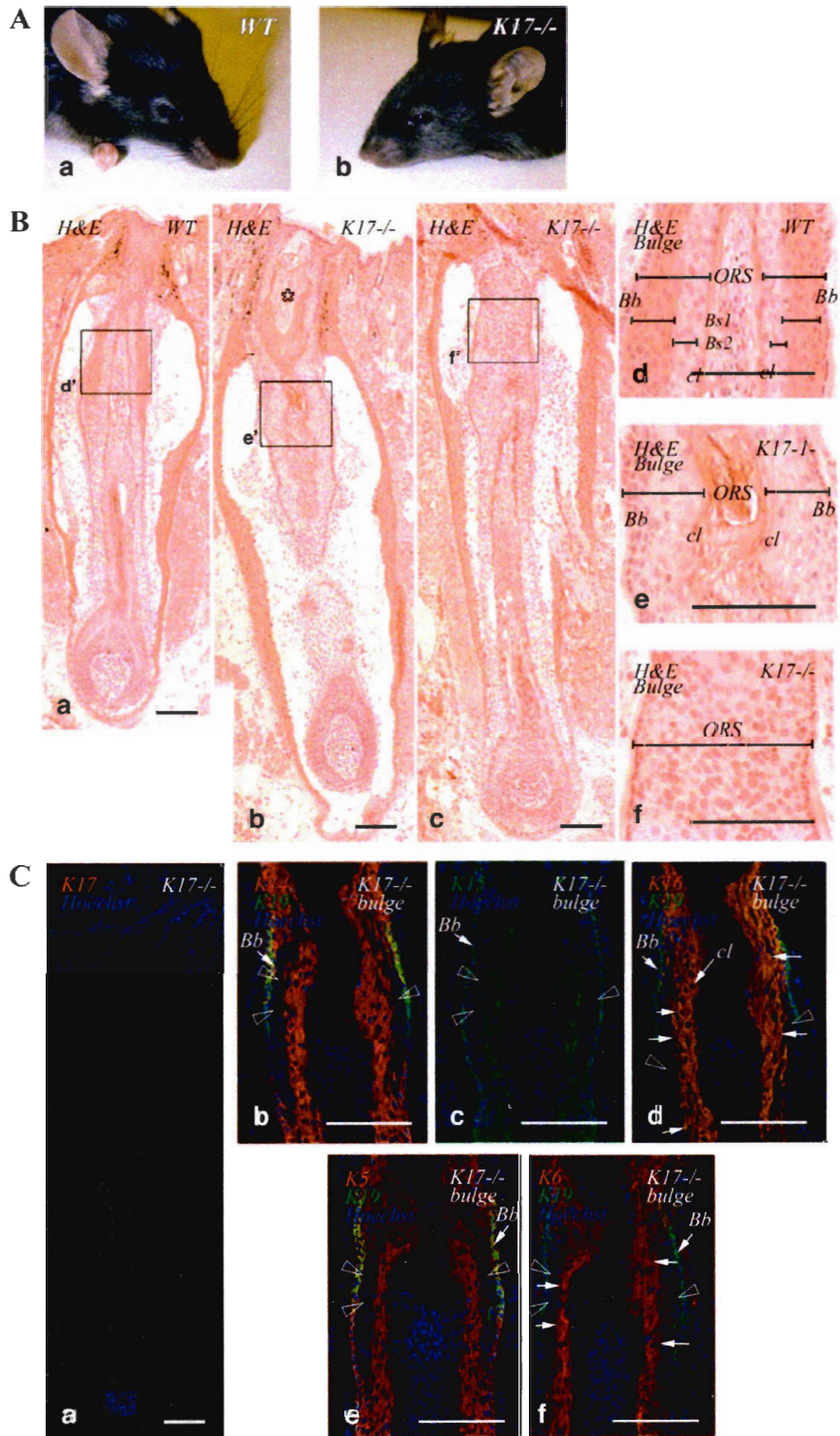


Figure IV-5 Keratin expression in the vibrissae follicles of K17 null mouse (A)

Macroscopic appearance of the whisker pads of (a) wild-type and (b) C57Bl/6K17^{-/-} mice. (B) Histological aspect of vibrissae follicles from K17 null mice. Vibrissae follicle sections from (a) wild-type and (b,c) C57Bl/6 K17^{-/-} adult mice stained with hematoxylin-eosin. (b) K17^{-/-} vibrissae follicle presenting alterations such as deformation of the hair shaft and defects of the hair fiber (open asterisk). (d,e,f) High magnification of boxed areas in a (d'), b (e') and c (f') respectively. Note that the lack of K17 lead to the loss of the strong eosinophilic character (e,f) associated to wild-type Bs1 cells (d). (C) Keratin expression in K17 null mice vibrissae follicles. (a-f) Sections of vibrissae follicle from C57Bl/6 K17^{-/-} mouse. Double immunofluorescence labeling of K17 (a), K14 (b), K15 (c), K16 (d), K5 (e), K19 (b,d,e,f) and K6 (f). The first suprabasal cell layers in the ORS of the bulge are devoid of K14 and K15 protein expression and likely correspond to Bs1 cells (b,c, open arrowheads). K16 protein (d, arrows) is expressed with K6 (f, arrows) in the innermost suprabasal layers of the ORS cells (hair-proximal) instead of being restricted to the companion layer. Relative to wild-type vibrissae follicle (see Fig. 2C, panel a), K5 staining is reduced or absent in Bs1 cells (e, open arrows). Bb, bulge basal; Bs1, bulge suprabasal 1; Bs2, bulge ORS suprabasal 2; cl, companion layer; ORS, outer root sheath. Scale bars: 100 μ m.

Immunoelectron microscopy was next performed to further define the alterations in the Bs1 compartment of K17^{-/-} vibrissae bulge. Immunofluorescence for K19 provided a suitable landmark to localize the Bb (and Bs1) compartment (Fig. 6a,b), and consecutive sections were processed for K19-immunogold labeling as well as ultrastructural analysis. In contrast to wild type (Fig. 6c,e, arrows), the suprabasal cells located next to K19-expressing cells in the bulge exhibited a poorly developed IF network in K17^{-/-} vibrissae follicles (Fig. 6f,h-j). Large areas of cytoplasm were completely devoid of filaments in these cells. Desmosomes were retained at sites of cell-cell adhesion (Fig. 6i, des), but basal (Bb) and Bs1 suprabasal cells appeared more flattened and electronlucent (Fig. 6f). These observations provide an ultrastructural basis for the apparent fragility manifested by K17^{-/-} Bs1 cells, a likely contributor to the vibrissae phenotype shown by K17 null mice.

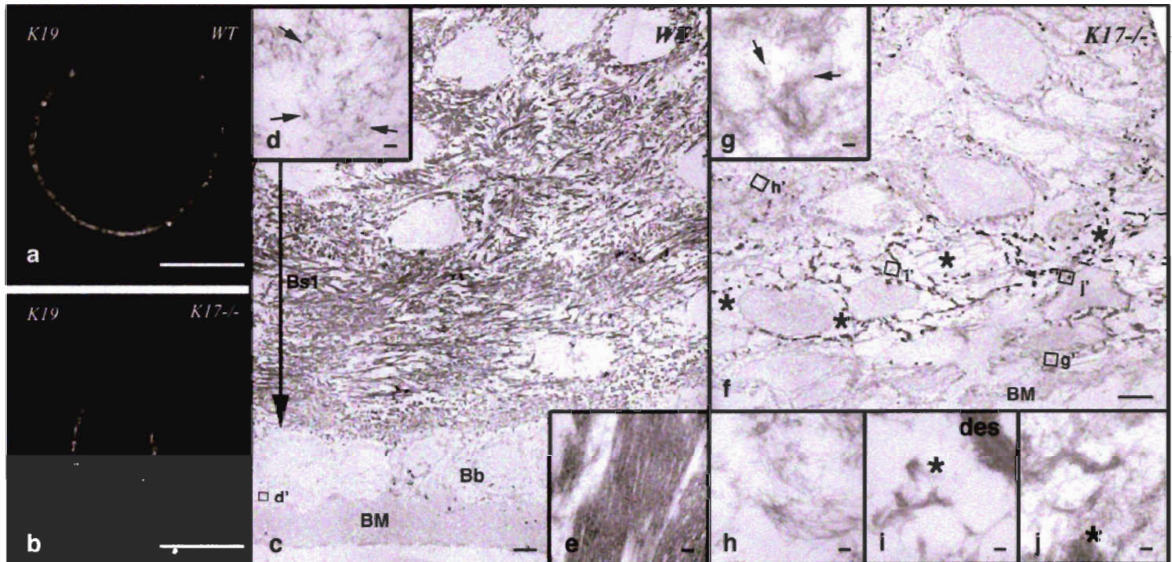


Figure IV-6 Keratin filament organization of $K17^{-/-}$ vibrissae follicle Vibrissae follicle sections from (a) C57Bl/6 and (b) C57Bl/6 $K17^{-/-}$ mice. (a,b) Immunofluorescence labeling of K19. (c,f) Sections consecutive to a and b respectively, immunolabeled for K19 (5 nm-gold particles) and processed for electron microscopy analysis. (d) High magnification of boxed area in c (d'). (e) High magnification of a Bsl cell. (g,h,i,j) High magnification of boxed areas in f (g',h',i',j', respectively). Note that in $K17^{-/-}$ vibrissae follicles, the loss of K17 expression altered significantly the keratin filament network which present sparse filamentous materials and cytoplasmic area devoid of IF and showing aggregates (f,h,i,j, asterisks). As seen in wild-type (d, arrows), K19-expressing cells displayed a loosely arranged keratin network in $K17^{-/-}$ vibrissae follicle (g, arrows). BM, basement membrane; Bb, bulge cell; Bsl, bulge suprabasal 1, des, desmosome. Scale bars: 100 μm in a,b; 2 μm in c,f; 50 nm in d,e,g-j.

Discussion

Remarkable progress has recently been made in our understanding of the properties exhibited by the SCs housed in the bulge region of hair follicles in hairy skin (Blanpain *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2004; Oshima *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2000; Tumber *et al.*, 2004). Several key questions yet remain, including the notion of how many "stable" progenitor cell populations are maintained in this specialized niche. Combining morphological criteria, cell proliferation data, and keratin profiling enabled us to distinguish three cell populations in the bulge area of mouse and rat vibrissae follicles. Two of these populations consist of slow-cycling cells with SC potential. One, as expected (Michel *et al.*, 1996), consist of K19-expressing cells lying on a basal lamina (Bb cells), and displaying a wispy keratin IF network relative to the situation prevailing in typical basal cells (as in epidermis). The other one, unexpectedly, is located suprabasally, i.e., away from the basal lamina (Bs1 cells), and consists of cells featuring an unusually dense keratin IF network correlating with an enriched content in K5/K17. Presence of K17 is required for the distinct cytoarchitecture and the integrity of epithelial cells within the Bs1 compartment, and the presence of vibrissae hair on mouse whisker pads. Also of note, we found that both Bb and Bs1 cells do not express K14, usually a mainstay in the progenitor (basal) compartment of stratified and other complex epithelia (e.g., Nelson and Sun, 1983; Byrne *et al.*, 1994 and Fuchs, 1995). This observation has obvious implications for the consequences associated with the utilization of the K14 promoter for transgenic mouse work, and how its impact on vibrissae follicles might differ from studies making use of the K5 promoter.

Our findings extend a recent report showing that slow-cycling epithelial cells exhibiting a distinct molecular signature occur in both the basal and suprabasal compartments of the bulge in mouse pelage hair follicles (Blanpain *et al.*, 2004). Our findings have implications for the homeostasis of rodent vibrissae follicles which, as elegantly shown by Oshima *et al.* (2001), has to differ from that occurring in mouse pelage follicles. Finally, and as discussed further below, they impact our understanding of the significance of differential keratin regulation in complex epithelial settings.

Two distinct populations of slow-cycling epithelial cells within rodent vibrissae bulges

Relative to pelage hair follicles, vibrissae follicles show peculiar anatomical features owing to their extreme specialization towards tactile sensation (see Introduction). While both types of hair follicles undergo cyclical growth, vibrissae follicles are also distinct in that their lowermost portion is only partially, as opposed to nearly completely, destroyed during catagen (Young and Oliver, 1976). One consequence of this difference is that the dermal papillae does not come in close proximity to the bulge, at the end of catagen and throughout telogen, in vibrissae follicles (Oshima *et al.*, 2001; Young and Oliver, 1976). In fact Oshima *et al.* (2001) provided evidence, in their cell lineage study, for a sustained migration of presumptive SCs from the bulge to the bulb area (and within the ORS) in anagen-stage vibrissae follicles. Only when reaching their destination, the bulb, do these SCs presumably commit to a particular lineage (e.g., IRS, hair shaft, Oshima *et al.*, 2001). This model implies that SC replication occurs symmetrically in the bulge, giving rise to daughter cells having equal potential (Oshima *et al.*, 2001). Our findings therefore raise the following two key issues. One is whether the presumptive SCs that migrate from the bulge to the bulb in anagen-stage follicles (Oshima *et al.*, 2001; see also Kopan *et al.*, 2002) originate from the Bb, Bs1, or both compartments. The other one is the respective role and stemness potential of the pool of slow-cycling cells that occur in the Bb and Bs1 compartments of the vibrissae bulge, given that they exhibit several key differences, and the relationship they have with one another.

In their study of pelage hair follicles in mouse, Blanpain *et al.* (2004) showed that in spite of their distinct molecular signature, the basal and suprabasal slow-cycling epithelial cells were each multi-potential and capable of long-term self-renewal, two defining characteristics for SCs. The occurrence of SCs in the suprabasal layer(s) of the bulge, away from the basal lamina, is intriguing given the reported ability to enrich for skin epithelial SCs when selecting for high levels of specific integrins exposed at the cell surface (Jones *et al.*, 1995; Tani *et al.*, 2000; Watt, 2002). Blanpain *et al.* (2004) showed that the suprabasal layer of slow-cycling cells formed at the conclusion of the initial hair cycle in pelage follicles, and likely originated from the basal compartment of the bulge. Though we provide evidence that the vibrissae bulge can give rise to *bona fide* epidermis, our findings

do not allow us to pinpoint the cellular source of this multipotentiality in the vibrissae bulge (also, see Oshima *et al.*, 2001), nor do they point to a relationship between these the Bb and Bs1 pools of slow-cycling cells. At another level, there are several differences between our study and that of Blanpain *et al.* (2004) relative to how the basal and suprabasal pools of slow-cycling cells differ from one another, and from other cells populating the ORS. Such issues, and several others, need be further explored keeping in mind that pelage and vibrissae follicles differ in many respects (see Oshima *et al.*, 2001), and that multipotent epithelial SCs housed in hair follicles of the skin can show considerable phenotypic plasticity (Ito *et al.*, 2004).

Keratins as potential markers of distinct populations in the hair bulge: What does it mean?

Skin epithelia represent a rich context in which to assess the relationship between a specific complement of keratin proteins and the properties of the cell's keratin IF network. Nearly two-thirds of the entire complement of keratin genes are expressed in skin tissue alone, and this is paralleled by a rich diversity at the level of IF network architecture. Not surprisingly, there is evidence that specific keratins are "enriched" in the basal layer of the bulge, defining a domain that includes slow-cycling and/or SCs. Thus, K19 (Michel *et al.*, 1996) and K15 (Lyle *et al.*, 1998) have been previously implicated in that fashion. Here, we show that K17 and low levels of K14 (also, see Coulombe *et al.*, 1989) might also be useful in this regard, though in a context-specific fashion (see below).

Our findings extend previous work showing that a subset of basal cells in the human and mouse hair follicle ORS feature an atypically "wispy" keratin IF network, correlating with low/absent K14 (this study; see Coulombe *et al.*, 1989) and presence of K19 (Michel *et al.*, 1996; also, this study). Interestingly, comparative studies of the assembly and micromechanical properties of filament assemblies *in vitro* demonstrated that relative to K5/K14, the K5/K19 pair inherently promotes the formation of "wispy", sparser, and softer IF networks (Bousquet *et al.*, 2001; Fradette *et al.*, 1998). The observations reported here also suggest that the ratio of K14 to K19 in basal keratinocytes can be dynamically adjusted, depending on the condition, correlating with cellular proliferation and/or

differentiation (see Coulombe *et al.*, 1989). Thus, K19-expressing cells can be induced to actively proliferate when bulge-containing segment of vibrissae follicles are cultured as explants *ex vivo*, coinciding with the induction of K14. When these explants are subsequently manipulated so as to give rise to *bona fide* epidermis, K19 resumes a distribution restricted to a very small subset of keratinocytes in the basal layer (see Michel *et al.*, 1996), which otherwise consistently express K14, among other keratins (Fig. 3). Ideally, the significance of these intriguing correlations should be tested in keratin null or keratin replacement mouse models. In the case of K14 and K19, however, the value of such studies is hampered by complications such as neonatal lethality and functional redundancy within the keratin family (Hesse *et al.*, 2000; Lloyd *et al.*, 1995).

Keratin 19 is now found to be consistently present in a group of basal cells encompassing the bulge (and its slow-cycling cells) in human scalp hair, mouse pelage follicles (Michel *et al.*, 1996), and mouse and rat vibrissae follicles (this study). Conversely, Blanpain *et al.* (2004) did not notice the K14 antigen levels being relatively lower in the bulge area of mouse mature pelage follicles, pointing to a potential difference between these and vibrissae follicles. Obviously, there are determinants other than keratin composition that can influence the organization and density of cytoplasmic IFs in epithelial cells (Coulombe *et al.*, 2000), such that the basal cells of pelage follicles may exhibit a "wispy" keratin filament network even though they express K14 at some level (see Coulombe *et al.*, 1989). Raising another issue, whether K15 is indeed a marker of SCs in the basal layer of the bulge clearly depends on how its presence is assessed. The Cotsarelis group showed, through transgenesis in mouse, that the cloned K15 gene promoter is preferentially active in the hair bulge (Liu *et al.*, 2003), paving the way for the successful isolation and characterization of these epithelial cells (Morris *et al.*, 2004). The same cannot be said for K15 protein, however (this study; see Lloyd *et al.*, 1995 and Porter *et al.*, 2000)(Porter *et al.*, 2000), although there are K15-associated epitope(s) that are enriched in the Bb population of the bulge (Lyle *et al.*, 1998).

The second population of slow cycling keratinocytes that we identified in the vibrissae bulge exhibits a dense cytoplasm by phase contrast microscopy and a strong

affinity for eosin, both reflecting an unusually prominent network of keratins IFs. The so-called Bs1 cells express K5/K17 as their main keratin pair, i.e, they lack many of the keratins usually found in the ORS such as K14, K15 and K16 (Heid *et al.*, 1988a; Heid *et al.*, 1988b; Lynch *et al.*, 1986; Stark *et al.*, 1987; Whitbread and Powell, 1998). The presence of this dense network requires K17 (as does the maintenance of K5 protein), ascertaining the predominant role of the K5/K17 pairing in Bs1 keratinocytes of the bulge. The contrast between Bb and Bs1 cells suggests that the proliferative status of keratinocytes in the vibrissae bulge is not markedly influenced by the organization, prevalence and, to some extent, composition of keratin IFs. As is the case for K19, expression of K17 does occur in a broad variety of epithelial cell types, independent of their proliferative and terminal differentiation potential (Coulombe *et al.*, 2004; McGowan and Coulombe, 1998b).

Why does a population of epithelial cells having an extensively developed IF apparatus exist within the vibrissae bulge? The latter represents a richly vascularized and innervated protuberance containing an unusually high density of Merkel cells. In response to contact, the vibrissae follicle vibrates and transduces sensory signals to efferent nerve terminals (Hartmann *et al.*, 2003). Given that the transmission efficiency of a vibration is a function of the stiffness and the density of the medium through which it travels, the extensively developed IF apparatus characteristic of Bs1 cells could provide the rigidity needed to optimize the mechanical (and chemical) coupling between hair shaft, Merkel cells, and the sensory neurons surrounding the bulge. Alternatively, or in addition, the Bs1 population could serve to protect the perhaps more primitive SCs located in the outermost Bb compartment of the bulge. There is a similar sensory specialization in human interfollicular epidermis, known as *haarscheiben*, in which Merkel cells not only occur at high density but also are intermixed with K17-expressing keratinocytes (Moll *et al.*, 1993). As healthy interfollicular epidermis does not express K17 (McGowan and Coulombe, 1998b; McGowan and Coulombe, 2000; Troyanovsky *et al.*, 1989), this may add to the evidence supporting a special role for K17 in such mechanotransduction settings.

K17 expression also occurs in many contexts where epithelial cells are recruited for the purpose of epithelialization, whether it is the downgrowth of embryonic epithelial placodes to form epithelial appendages (McGowan and Coulombe, 1998b), the convergence of periderm cells to form temporary epithelial fusions (Mazzalupo *et al.*, 2003), or the wound repair response in both the embryonic and adult settings (Mazzalupo *et al.*, 2003; McGowan and Coulombe, 1998a; Paladini *et al.*, 1996). From a cellular viscoelasticity standpoint, a distinct type of keratin filament network is required to optimize migration of keratinocytes into a wound site (Wong and Coulombe, 2003; see also Beil *et al.*, 2003). Thus, it could be that the presence of K17 in Bs1 cells of the bulge contributes to preparing them for downward migration towards the hair bulb (Oshima *et al.*, 2001).

Finally, our findings suggest an explanation for the difference in the penetrance of the K17 null phenotype in vibrissae vs. pelage hair follicles. Our previous work provided strong correlative evidence that both the strain-dependence and reversibility of the pelage phenotype are due to a compensatory induction in K16, to which K17 is highly related in primary structure (McGowan *et al.*, 2002). Here, we found that K16 expression is not induced in the Bs1 (and Bb) compartments of the K17 null hair bulge. Whereas K16 levels appear to go up in the innermost layers of the bulge (i.e., the Bs2 compartment) and in the ORS tissue below it, this may not suffice to protect the K17 null vibrissae follicles against trauma-induced epithelial cell lysis. Because we could not find evidence of excessive or ectopic apoptosis in vibrissae follicles (data not shown; see McGowan *et al.*, 2002), we surmise that cell fragility represents the primary cause underlying the vibrissae phenotype in K17 null mice.

Acknowledgments

We are grateful to the members of the LOEX laboratory particularly to Israël Martel and Anne-Marie Moisan for their technical support. We also thank E. Fuchs (Rockefeller University, New-York) and N. Marceau (Centre de recherche Hôtel-Dieu-de-Québec) for providing the anti-K14 antibodies and Aristide Pusterla, Hélène Chamberland and Richard Janvier (Service de Microscopie et d'Histologie de l'Université Laval) for the processing of the electron microscopy samples. This work was supported by the Canadian Institutes of

Health Research (CIHR) and grant AR44232 from the National Institute of Arthritis, Musculoskeletal and Skin Diseases (NIAMS) in the USA. D. Larouche is recipient of scholarships from the CIHR. L. Germain is the holder of a Canadian research chair on SCs and tissue engineering and was the recipient of scholarships from the CIHR and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

References

- Albers, K. M., Davis, F. E., Perrone, T. N., Lee, E. Y., Liu, Y. and Vore, M. (1995). Expression of an epidermal keratin protein in liver of transgenic mice causes structural and functional abnormalities. *J Cell Biol* 128, 157-69.
- Beil, M., Micoulet, A., von Wichert, G., Paschke, S., Walther, P., Omary, M. B., Van Veldhoven, P. P., Gern, U., Wolff-Hieber, E., Eggermann, J. *et al.* (2003). Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and visco-elastic properties of human cancer cells. *Nat Cell Biol* 5, 803-11.
- Bernot, K. M., Coulombe, P. A. and McGowan, K. M. (2002). Keratin 16 expression defines a subset of epithelial cells during skin morphogenesis and the hair cycle. *J Invest Dermatol* 119, 1137-49.
- Bickenbach, J. R. and Chism, E. (1998). Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture. *Exp Cell Res* 244, 184-95.
- Bickenbach, J. R., McCutcheon, J. and Mackenzie, I. C. (1986). Rate of loss of tritiated thymidine label in basal cells in mouse epithelial tissues. *Cell Tissue Kinet* 19, 325-33.
- Blanpain, C., Lowry, W. E., Geoghegan, A., Polak, L. and Fuchs, E. (2004). Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 118, 635-48.
- Blessing, M., Ruther, U. and Franke, W. W. (1993). Ectopic synthesis of epidermal cytokeratins in pancreatic islet cells of transgenic mice interferes with cytoskeletal order and insulin production. *J Cell Biol* 120, 743-55.
- Bousquet, O., Ma, L., Yamada, S., Gu, C., Idei, T., Takahashi, K., Wirtz, D. and Coulombe, P. A. (2001). The nonhelical tail domain of keratin 14 promotes filament bundling and enhances the mechanical properties of keratin intermediate filaments *in vitro*. *J Cell Biol* 155, 747-54.

Byrne, C., Tainsky, M. and Fuchs, E. (1994). Programming gene expression in developing epidermis. *Development* 120, 2369-83.

Cotsarelis, G., Sun, T. T. and Lavker, R. M. (1990). Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61, 1329-37.

Coulombe, P. A., Bousquet, O., Ma, L., Yamada, S. and Wirtz, D. (2000). The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization. *Trends Cell Biol* 10, 420-8.

Coulombe, P. A., Ma, L., Yamada, S. and Wawersik, M. (2001). Intermediate filaments at a glance. *J Cell Sci* 114, 4345-7.

Coulombe, P. A., Tong, X., Mazzalupo, S., Wang, Z. and Wong, P. (2004). Great promises yet to be fulfilled: defining keratin intermediate filament function in vivo. *Eur J Cell Biol* 83, 735-46.

Ebara, S., Kumamoto, K., Matsuura, T., Mazurkiewicz, J. E. and Rice, F. L. (2002). Similarities and differences in the innervation of mystacial vibrissal follicle-sinus complexes in the rat and cat: a confocal microscopic study. *J Comp Neurol* 449, 103-19.

Fradette, J., Germain, L., Seshaiyah, P. and Coulombe, P. A. (1998). The type I keratin 19 possesses distinct and context-dependent assembly properties. *J Biol Chem* 273, 35176-84.

Fradette, J., Godbout, M. J., Michel, M. and Germain, L. (1995). Localization of Merkel cells at hairless and hairy human skin sites using keratin 18. *Biochem Cell Biol* 73, 635-9.

Fradette, J., Larouche, D., Fugere, C., Guignard, R., Beauparlant, A., Couture, V., Caouette-Laberge, L., Roy, A. and Germain, L. (2003). Normal human Merkel cells are present in epidermal cell populations isolated and cultured from glabrous and hairy skin sites. *J Invest Dermatol* 120, 313-7.

- Fuchs, E. (1995). Keratins and the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 123-53.
- Ghazizadeh, S. and Taichman, L. B. (2001). Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *Embo J* 20, 1215-22.
- Hartmann, M. J., Johnson, N. J., Towal, R. B. and Assad, C. (2003). Mechanical characteristics of rat vibrissae: resonant frequencies and damping in isolated whiskers and in the awake behaving animal. *J Neurosci* 23, 6510-9.
- Heid, H. W., Moll, I. and Franke, W. W. (1988a). Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. I. Human and bovine hair follicles. *Differentiation* 37, 137-57.
- Heid, H. W., Moll, I. and Franke, W. W. (1988b). Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. II. Concomitant and mutually exclusive synthesis of trichocytic and epithelial cytokeratins in diverse human and bovine tissues (hair follicle, nail bed and matrix, lingual papilla, thymic reticulum). *Differentiation* 37, 215-30.
- Hesse, M., Franz, T., Tamai, Y., Taketo, M. M. and Magin, T. M. (2000). Targeted deletion of keratins 18 and 19 leads to trophoblast fragility and early embryonic lethality. *Embo J* 19, 5060-70.
- Hesse, M., Magin, T. M. and Weber, K. (2001). Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci* 114, 2569-75.
- Hutton, E., Paladini, R. D., Yu, Q.-C., Yen, M. and Coulombe, P. A. (1998). Functional differences between keratins of stratified and simple epithelia. *Journal of Cell Biology* 143, 487-499.

Ibrahim, L. and Wright, E. (1975). The growth of rats and mice vibrissae under normal and some abnormal conditions. *Journal of embryology and experimental morphology*. 33, 831-844.

Ito, M., Kizawa, K., Hamada, K. and Cotsarelis, G. (2004). Hair follicle stem cells in the lower bulge form the secondary germ, a biochemically distinct but functionally equivalent progenitor cell population, at the termination of catagen. *Differentiation* 72, 548-57.

Jones, P. H., Harper, S. and Watt, F. M. (1995). Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* 80, 83-93.

Kobayashi, K., Rochat, A. and Barrandon, Y. (1993). Segregation of colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. *Proceeding of National Academy of Science USA*, 7391-7395.

Kopan, R., Lee, J., Lin, M. H., Syder, A. J., Kesterson, J., Crutchfield, N., Li, C. R., Wu, W., Books, J. and Gordon, J. I. (2002). Genetic mosaic analysis indicates that the bulb region of coat hair follicles contains a resident population of several active multipotent epithelial lineage progenitors. *Dev Biol* 242, 44-57.

Laplante, A. F., Germain, L., Auger, F. A. and Moulin, V. (2001). Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *Faseb J* 15, 2377-89.

Larouche, D., Hayward, C., Cuffley, K. and Germain, L. (2004). Keratin 19 as a stem cell marker in vivo and *in vitro*. In *Methods Mol Biol*, vol. 289, pp. 103-10.

Liu, Y., Lyle, S., Yang, Z. and Cotsarelis, G. (2003). Keratin 15 promoter targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge. *J Invest Dermatol* 121, 963-8.

Lloyd, C., Yu, Q.-C., Cheng, J., Turksen, K., Degenstein, L., Hutton, E. and Fuchs, E. (1995). The basal keratin network of stratified squamous epithelia: Defining k15 function in the absence of K14. *Journal of Cell Biology* 129, 1329-1344.

Lyle, S., Christofidou-Solomidou, M., Liu, Y., Elder, D. E., Albelda, S. and Cotsarelis, G. (1998). The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 21), 3179-88.

Lynch, M. H., O'Guin, W. M., Hardy, C., Mak, L. and Sun, T. T. (1986). Acidic and basic hair/nail ("hard") keratins: their colocalization in upper cortical and cuticle cells of the human hair follicle and their relationship to "soft" keratins. *J Cell Biol* 103, 2593-606.

Mazzalupo, S., Wong, P., Martin, P. and Coulombe, P. A. (2003). Role for keratins 6 and 17 during wound closure in embryonic mouse skin. *Dev Dyn* 226, 356-65.

McGowan, K. and Coulombe, P. A. (1998a). The wound repair-associated keratins 6, 16, and 17. Insights into the role of intermediate filaments in specifying keratinocyte cytoarchitecture. *Subcell Biochem* 31, 173-204.

McGowan, K. M. and Coulombe, P. A. (1998b). Onset of keratin 17 expression coincides with the definition of major epithelial lineages during skin development. *J Cell Biol* 143, 469-86.

McGowan, K. M. and Coulombe, P. A. (2000). Keratin 17 expression in the hard epithelial context of the hair and nail, and its relevance for the pachyonychia congenita phenotype. *J Invest Dermatol* 114, 1101-7.

McGowan, K. M., Tong, X., Colucci-Guyon, E., Langa, F., Babinet, C. and Coulombe, P. A. (2002). Keratin 17 null mice exhibit age- and strain-dependent alopecia. *Genes Dev* 16, 1412-22.

Michel, M., L'Heureux, N., Pouliot, R., Xu, W., Auger, F. A. and Germain, L. (1999). Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In vitro Cell Dev Biol Anim* 35, 318-26.

Michel, M., Torok, N., Godbout, M. J., Lussier, M., Gaudreau, P., Royal, A. and Germain, L. (1996). Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and *in*

vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci* 109 (Pt 5), 1017-28.

Moll, I., Troyanovsky, S. M. and Moll, R. (1993). Special program of differentiation expressed in keratinocytes of human haarscheiben: an analysis of individual cytokeratin polypeptides. *J Invest Dermatol* 100, 69-76.

Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. and Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31, 11-24.

Moll, R., Moll, I. and Franke, W. W. (1984). Identification of Merkel cells in human skin by specific cytokeratin antibodies: changes of cell density and distribution in fetal and adult plantar epidermis. *Differentiation* 28, 136-54.

Morris, R. J., Liu, Y., Marles, L., Yang, Z., Trempus, C., Li, S., Lin, J. S., Sawicki, J. A. and Cotsarelis, G. (2004). Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol* 22, 411-7.

Morris, R. J. and Potten, C. S. (1999). Highly persistent label-retaining cells in the hair follicles of mice and their fate following induction of anagen. *J Invest Dermatol* 112, 470-5.

Nelson, W. G. and Sun, T. T. (1983). The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *J Cell Biol* 97, 244-51.

Oshima, H., Rochat, A., Kedzia, C., Kobayashi, K. and Barrandon, Y. (2001). Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* 104, 233-45.

Paladini, R. D. and Coulombe, P. A. (1998). Directed expression of keratin 16 to the progenitor basal cells of transgenic mouse skin delays skin maturation. *J Cell Biol* 142, 1035-51.

Paladini, R. D. and Coulombe, P. A. (1999). The functional diversity of epidermal keratins revealed by the partial rescue of the keratin 14 null phenotype by keratin 16. *J Cell Biol* 146, 1185-201.

Paladini, R. D., Takahashi, K., Bravo, N. S. and Coulombe, P. A. (1996). Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol* 132, 381-97.

Porter, R. M., Lunny, D. P., Ogden, P. H., Morley, S. M., McLean, W. H., Evans, A., Harrison, D. L., Rugg, E. L. and Lane, E. B. (2000). K15 expression implies lateral differentiation within stratified epithelial basal cells. *Lab Invest* 80, 1701-10.

Pouliot, R., Larouche, D., Auger, F. A., Juhasz, J., Xu, W., Li, H. and Germain, L. (2002). Reconstructed human skin produced *in vitro* and grafted on athymic mice. *Transplantation* 73, 1751-7.

Royal, I., Grenier, A., Mailhot, D. and Marceau, N. (1995). Polyomavirus middle T selective action on cytokeratin 14 gene expression in liver nonparenchymal epithelial cells. *Exp Cell Res* 220, 171-7.

Santos, M., Paramio, J. M., Bravo, A., Ramirez, A. and Jorcano, J. L. (2002). The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis. *J Biol Chem* 277, 19122-30.

Stark, H. J., Breitkreutz, D., Limat, A., Bowden, P. and Fusenig, N. E. (1987). Keratins of the human hair follicle: "hyperproliferative" keratins consistently expressed in outer root sheath cells *in vivo* and *in vitro*. *Differentiation* 35, 236-48.

Stoler, A., Kopan, R., Duvic, M. and Fuchs, E. (1988). Use of monospecific antisera and cRNA probes to localize the major changes in keratin expression during normal and abnormal epidermal differentiation. *J Cell Biol* 107, 427-46.

Takahashi, K., Folmer, J. and Coulombe, P. A. (1994). Increased expression of keratin 16 causes anomalies in cytoarchitecture and keratinization in transgenic mouse skin. *J Cell Biol* 127, 505-20.

Tani, H., Morris, R. J. and Kaur, P. (2000). Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10960-5.

Taylor, G., Lehrer, M. S., Jensen, P. J., Sun, T. T. and Lavker, R. M. (2000). Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102, 451-61.

Tong, X. and Coulombe, P. A. (2004). A novel mouse type I intermediate filament gene, keratin 17n (K17n), exhibits preferred expression in nail tissue. *J Invest Dermatol* 122, 965-70.

Troyanovsky, S. M., Guelstein, V. I., Tchipyshcheva, T. A., Krutovskikh, V. A. and Bannikov, G. A. (1989). Patterns of expression of keratin 17 in human epithelia: dependency on cell position. *J Cell Sci* 93 (Pt 3), 419-26.

Tumbar, T., Guasch, G., Greco, V., Blanpain, C., Lowry, W. E., Rendl, M. and Fuchs, E. (2004). Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 303, 359-63.

Wang, Z., Wong, P., Langbein, L., Schweizer, J. and Coulombe, P. A. (2003). Type II epithelial keratin 6hf (K6hf) is expressed in the companion layer, matrix, and medulla in anagen-stage hair follicles. *J Invest Dermatol* 121, 1276-82.

Watt, F. M. (2002). Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *Embo J* 21, 3919-26.

Whitbread, L. A. and Powell, B. C. (1998). Expression of the intermediate filament keratin gene, K15, in the basal cell layers of epithelia and the hair follicle. *Exp Cell Res* 244, 448-59.

Wong, P. and Coulombe, P. A. (2003). Loss of keratin 6 (K6) proteins reveals a function for intermediate filaments during wound repair. *J Cell Biol* 163, 327-37.

Young, R. and Oliver, R. (1976). Morphological changes associated with the growth cycle of vibrissal follicles in the rat. *Journal of embryology and experimental morphology* 36, 597-607.

Chapitre V Discussion générale et conclusion

L'utilisation des cellules souches à des fins thérapeutiques soulève de nombreux espoirs. Les progrès dans le domaine de la biotechnologie ont permis de développer des outils puissants qui permettent aujourd'hui, d'isoler plusieurs types de cellules souches, de favoriser leur multiplication *in vitro* et d'induire leur différenciation en divers types cellulaires. En 1998, Thomson et son équipe ont ouvert la porte à la thérapie cellulaire par les cellules embryonnaires souches (ES) en parvenant à extraire et à cultiver des cellules pluripotentes d'embryons humains (Thomson *et al.*, 1998). Cette percée était importante, mais a également ranimé tout le débat éthique portant sur le clonage, la production et la manipulation d'embryons humains. Concomitamment, d'autres travaux de recherche se sont tournés vers l'étude des cellules souches des tissus adultes tels la moelle osseuse, le muscle, le sang, le foie, l'intestin, la peau, le poil ou encore la cornée. L'utilisation des cellules souches adultes à des fins thérapeutiques offre l'avantage de contourner les problèmes éthiques associés à l'utilisation d'embryons humains pour y prélever des cellules souches.

Depuis 1985, l'équipe de recherche du LOEX tire profit du remarquable potentiel de régénération des cellules souches de la peau, pour fabriquer, à partir d'une petite biopsie

cutanée, des épithélia de remplacement pour le traitement des brûlures sévères (Green *et al.*, 1979). La récente découverte de précurseurs capables d'acquérir des caractéristiques de certaines cellules spécialisées du mésenchyme et du neuroectoderme *in vitro* dans le derme humain (Fernandes *et al.*, 2004; Toma *et al.*, 2001; Toma *et al.*, 2005), a fait de la peau un organe encore plus intéressant pour le prélèvement de cellules souches chez l'adulte. Étant donné que le follicule pileux est le principal réservoir des cellules souches épithéliales cutanées (Oshima *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2000; Tumber *et al.*, 2004), il importe de poursuivre les études sur ce tégument en tant que source de cellules souches.

Un modèle unique de peau reconstruite humaine pour le traitement des blessures cutanées profondes

Même si les épithélia fabriqués *in vitro* permettent de rétablir la fonction barrière de la peau lorsqu'ils sont greffés, ces minces feuillets sont fragiles aux manipulations car ils n'ont pas de tissu de soutien. En effet, la résistance du tissu cutané est conférée principalement par les fibres de collagène sécrétées par les fibroblastes du derme. Pour pallier ce manque, différents modèles de substituts cutanés dermo-épidermiques furent proposés dans la littérature scientifique (Auger *et al.*, 1995; Berthod *et al.*, 1993; Bell, 1981 #9; Damour, 1994 #378; Michel *et al.*, 1999; Trent et Kirsner, 1998). Notamment, les modèles utilisant un gel de collagène bovin colonisé par des fibroblastes et sur lequel des kératinocytes sontensemencés (Bell *et al.*, 1979; Bell *et al.*, 1981; Germain et Auger, 1995; Michel *et al.*, 1997). Il y a aussi les modèles composés d'une matrice dermique se présentant sous forme d'une éponge ou d'un treillis (Auger *et al.*, 1995; Berthod *et al.*, 1993; Boyce et Hansbrough, 1988; Boyce *et al.*, 1993; Burke *et al.*, 1981; Damour *et al.*, 1994; Hansbrough *et al.*, 1993; Mansbridge *et al.*, 1998; Naughton *et al.*, 1997; Purdue, 1997; Purdue *et al.*, 1997; Yannas *et al.*, 1982; Yannas *et al.*, 1989). Cependant, l'utilisation de tels substituts cutanés, pour la plupart élaborés à partir de cellules allogéniques et de collagène d'origine bovine, à des fins de greffe soulève des craintes sur leur compatibilité avec l'organisme receveur.

Afin de résoudre ces problèmes, nous avons mis au point un substitut cutané assemblé exclusivement à partir de kératinocytes et de fibroblastes dermiques humains, rendant ainsi possible la reconstruction d'une peau autologue à partir d'une petite biopsie

cutanée prélevée chez un patient. L'avantage de cette peau reconstruite est qu'elle est composée de cellules vivantes qui vont maintenir l'homéostasie du tissu après sa greffe et qui vont peut-être permettre une meilleure qualité de guérison. Ainsi, ce modèle pourrait être utilisé pour recouvrir des sites où le derme est détruit sur sa pleine épaisseur.

La fabrication de notre modèle de peau reconstruite repose sur la capacité des cellules à s'auto-assembler en un tissu tridimensionnel lorsqu'elles sont en présence des conditions appropriées (Auger *et al.*, 2000; Auger *et al.*, 2002; L'Heureux *et al.*, 1998; Michel *et al.*, 1999). Ainsi, pour permettre aux fibroblastes humains de reconstruire un environnement matriciel similaire à celui du derme humain, nous les avons cultivés en présence d'acide ascorbique. En effet, cette molécule, communément appelée vitamine C, augmente la synthèse du pro-collagène et est un co-facteur de deux enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles du pro-collagène (Geesin *et al.*, 1988; Geesin *et al.*, 1993; Lamandé et Bateman, 1993). Ces enzymes, la prolyl-hydroxylase et la lysyl-hydroxylase, ajoutent des groupements hydroxyls sur les résidus proline et lysine respectivement dans la molécule de pro-collagène. Ces modifications post-transcriptionnelles permettent la stabilisation de la triple-hélice de collagène grâce à la création de ponts hydrogènes entre ses chaînes (Yoshikawa *et al.*, 2001).

Pour chaque substitut cutané créé en laboratoire, il est nécessaire de s'assurer que l'homéostasie des cellules formant le tissu sera normale une fois que ce dernier sera transplanté. En effet, l'environnement dans lequel se trouvent les cellules souches participe à leur contrôle. Si ce contrôle est défectueux, il peut être à l'origine du processus tumoral (DasGupta *et al.*, 2002; Gat *et al.*, 1998; Lo Celso *et al.*, 2004; Niemann *et al.*, 2002; Niemann *et al.*, 2003). Dans le but d'étudier l'évolution *in vivo* de notre modèle de peau reconstruite, nous l'avons transplanté sur la souris athymique. Afin d'optimiser la réussite des greffes, nous avons utilisé un outil appelé chambre de Fusenig (Worst *et al.*, 1974). Il s'agit d'un anneau de silicone qui permet de créer un espace pour déposer le greffon sur le muscle de la souris afin que celui-ci ne soit pas en contact avec la peau de l'animal lors des premiers jours de sa maturation (Worst *et al.*, 1974). Grâce à cette méthode de greffe, nos peaux reconstruites humaines n'ont pas été remplacées par la peau de l'animal, ce qui a

permis leur maintien à long terme. Par ailleurs, aucune tumeur ne fut constatée sur les coupes histologiques des peaux reconstruites prélevées après plus de six mois de greffe, suggérant une régulation appropriée de l'homéostasie cellulaire à l'intérieur des peaux reconstruites.

L'apparence macroscopique de la peau reconstruite par auto-assemblage est très similaire à la peau humaine. À maturation, elle présente un épiderme cornifié d'aspect blanchâtre et opaque. Cependant, elle n'est pas pigmentée puisqu'elle ne comprend pas de mélanocytes, les cellules qui confèrent à la peau sa couleur. Des mélanocytes étaient présents dans les peaux reconstruites utilisant des cellules cutanées de souris au pelage agouti présentées au Chapitre III. En effet, l'épiderme ou les poils des greffons étaient pigmentés, témoignant ainsi un transfert de pigment entre les mélanocytes et les kératinocytes. Puisqu'il est possible d'extraire et de co-cultiver des mélanocytes avec des kératinocytes humains (Regnier *et al.*, 1999 et observations personnelles), les conditions de culture des peaux reconstruites humaines pourraient être ajustés afin d'y augmenter leur nombre. Une peau reconstruite à partir des cellules humaines comprenant une quantité adéquate de mélanocytes serait un outil thérapeutique intéressant pour le traitement du vitiligo, une pathologie associée à une dépigmentation régionale de la peau.

Le contact entre les cellules souches et la membrane basilaire participe au contrôle de leur homéostasie. La production des composantes qui s'assemblent pour former la membrane basilaire est le résultat d'interactions entre les cellules du derme et celles de l'épiderme (Lee et Cho, 2005; Smola *et al.*, 1998). Dans notre modèle de peau reconstruite humaine, une membrane basilaire bien structurée était présente autant *in vivo* qu'*in vitro*. Plusieurs études ont permis de constater que les contacts entre les kératinocytes et la membrane basilaire via les intégrines contrôlent l'équilibre entre la prolifération des cellules souches et leur engagement dans le processus de différenciation (Jones et Watt, 1993; Levy *et al.*, 2000; Lowell *et al.*, 2000; Watt, 2002b; Zhu *et al.*, 1999). Ainsi, la membrane basilaire de nos peaux reconstruites apporte probablement les conditions optimales pour le maintien des cellules souches basales en culture. D'ailleurs, la régénération à long terme (6 mois) de l'épiderme de nos peaux reconstruites humaines

greffées sur la souris indique une conservation des cellules souches. Des travaux complémentaires, effectués à notre laboratoire, ont permis de confirmer que les cellules positives à la K19 demeurent en contact avec la membrane basilaire dans la peau reconstruite par auto-assemblage après 21 jours de culture *in vitro* (Fugère, 2004). Afin de vérifier si les cellules souches incorporées aux peaux reconstruites cultivées présentent un cycle cellulaire long, il serait intéressant d'incorporer un analogue de base comme le BrdU au milieu de culture. Une relation entre l'expression de la K19 et un cycle cellulaire long indiquerait que les interactions tridimensionnelles créées dans la peau reconstruite par auto-assemblage forment une niche appropriée pour le maintien du phénotype souche.

Dans notre étude, deux sites donneurs de kératinocytes humains ont été comparés quant à la qualité des épidermes reconstruits: des kératinocytes isolés à partir de peau de sujets nouveau-nés et d'autres isolés à partir de peau de sujets adultes. L'analyse histologique des peaux reconstruites greffées pendant 4 jours a révélé que les épidermes formés de kératinocytes adultes étaient plus minces que ceux formés de kératinocytes de nouveau-nés. Cependant, après 21 jours de culture à l'interface air-liquide ou de greffe sur la souris, l'épaisseur des épidermes nouveau-nés et adultes était similaire. Ces observations suggèrent une certaine régulation de la balance entre la prolifération et la différenciation des cellules souches avec le temps de maturation. À cet effet, il serait intéressant d'évaluer si des fibroblastes isolés à partir d'un site anatomique défini possèdent la propriété intrinsèque de contrôler l'épaisseur de l'épiderme. Ainsi, on pourrait s'attendre à ce que l'épiderme formé sur un derme constitué de fibroblastes provenant d'une peau munie d'un épiderme très épais, comme la peau palmoplantaire, comporte plus de couches de kératinocytes que l'épiderme formé sur un derme constitué de fibroblastes provenant d'une peau munie d'un épiderme plus mince, comme la peau de l'abdomen.

Le greffon cutané idéal doit être résistant aux manipulations par les chirurgiens. De plus, il est préférable que ses caractéristiques biomécaniques soient similaires à celles de la peau native pour qu'il puisse être fonctionnel après sa transplantation. En culture, notre modèle de peau reconstruite à partir de cellules cutanées humaines était facile à manipuler. De plus, il a acquis une résistance et une souplesse remarquables lorsqu'il a été greffé sur

l'animal. Ses propriétés mécaniques étaient sans doute la conséquence de l'importante quantité de collagène et de fibres élastiques que renfermait son derme. Il serait intéressant d'approfondir nos connaissances sur les propriétés mécaniques des peaux reconstruites cultivées ou greffées en les soumettant à différents types de contraintes mécaniques. Le LOEX a fait l'acquisition d'un appareil permettant la sollicitation dynamique de tissus (Tytron™ 250). Grâce à cet appareil, des essais de traction simple et de relaxation pourraient être effectués sur la peau reconstruite afin de déterminer son module d'élasticité, sa déformation à la rupture ainsi que sa résistance ultime. Ainsi, il serait possible de s'assurer de la fonctionnalité mécanique de la peau reconstruite par auto-assemblage avant de la greffer sur un patient.

Lors de la guérison des plaies cutanées profondes, le remodelage anarchique de la portion dermique mène à la formation de cicatrices vicieuses (Raghow, 1994). Nous croyons que l'utilisation de la peau reconstruite par auto-assemblage pour le traitement des blessures cutanées affectant le derme pourrait améliorer la qualité de la cicatrisation parce qu'un environnement matriciel riche en collagène et bien organisé est déjà en place dans le tissu. Certaines techniques de culture permettent de contrôler l'organisation de l'environnement matriciel sécrété par les cellules mésenchymateuses. Par exemple, des tensions mécaniques uniaxiales induisent une orientation préférentielle des cellules mésenchymateuses ainsi qu'une réorganisation des fibres de collagène (Annexe IV). Les fibroblastes sécrètent et contractent les fibres de collagène dans le sens où ils se trouvent (Harris *et al.*, 1981; Wang *et al.*, 2003). Ainsi, en orientant les fibroblastes en culture vers une direction prédéterminée, par exemple en les soumettant à des champs électriques (Méthot *et al.*, 2001), il serait possible de définir la direction des fibres de collagène lors de la fabrication des tissus mésenchymateux. De telles reconstructions pourraient être plus résistantes à une contrainte de tension unidirectionnelle, ou encore, contracter vers un sens en particulier.

En résumé, le modèle de peau reconstruite par auto-assemblage permet d'obtenir un substitut cutané présentant d'excellentes qualités macroscopiques, histologiques et biomécaniques. De plus, il démontre une excellente guérison après la greffe sur l'animal.

Puisque cette technique peut être appliquée à la fabrication de tissus autologues, son utilisation pour la chirurgie reconstructive des blessures cutanées affectant le derme sur sa pleine épaisseur est envisageable.

La mise au point d'une peau reconstruite permettant d'étudier la différenciation des cellules souches en follicule pileux

Plusieurs maladies associées au follicule pileux sont mal comprises et par conséquent, mal contrôlées. En effet, malgré la recherche intensive sur cet organe, et la panoplie de modèles expérimentaux proposés dans la littérature (les différents modèles de culture des follicules pileux sont passés en revue par Randall *et al.*, 2003), les mécanismes qui régissent sa formation et son homéostasie sont peu compris.

Les modèles expérimentaux visant à étudier les follicules pileux *in vitro* sont variés. Ils passent par la culture bidimensionnelle (monocouche) des différents types cellulaires retrouvés dans le follicule pileux, à la culture de poils isolés insérés ou non dans un environnement matriciel (Buhl *et al.*, 1989; Jahoda *et al.*, 1984; Kobayashi *et al.*, 1993; Limat *et al.*, 1993; McElwee *et al.*, 2003; Messenger *et al.*, 1991; Michel *et al.*, 1999; Oshima *et al.*, 2001; Philpott *et al.*, 1990; Philpott *et al.*, 1992; Philpott *et al.*, 1995; Philpott *et al.*, 1996; Reynolds *et al.*, 1999; Rochat *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 1994). Cependant, aucun système *in vitro* n'a mené à la formation d'annexes cutanées à partir de cellules souches en culture. De précédents travaux, effectués dans notre laboratoire, ont permis de constater que les cheveux humains s'intègrent et survivent dans la peau reconstruite par auto-assemblage (Michel *et al.*, 1999). Ainsi, il serait envisageable de reconstruire des peaux à partir des kératinocytes et des fibroblastes cutanés d'un patient, et d'y insérer des cheveux prélevés sur une région velue de façon similaire à la micro-greffe capillaire effectuée pour le traitement de l'alopecie. Ce genre de greffon pourrait être utilisé pour traiter des blessures profondes au scalp. Cependant, à cause du risque que des tumeurs se développent au sein des tissus reconstruits, il est nécessaire de s'assurer que la différenciation des cellules souches des poils y est bien contrôlée.

La technique qui consiste à isoler les cheveux à partir d'une biopsie de scalp humain et de les réinsérer dans les peaux reconstruites par auto-assemblage, est fastidieuse et

nécessite que de nombreux poils soient disponibles (Michel *et al.*, 1999). Nous avons donc adapté le modèle présenté au Chapitre II à la culture de cellules cutanées prélevées chez la souris, de façon à recréer les interactions permettant la différenciation des cellules souches en follicules pileux. Ainsi, après un mois de maturation sur la souris athymique, des appareils pilo-sébacés complets se sont développés dans les peaux reconstruites à partir de follicules pileux immatures (FPI) et de fibroblastes provenant de la peau de souriceaux nouveau-nés. De plus, des cellules de Merkel ont été identifiées en périphérie de la gaine folliculaire externe (*ORS*) des follicules pileux, qui étaient par ailleurs entourés de neurones (François Berthod et Vicky Gagnon, communication personnelle), suggérant que les follicules pileux étaient fonctionnels pour la détection de stimuli tactiles. Les poils et l'épiderme se sont maintenus à long terme sur l'animal (6 mois) et aucune tumeur ne s'est développée, nous indiquant que la régulation des cellules souches y était adéquate. Ces résultats révèlent qu'il est possible de recréer, par génie tissulaire, un environnement *in vitro* dans lequel les cellules souches du poil conservent leur potentiel de générer l'épiderme, les glandes sébacées et les follicules pileux.

Le derme : une influence déterminante sur la différenciation des cellules souches

Deux sortes de fibroblastes ont été comparés quant à leur influence sur la différenciation des cellules souches au sein des reconstructions tissulaires : des fibroblastes de peau mammaire humaine ainsi que des fibroblastes de peau de souriceaux nouveau-nés. La maturation *in vivo* des peaux reconstruites a révélé l'influence déterminante du type de fibroblastes utilisés pour la reconstruction des dermes, sur la différenciation des cellules souches contenues dans les FPIs. En effet, des follicules pileux complets se sont développés dans les peaux reconstruites comprenant des fibroblastes dermiques de souriceaux nouveau-nés tandis qu'aucun poil de structure normale n'a été observé dans les peaux reconstruites constituées de fibroblastes dermiques humains. Ce résultat est surprenant car les FPIs possèdent en eux-mêmes tout ce qui est nécessaire pour reformer les follicules pileux lorsqu'ils sont greffés directement sur le muscle de la souris athymique (Weinberg *et al.*, 1993). Nos observations nous ont mené à croire que le derme reconstruit humain forme un environnement qui bloque la différenciation des cellules souches en follicules pileux.

La caractérisation plus poussée des propriétés histologiques des peaux reconstruites greffées pendant 1,5 mois a révélé la présence de structures anormales dans le derme des peaux reconstruites comprenant des FPIs et des fibroblastes humains. Ces structures, ou kystes, présentaient plusieurs caractéristiques histologiques et protéines de l'épiderme. La formation de ces kystes reflète probablement un changement du programme de différenciation des cellules souches des FPIs vers la voie de différenciation épidermique.

Il est possible que les messages morphogénétiques des fibroblastes humains et des cellules épithéliales murines soient trop différents pour orchestrer les interactions mésenchyme-épithéliales nécessaires à la maturation des FPIs en poils. Cependant, ceci est peu probable, car en 2001, l'équipe de Jahoda a montré que les fibroblastes de papilles folliculaires de cheveux humains sont capables d'induire la formation d'un follicule pileux *de novo* lorsqu'ils sont combinés avec un épiderme de souris (Jahoda *et al.*, 2001). De plus, l'équipe qui a mis au point la technique d'extraction des FPIs que nous avons utilisé a montré que les contacts entre les kératinocytes et les fibroblastes de la papille folliculaire ne sont pas défaits dans les FPIs (Weinberg *et al.*, 1993). La présence de kystes à caractère épidermique dans les peaux reconstruites constituées de FPIs et de fibroblastes humains, suggère que l'environnement matriciel et cellulaire dans lequel se trouvent les cellules souches des FPIs a un impact sur leur différenciation.

La culture à l'interface air-liquide des peaux reconstruites contenant des FPIs n'a pas permis la formation de poils matures. Toutefois, des kystes se sont développés à partir des FPIs. De façon intéressante, les caractéristiques histologiques des kystes étaient spécifiques au type de fibroblastes utilisés pour la fabrication des peaux reconstruites; en contact avec un derme reconstruit humain, les kystes présentaient des caractéristiques histologiques de l'épiderme tandis qu'en contact avec un derme reconstruit murin, les kystes présentaient des caractéristiques histologiques associées à l'*ORS*. D'ailleurs, ces derniers ressemblaient à des follicule pileux en coupe transversale sans gaine folliculaire interne (*IRS*) et sans tige. De façon intéressante, cette structure ressemble beaucoup à celle des poils anormaux observés par l'équipe de Kobiela dans la peau des souris ayant subi une mutation génique empêchant la formation de l'*IRS* et de la tige des poils (Kobiela *et*

al., 2003). Mentionnons également que le facteur de transcription Lef1, qu'on retrouve dans le noyau des cellules de la matrice des poils (DasGupta et Fuchs, 1999; Kaufman *et al.*, 2003; Merrill *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 1995) et qui participe au contrôle de la différenciation de l'IRS et de la tige (Kobielak *et al.*, 2003), n'a pas été détecté au sein des kératinocytes de nos peaux reconstruites cultivées. Ces résultats suggèrent que la différenciation des kératinocytes des FPIs en cellules de l'IRS et de la tige n'a pas été permise dans ce contexte de culture, vraisemblablement en raison d'une interruption de la voie Wnt.

Autant *in vivo* qu'*in vitro*, nos résultats révèlent que les dermes reconstruits avec des fibroblastes adultes humains fournissent un environnement qui avantage la différenciation épidermique aux dépens de la différenciation folliculaire. L'activation de la voie de signalisation Wnt est nécessaire à la transcription des gènes de la différenciation folliculaire (Alonso et Fuchs, 2003; DasGupta et Fuchs, 1999; Huelsken *et al.*, 2001; Kaufman *et al.*, 2003; Kobielak *et al.*, 2003; Merrill *et al.*, 2001; Schlake *et al.*, 2000; van Genderen *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1995). De plus, Huelsken et son équipe ont montré que lorsque le gène de la β -caténine est invalidé dans les kératinocytes de la peau de souris adultes, les cellules souches du poil adoptent un destin de différenciation épidermique (Huelsken *et al.*, 2001). Par ailleurs, nous n'avons pas identifié la β -caténine dans le noyau des kératinocytes formant les kystes dérivés des FPIs lorsque ces derniers étaient incorporés dans les dermes reconstruits humains et ce, autant *in vivo* qu'*in vitro*. L'environnement matriciel reconstruit à partir de fibroblastes adultes humains semble donc interférer avec la voie de signalisation Wnt. Pour évaluer cette hypothèse, il serait intéressant d'avoir recours au gène TOPflash qui peut être transféré à l'aide de plasmides à l'intérieur de kératinocytes en culture (Zhu et Watt, 1999). Le gène TOPflash contient plusieurs sites liant les membres de la famille Lef1/Tcf en aval d'un promoteur qui contrôle l'expression du gène de la luciférase, une enzyme qui émet de la lumière (van de Wetering *et al.*, 1997). Quand la β -caténine est présente au noyau, avec un des membres de la famille Lef1/Tcf, elle permet l'activation de la transcription du transgène. Cette construction permet ainsi d'analyser le niveau d'activation de la voie Wnt dans les cellules qui la contiennent en quantifiant la lumière qu'elles émettent. Après transfection du gène

TOPflash dans les kératinocytes utilisés pour la fabrication des peaux reconstruites, nous pourrions ainsi évaluer le niveau d'activation de la voie Wnt à l'intérieur de celles-ci par luminométrie.

Même s'il est clair que les dermes reconstruits à partir des fibroblastes humains n'ont pas permis la croissance des FPIs dans les conditions que nous avons expérimentées, le ou les facteurs responsables de ce phénomène sont inconnus. Pour évaluer si la propriété qu'ont les fibroblastes de créer des conditions propices à la différenciation des follicules pileux varie en fonction de l'âge de l'animal donneur, il serait pertinent de cultiver des FPIs sur des dermes reconstruits à partir de fibroblastes dermiques de souris adultes, ou encore à partir de fibroblastes dermiques de sujets humains jeunes, et de greffer les peaux obtenues sur la souris athymique.

Il est possible que le ou les événements ayant affecté le programme de différenciation des cellules souches des FPIs en follicule pileux aient eu lieu lors de la période de culture qui a précédé la greffe des peaux reconstruites. Pour vérifier cette hypothèse, des peaux reconstruites humaines, comprenant derme et épiderme, pourraient être greffées sur l'animal d'abord et par la suite des follicules pileux y seraient insérés. Une telle expérience permettrait d'évaluer l'évolution à long terme des follicules pileux afin de s'assurer que ces derniers démontrent une croissance cyclique normale et qu'ils ne développent pas de kystes ou de tumeurs dans les peaux reconstruites humaines.

Un aspect intéressant des différents modèles de peaux reconstruites que nous avons développés est qu'à partir des mêmes structures cellulaires, soit les FPIs, nous sommes en mesure d'induire la différenciation des cellules souches vers deux voies de différenciation distinctes. Ces modèles offrent donc l'opportunité de comparer les caractéristiques propres à chaque lignée de fibroblastes utilisée pour la reconstruction des tissus. Par exemple, des membranes enrobées d'une panoplie d'anticorps spécifiques à différents facteurs de croissance et de cytokines pourraient être utilisées afin de comparer la composition des milieux conditionnés par la culture des différentes lignées de fibroblastes. Par la suite, la technologie du *siRNA* (*small interfering RNA*) pourrait être employé pour bloquer la production d'une molécule d'intérêt. Aussi, on pourrait induire l'expression de certains

facteurs dans les fibroblastes cultivés en ayant recours à des plasmides d'expression, ou encore par transgénése. Ce genre de manipulations pourrait également être effectué sur les kératinocytes. Par la suite, les cellules modifiées seraient utilisées pour fabriquer des peaux reconstruites ce qui permettrait d'analyser les effets de certaines molécules sur la différenciation épithéliale.

En résumé, nous avons produit différents modèles de peaux reconstruites qui représentent de nouveaux outils pour comprendre la régulation de la différenciation des cellules souches de la peau. De plus, nos résultats démontrent que l'environnement tridimensionnel des kératinocytes a une influence importante sur leur différenciation.

Deux populations de cellules souches distinctes au sein de la vibrisse

Puisqu'il n'y a pas de marqueur identifiant sans équivoque les cellules souches cutanées des organismes normaux (qui n'ont pas été manipulés génétiquement), définir les propriétés intrinsèques des cellules souches *in situ* demeure un défi de taille. Dans notre étude, dont l'objectif était de mieux définir les cellules souches du follicule pileux, un poil de gros calibre fut choisi: la vibrisse. En effet, le renflement de la vibrisse forme une protubérance importante et aisément identifiable ce qui facilite l'analyse des cellules souches.

Dans notre étude, nous avons identifié les cellules souches en se basant sur leur propriété de se diviser peu souvent *in situ* (I.4.2.2.3). Ainsi, deux populations distinctes de cellules présentant un long cycle cellulaire ont été observées dans la région du renflement.

La première population de cellules souches est en contact avec la membrane basilaire qui entoure la gaine folliculaire externe (*ORS*) de la vibrisse. Nous avons appelé ces cellules *Bb* pour « *bulge basal* ». Tel qu'attendu, les cellules *Bb* expriment la K19, une kératine présente dans les cellules souches des poils humains et murins (Michel *et al.*, 1996) et les filaments de kératine forment un réseau lâche. Cependant, nous avons remarqué que la K14, généralement associée aux cellules basales des épithélia stratifiés, était complètement absente des cellules *Bb*. Cette donnée est entièrement nouvelle car il est habituellement considéré que les cellules souches expriment la K14 (Arnold et Watt, 2001;

Li *et al.*, 1998; Trempus *et al.*, 2003; Tumber *et al.*, 2004). Par ailleurs, plusieurs équipes de chercheurs utilisent le promoteur de la K14 afin d'induire l'expression de constructions géniques au niveau des cellules souches (Arnold et Watt, 2001; DasGupta et Fuchs, 1999; DasGupta *et al.*, 2002; Gat *et al.*, 1998; Huelsken *et al.*, 2001; Merrill *et al.*, 2001; Waikel *et al.*, 2001). Nos résultats révèlent qu'au sein de la vibrisse, le gène de la K14 n'est pas transcrit de façon constitutive dans les cellules souches. Par conséquent, l'utilisation d'un autre promoteur que celui de la K14 serait préférable pour mener de telles études sur la vibrisse.

La deuxième population de cellules présentant un cycle cellulaire long correspond aux premières couches suprabasales de l'*ORS*. Nous avons nommé ces cellules *Bs1* pour « *bulge suprabasal 1* ». Les cellules *Bs1* présentent un réseau de kératine très dense qui est conféré par la paire de kératines K5/K17 et qui se reflète par une densité cytoplasmique plus importante au microscope à contraste de phase.

Il est surprenant que des cellules souches potentielles ne soient pas en contact avec une membrane basilaire. En effet, ceci remet en question le dogme de la nécessité des contacts avec la matrice extracellulaire pour le maintien du phénotype souche (voir section I.4.2.2.1). Concomitamment à notre découverte, l'équipe de Blanpain a publié des observations relatant la présence d'une population de cellules suprabasales quiescentes au sein du renflement des poils du pelage de la souris (Blanpain *et al.*, 2004). De plus, ils ont démontré le caractère clonogénique et la multipotentialité de ces cellules suprabasales (Blanpain *et al.*, 2004).

La présence d'un réseau de filament de kératine très dense dans les cellules souches potentielles *bs1* est intéressante. En effet, cette caractéristique remet en question un autre concept associé aux cellules souches: celui de leur aspect indifférencié qui se reflète par une faible quantité d'organites intracellulaires (y compris les filaments intermédiaires).

Pour la suite des travaux, une des prochaines étapes sera d'évaluer le caractère clonogénique des cellules *Bs1*. Pour s'y faire, nous envisageons deux stratégies.

La première stratégie consiste à disséquer le renflement des vibrisses et à dissocier les kératinocytes par digestion enzymatique. Ensuite, les cellules basales seront séparées de leurs voisines suprabasales par cytométrie de flux, à l'aide d'anticorps dirigés contre l'intégrine $\alpha 6$ qui est exprimée à leur surface (I.4.2.3). Enfin, le nombre de kératinocytes engendrant des holoclones (I.4.2.2.3) parmi les cellules basales pourra être comparé au nombre de kératinocytes engendrant des holoclones parmi les cellules suprabasales (négative à l'intégrine $\alpha 6$).

La deuxième stratégie de séparation tire profit de la densité du cytoplasme des cellules *Bs1*. En effet, le cytomètre de flux est capable de trier les cellules sur la base de leur taille (paramètre FSC) et de la granulosité de leur cytoplasme (paramètre SSC). Ainsi, après s'être assuré que les cellules présentant un paramètre SSC élevé sont négatives pour l'expression des K19 et K14, il sera possible de les séparer des autres et d'étudier leur comportement en culture.

Afin d'évaluer la capacité des cellules du renflement de la vibrisse à reconstruire un épiderme *in vitro*, nous avons cultivé des renflements de vibrisses en explant sur des dermes reconstruits humains. Cependant, les cellules basales ne furent pas préalablement séparées des cellules suprabasales lors de ces expériences. Pour démontrer que les cellules *Bs1* sont aptes à se différencier en épiderme *in vitro*, elles pourraient être dissociées des cellules basales par les techniques proposées ci-dessus et réensemencées par la suite sur les dermes reconstruits par auto-assemblage. Pour évaluer la multipotentialité de différenciation des cellules *Bs1*, il serait également pertinent de les greffer avec des fibroblastes de souriceaux nouveau-nés, une technique qui permet aux cellules souches épithéliales de donner lieu à l'épiderme ainsi qu'aux follicules pileux (Blanpain *et al.*, 2004; Tumber *et al.*, 2004).

La kératine 19: spécifique aux cellules souches basales des poils

Dans la vibrisse, comme dans les cheveux humains et les poils du pelage de la souris, l'expression de la K19 se limite aux cellules basales du renflement. Ces dernières possèdent également la K15, une autre kératine associée aux cellules souches des poils (Liu

et al., 2003; Lyle *et al.*, 1998; Lyle *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 2004; Tumber *et al.*, 2004; Whitbread et Powell, 1998). Cependant, les cellules *Bs2* ainsi que les cellules de l'*ORS* de la portion intermédiaire de la vibrisse expriment aussi la K15. Ce faisant, la K19 semble un marqueur plus spécifique aux cellules souches basales en comparaison à la K15.

Le modèle de culture des renflements de vibrisses en explant sur des dermes reconstruits par génie tissulaire nous a permis d'en apprendre d'avantage sur les propriétés fonctionnelles des cellules exprimant la K19, c'est-à-dire les cellules *Bb*, et celles exprimant la K14. Nous avons observé que c'était majoritairement les kératinocytes positifs à la K19 qui se multipliaient dans notre contexte de culture. Cependant, nous avons aussi dénoté que les kératinocytes *Bb* réexprimaient la K14 lorsqu'ils étaient en division. De façon intéressante, la présence de la K14 a aussi été détectée dans quelques cellules basales du renflement de vibrisses en pleine croissance (vibrisse de souris âgées de 12 jours, données non présentées). Ces résultats laissent croire que la K14 est absente au niveau des cellules souches quiescentes, mais qu'elle est synthétisée lorsque les cellules souches se divisent et que la différenciation s'engage. Même si nous n'avons pas observé de K14 dans les cellules basales du renflement des vibrisses adultes, il est possible que son expression apparaisse lors de la transition de la phase télogène à la phase anagène, soit lorsque les cellules souches sont induites à proliférer. Puisqu'il est possible d'initier un nouveau cycle de croissance d'une vibrisse en l'arrachant délicatement (Ibrahim et Wright, 1978), une telle méthode pourrait être utilisée afin d'analyser les kératines de la vibrisse de la souris adulte qui entame une nouvelle phase d'anagène.

Les analyses ultrastructurales que nous avons menées sur la vibrisse nous ont permis de lier la présence de la K19 à une organisation particulièrement lâche du réseau de filaments intermédiaires. En ce qui a trait aux cellules qui expriment la K14, soit les cellules *Bs2*, ainsi que celles de l'*ORS* de la portion intermédiaire de la vibrisse, le réseau de filaments intermédiaires étaient moins dense que celui des cellules *Bs1* mais leur niveau d'empaquetage était plus important que dans les cellules *Bb* positives à la K19. Une relation similaire entre l'expression des kératines 14 ou 19 et une organisation particulière du réseau de filaments intermédiaires a déjà été observée lors d'analyses ultrastructurales

menées à notre laboratoire sur des poils de scalp et des prépuces de sujets nouveau-nés (Fradette, 1999). Pour évaluer si la présence de la K14 dans un kératinocyte influence l'organisation du réseau de filaments intermédiaires, notre modèle de culture de renflement en explant sur des dermes reconstruits pourrait être utilisé. En effet, nous avons observé l'apparition graduelle de la K14 dans les cellules *Bs1* dans ce modèle. Des sections de renflements cultivés sur des dermes reconstruits pourraient être immunomarquées à l'aide d'anticorps primaires reconnaissant la K14 et d'anticorps secondaires couplés à des grains d'or, ce qui permettrait de visualiser les conséquences de l'expression de la K14 sur l'organisation des filaments de kératine des cellules *Bs1* en microscopie électronique.

Nouvelles données sur la fonction de la kératine 17

Nos travaux sur les souris déficientes en K17 ($K17^{-/-}$) nous ont permis d'établir que la K17 était nécessaire à la formation d'une vibrisse complète. La présence de la K17 semble particulièrement importante dans les cellules *Bs1*. En effet, au lieu d'être munies d'un réseau très dense de kératines, les cellules *Bs1* des souris $K17^{-/-}$ possèdent très peu de filaments intermédiaires. De plus, aucune autre kératine de type I ne semble polymériser avec la K5 pour compenser la perte de la K17. Enfin, les cellules *Bs1* des souris $K17^{-/-}$ sont visiblement plus fragiles, ce qui relève vraisemblablement de la perte du rôle structural conféré par la K17.

Le réseau de filaments intermédiaires très peu développé des cellules *Bs1* des souris déficientes en K17 soulève deux hypothèses.

La première hypothèse est que l'expression d'aucune autre kératine de type I n'est augmentée pour compenser la perte de la K17 et que sans dimère d'assemblage, la K5 se retrouve sans partenaire de polymérisation. En effet, nos analyses en immunofluorescence indirecte n'ont pas permis d'observer les kératines K14, K15, K16 ou K19 dans les cellules *Bs1* des vibrisses $K17^{-/-}$. Le faible marquage granuleux que nous avons obtenu suite à la détection de la K5 était peut-être le résultat d'une association entre la K5 et des protéines des desmosomes (Geerts *et al.*, 1999; Meng *et al.*, 1997).

La seconde hypothèse est que l'expression de la K16 est augmentée pour compenser la perte de la K17, mais les filaments formés par la paire K5/K16 ne sont pas capables d'accomplir le rôle de la paire K5/K17. Puisque nous n'avons pas détecté la K6, soit le partenaire de la K16 dans le poil (Takahashi *et al.*, 1998), dans les cellules *Bs1* des souris K17^{-/-}, il est vraisemblable de croire que la K16 a tenté de polymériser avec la K5. Étant donné que chaque complexe de kératines présente des propriétés mécaniques spécifiques (Bousquet *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2001), on peut supposer que la paire K5/K16 n'a pas les propriétés mécaniques nécessaires pour accomplir le rôle de la paire K5/K17. En conséquence, le réseau de filaments intermédiaires conférés par les kératines K5 et K16 a été endommagé, ce qui a mené à la perte de l'intégrité ultrastructurale des cellules *Bs1*. La détection de la K16 par hybridation *in situ* pourrait sans doute nous éclairer à ce sujet en nous indiquant si le gène de la K16 est transcrit dans les cellules *Bs1*. Finalement, pour en apprendre d'avantage sur la rigidité des filaments K5/K17 et K6/K17, les propriétés visco-élastiques de ces filaments assemblés *in vitro* pourraient être analysées par un rhéomètre rotatif à cône et à plateau (Bousquet *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2001).

Même si nos travaux établissent clairement l'importance de la K17 pour l'intégrité structurale de la vibrisse et des cellules *Bs1*, la portée significative de son rôle au sein de cellules souches potentielles n'est pas claire. Il a été proposé, dans une hypothèse émise par l'équipe de Pierre Coulombe en 2001, que les kératines K6, K16 et K17, dont l'expression est induite dans les kératinocytes en bordure des plaies cutanées, seraient des kératines plus appropriées pour répondre aux 2 besoins contradictoires que requiert le processus de guérison: la résistance mécanique et la plasticité du cytosquelette (Wawersik *et al.*, 2001). L'expression de la K17 au sein des cellules potentiellement souches *Bs1*, mais qui semblent toutefois exiger une résistance mécanique importante, appuie cette hypothèse. Pour évaluer si la K17 favorise une meilleure migration, des renflements disséqués de vibrisse K17^{-/-} pourraient être cultivés en explant sur des dermes reconstruits. En effet, notre tissu reconstruit dermique offre une excellente matrice de migration pour les kératinocytes (Laplante *et al.*, 2001).

Une question importante reste à résoudre: qu'est-ce qui a mené à la perte de l'intégrité des vibrisses suite à l'inactivation du gène de la K17? Une des possibilités est que la perte de la K17 a provoqué une faiblesse structurale de la vibrisse. Au sein des poils du pelage des souris K17^{-/-}, l'expression de la K16 à la place de la K17 dans les cellules de l'*ORS* réussit à compenser la perte de la K17 car dans la majorité des cas, des poils d'apparence normale sont formés (McGowan *et al.*, 2002). Toutefois, la vibrisse est sujette à des contraintes mécaniques importantes lorsqu'elle accomplit son rôle de transmission des stimuli mécaniques. Il est possible que seule la K17 puisse permettre à la vibrisse de conserver une structure assurant son intégrité.

Une autre possibilité est que la perte de la K17 dans les cellules *Bs1* a affecté leur fonction de cellules souches. En effet, l'absence de vibrisse a été dénotée dès la naissance des souris. Souvent, les problèmes structuraux associés à la perte de kératines surviennent après la naissance, soit lorsque l'épithélium affecté a subi des contraintes mécaniques (Hutton *et al.*, 1998; Magin *et al.*, 2000; McGowan *et al.*, 2002; Paladini et Coulombe, 1999; Peters *et al.*, 2001). Pour mieux comprendre le rôle des cellules *Bs1*, il serait pertinent d'analyser le profil d'expression de leurs ARNm par micropuces et de le comparer à celui des souris déficientes en K17.

Mentionnons qu'en plus des kératinocytes de l'*ORS*, la K17 est aussi exprimée par les cellules de la matrice et certains kératinocytes de la moelle des poils (McGowan et Coulombe, 1998b). L'absence de la tige de la vibrisse chez les souris K17^{-/-} est peut-être le résultat d'un défaut de différenciation des cellules de la matrice. En effet, comme les K8, K10, K16 et 18 (voir I.6.1.3.3), la K17 pourrait participer à des mécanismes de régulation cellulaire. À cet effet, il serait intéressant d'entamer des études de caractérisation des kératinocytes de l'*IRS* et la tige des vibrisses de souris K17^{-/-}.

En terminant, les nouvelles données apportées par notre étude révèlent qu'au sein de la vibrisse, il existe deux populations distinctes de cellules présentant des caractéristiques de cellules souches : les kératinocytes *Bb* exprimant la K19 et les kératinocytes *Bs1*. Il devient incontournable de redéfinir les propriétés associées aux kératinocytes situés à l'intérieur d'autres niches de cellules souches cutanées, notamment celles qui sont

retrouvées chez l'humain. En effet, nos résultats, ainsi que ceux de Blanpain (2004), suggèrent qu'il est possible de retrouver des cellules souches dans les couches suprabasales des épithélia stratifiés et qu'elles y sont en plus grande quantité que ce qui était considéré jusqu'à maintenant.

Conclusion générale

Les travaux de cette thèse nous ont permis de démontrer l'importance de l'environnement matriciel pour l'homéostasie des cellules souches dans les peaux reconstruites par génie tissulaire. De plus, ils laissent entrevoir la possibilité de reconstruire en laboratoire des peaux humaines qui permettraient la croissance des follicules pileux, ce qui apporterait plusieurs fonctions aux peaux reconstruites et améliorerait leur qualité. Puisque les souches cutanées sont conservées à l'intérieur des différents modèles de peaux reconstruites que nous avons mis au point, ces outils offrent la possibilité d'étudier les processus morphogénétiques affectant la différenciation des cellules souches. En terminant, nos travaux ont permis d'identifier une population potentielle de cellules souches présentant des particularités uniques, redéfinissant ainsi les critères d'identification des cellules souches et jettant un nouveau regard sur la façon de les percevoir.

ANNEXES

Contribution à d'autres travaux publiés

Annexe I. Normal human Merkel cells are present in epidermal cell populations isolated and cultured from glabrous and hairy skin sites

COMMUNICATION
see related Commentary on page v

Normal Human Merkel Cells are Present in Epidermal Cell Populations Isolated and Cultured from Glabrous and Hairy Skin Sites

Julie Fradette, Danielle Larouche, Claudia Fugère, Rina Guignard, Annie Beauparlant, Véronique Couture, Louise Caouette-Laberge,* Alphonse Roy,† and Lucie Germain

Laboratoire de Recherche des Grands Brûlés/LOEX and †Service de Chirurgie, Hôpital du Saint-Sacrement du CHA, Québec, Canada, Département de Chirurgie, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada, and *Service de Chirurgie, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

The Merkel cell is a highly specialized cell that primarily acts as a slowly adapting mechanoreceptor. Merkel cells are scarce in normal skin but can be identified by the expression of distinct keratin filaments. Merkel cells constitute a very unique population and many questions still remain as to their origin, number, proliferative capacity, and functions in cutaneous biology. The dissociation of epidermal cells from skin is a widely used technique to extract and culture keratinocytes. We took advantage of a two-step extraction method to quantify keratin-20-expressing Merkel cells among total cutaneous cells obtained from either hairy or glabrous skin biopsies. Flow cytometry analysis revealed that keratin-20-labeled Merkel cells represent between 3.6% and 5.7% of freshly dissociated basal epidermal cells. No sig-

nificant differences were seen between samples derived from glabrous palmar and hairy anatomic sites, from children and adult, respectively. We also report on the presence of Merkel cells in primary and first subcultures of epidermal cells indicating their capacity to remain viable after extraction from skin of various anatomic sites. To our knowledge, this is the first demonstration of nontumorigenic human Merkel cells in culture *in vitro*. The persistence of a small number of Merkel cells in culture suggests that, with the development of appropriate culture conditions, these cells could be amplified and further studied to unravel long-standing questions relative to their paracrine function or epithelial origin. *Key words: culture/human skin/keratins/mechanoreceptor/Merkel cells. J Invest Dermatol 120:313–317, 2003*

J Invest Dermatol. 2003 120 (2):313-317

Disponible en ligne:

<http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1046/j.1523-1747.2003.12024.x>

Contribution

Ma participation à ces travaux, entamés principalement par Julie Fradette au LOEX, consiste à la mise au point de la technique de détection des cellules de Merkel par immunoperoxydase et j'ai effectué leur analyse en microscopie électronique à transmission (Figure 3). J'ai également participé à la rédaction et à la mise en forme du manuscrit.

Annexe II. Keratin 19 as a Stem Cell Marker in vivo and in vitro

12

Keratin 19 as a Stem Cell Marker In Vivo and In Vitro

Danielle Larouche, Cindy Hayward,
Kristine Cuffley, and Lucie Germain

Summary

The skin is a dynamic tissue in which terminally differentiated keratinocytes are replaced by the proliferation of new epithelial cells that will undergo differentiation. The rapid and continual turnover of skin throughout life depends on a cell population with unique characteristics: the stem cells. These cells are relatively undifferentiated, retain a high capacity for self-renewal throughout their lifetime, have a large proliferative potential, and are normally slow cycling. The long-term regeneration of grafted cultured epidermis indicates that epidermal stem cells are maintained in cultures. In animals they can be identified with ^3H -thymidine or bromodeoxyuridine based on their property of slow cycling. The development of markers such as keratin 19 also permits their study in human tissues. In this chapter, protocols to study skin stem cells using their property of slow cycling and their expression of keratin 19 will be described in detail. The methods include the double labeling of tissues for keratin 19 and label-retaining cells (autoradiography of ^3H -thymidine) *in situ*. The labeling of keratin 19 by immunofluorescence or by flow cytometry is described for cells in vitro.

Key Words:

Stem cells; keratin; keratin 19; epidermis; hair follicles; human skin; flow cytometry.

Methods Mol Biol. 2004;289:103-10. Epidermal cells : Methods and Protocols

Disponible en ligne :

<http://biomed.humanapress.com/ChapterDetail.pasp?isbn=1-59259-830-7&ccode=1-59259-830-7:103>

Contribution

Au cours de ces travaux, effectués au LOEX, j'ai mis au point la technique de marquage et de détection des cellules souches au bromodeoxyuridine. J'ai également participé à la rédaction et à la mise en forme du manuscrit.

Annexe III. Characterization of a 150 kDa accessory receptor for TGF- β 1 on keratinocytes: direct evidence for a GPI anchor and ligand binding of the released form

Characterization of a 150 kDa Accessory Receptor for TGF- β 1 on Keratinocytes: Direct Evidence for a GPI Anchor and Ligand Binding of the Released Form

B.Y.Y. Tam,¹ D. Larouche,² L. Germain,² N.M. Hooper,³ and A. Philip¹

¹Division of Plastic Surgery, Montreal General Hospital and Department of Surgery, McGill University, Montreal, Quebec, H3G 1A4, Canada

²LOEX Laboratory, Hpital Saint Sacrement and Department of Surgery, Université Laval, Sainte Foy, Quebec, Canada

³School of Biochemistry and Molecular Biology, University of Leeds, Leeds, United Kingdom

Abstract Transforming growth factor- β (TGF- β) is a key modulator of epidermal development and homeostasis, and has been shown to potentially regulate keratinocyte migration and function during wound repair. There are three cloned TGF- β receptors termed type I, type II, and type III that are found on most cell types. The types I and II are the signaling receptors, while the type III is believed to facilitate TGF- β binding to the types I and II receptors. Recently, we reported that in addition to these receptors, human keratinocytes express a 150 kDa TGF- β 1 binding protein (r150) which forms a heteromeric complex with the TGF- β signaling receptors. This accessory receptor was described as glycosyl phosphatidylinositol-specific anchored based on its sensitivity to phosphatidylinositol phospholipase C (PIPLC). In the present study, we demonstrate that the GPI-anchor is contained in r150 itself and not on a tightly associated protein and that it binds TGF- β 1 with an affinity similar to those of the types I and II TGF- β signaling receptors. Furthermore, the PIPLC released (soluble) form of this protein is capable of binding TGF- β 1 independently from the signaling receptors. In addition, we provide evidence that r150 is released from the cell surface by an endogenous phospholipase C. Our observation that r150 interacts with the TGF β signaling receptors, together with the finding that the soluble r150 binds TGF- β 1 suggest that r150 in either its membrane anchored or soluble form may potentiate or antagonize TGF- β signaling. Elucidating the mechanism by which r150 functions as an accessory molecule in TGF- β signaling may be critical to understanding the molecular mechanisms underlying the regulation of TGF- β action in keratinocytes. *J. Cell. Biochem.* 83: 494–507, 2001. © 2001 Wiley-Liss, Inc.

Key words: TGF- β ; receptors; keratinocytes; GPI anchor; skin

Journal of Cellular Biochemistry, 83 : 494-507, 2001

Disponible en ligne :

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/85510672/HTMLSTART>

Contribution

Au cours de ces travaux de collaboration entre le LOEX et le laboratoire du Dre. Philip à l'Université McGill, notre laboratoire a fourni les cellules humaines. J'ai coordonné la production et effectué la culture des kératinocytes humains utilisés lors des expériences.

Annexe IV. Tissue reorganization in response to mechanical load increases functionality

Tissue Reorganization in Response to Mechanical Load Increases Functionality

GUILLAUME GRENIER, Ph.D.,^{1,2} MURIELLE RÉMY-ZOLGHADRI, Ph.D.,¹
DANIELLE LAROUCHE, M.Sc.,¹ ROBERT GAUVIN, B.ENG.,¹ KATHLEEN BAKER, M.Sc.,¹
FRANÇOIS BERGERON, Ph.D.,¹ DANIEL DUPUIS, Ph.D.,³ EVE LANGELIER, Ph.D.,³
DENIS RANCOURT, Ph.D.,³ FRANÇOIS A. AUGER, M.D.,¹ and LUCIE GERMAIN, Ph.D.¹

ABSTRACT

In the rapidly growing field of tissue engineering, the functional properties of tissue substitutes are recognized as being of the utmost importance. The present study was designed to evaluate the effects of static mechanical forces on the functionality of the produced tissue constructs. Living tissue sheets reconstructed by the self-assembly approach from human cells, without the addition of synthetic material or extracellular matrix (ECM), were subjected to mechanical load to induce cell and ECM alignment. In addition, the effects of alignment on the function of substitutes reconstructed from these living tissue sheets were evaluated. Our results show that tissue constructs made from living tissue sheets, in which fibroblasts and ECM were aligned, presented higher mechanical resistance. This was assessed by the modulus of elasticity and ultimate strength as compared with tissue constructs in which components were randomly oriented. Moreover, tissue-engineered vascular media made from a prealigned living tissue sheet, produced with smooth muscle cells, possessed greater contractile capacity compared with those produced from living tissue sheets that were not prealigned. These results show that the mechanical force generated by cells during tissue organization is an asset for tissue component alignment. Therefore, this work demonstrates a means to improve the functionality (mechanical and vasocontractile properties) of tissues reconstructed by tissue engineering by taking advantage of the biomechanical forces generated by cells under static strain.

Tissue Engineering, 11 : 90-100, 2005

Disponible en ligne :

<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089%2Ften.2005.11.90>

Contribution

Ma participation à ces travaux, effectués principalement par Guillaume Grenier au LOEX, consiste à la conception du schéma expérimental qui fait l'objet de la figure 1. De plus, j'ai réalisé, en collaboration avec Robert Gauvin, les essais de traction menés sur les tissus. Les résultats sont présentés dans la figure 6.

Références bibliographiques

Akiyama M, Dale B, Sun T-T et Holbrook K. 1995. Characterization of hair follicle bulge in human fetal skin: the human fetal bulge is a pool of undifferentiated keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 105:844-850.

Akiyama M, Smith L et Shimizu H. 2000. Changing Patterns of Localization of putative stem cells in developing human hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology*. 114:321-327.

Alonso L et Fuchs E. 2003. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev*. 17:1189-200.

Argyris T. 1976. Kinetics of epidermal production during epidermal regeneration following abrasion in mice. *Am J Pathol*. 83:329-40.

Arnold I et Watt FM. 2001. c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny. *Curr Biol*. 11:558-68.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD et Lake RJ. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 284:770-6.

Auger FA, Lopez Valle CA, Guignard R, Tremblay N, Noel B, Goulet F et Germain L. 1995. Skin equivalent produced with human collagen. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 31:432-9.

Auger FA, Rémy-Zolghadri M, Grenier G et Germain L. 2000. The self-assembly approach for organ reconstruction by tissue engineering. *e-biomed: a Journal of Regenerative Medicine*. 1:75.

Auger FA, Remy-Zolghadri M, Grenier G et Germain L. 2002. A truly new approach for tissue engineering: the LOEX self-assembly technique. *Ernst Schering Res Found Workshop*:73-88.

Awgulewitsch A. 2003. Hox in hair growth and development. *Naturwissenschaften*. 90:193-211.

Bader B, Magin T, Matzfeld M et Franke W. 1986. Amino acid sequence and gene organization of cytokeratin no. 19, an exceptional tail-less intermediate filament protein. *European Molecular Biology Organization Journal*:1865-1875.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B et Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 18:767-811.

Barrandon Y et Green H. 1987. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:2302-6.

Bell E, Ivarsson B et Merrill C. 1979. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:1274-8.

Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ et Nakatsuji T. 1981. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science.* 211:1052-4.

Bellemare J, Roberge CJ, Bergeron D, Lopez-Valle CA, Roy M et Moulin VJ. 2005. Epidermis promotes dermal fibrosis: role in the pathogenesis of hypertrophic scars. *J Pathol.* 206:1-8.

Berthod F, Hayek D, Damour O et Collombel C. 1993. Collagen synthesis by fibroblasts cultured within a collagen sponge. *Biomaterials.* 14:749-54.

Bichenbach JR. 1981. Identification and behavior of label-retaining cells in mucosa and skin. *Journal of Dental Research.* 60:1611-1620.

Bickenbach JR et Chism E. 1998. Selection and Extended Growth of Murine Epidermal Stem Cells in Culture. *Experimental Cell Research.* 244:184-195.

Black AF, Berthod F, L'Heureux N, Germain L et Auger FA. 1998. In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *Faseb J.* 12:1331-40.

Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L et Fuchs E. 2004. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell.* 118:635-48.

Borradori L et Sonnenberg A. 1999. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol.* 112:411-8.

Botchkarev VA, Botchkareva NV, Roth W, Nakamura M, Chen LH, Herzog W, Lindner G, McMahon JA, Peters C, Lauster R, McMahon AP et Paus R. 1999. Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction. *Nat Cell Biol.* 1:158-64.

Botchkarev VA, Botchkareva NV, Nakamura M, Huber O, Funa K, Lauster R, Paus R et Gilchrist BA. 2001. Noggin is required for induction of the hair follicle growth phase in postnatal skin. *Faseb J.* 15:2205-14.

Botchkarev VA, Botchkareva NV, Sharov AA, Funa K, Huber O et Gilchrist BA. 2002. Modulation of BMP signaling by noggin is required for induction of the secondary (nontylotrich) hair follicles. *J Invest Dermatol.* 118:3-10.

Botchkareva N, Botchkarev V, Albers K, Metz M et Paus R. 2000. Distinct roles for nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in controlling the rate of hair follicle morphogenesis. *Journal of Investigative Dermatology*. 114:314-320.

Bousquet O, Ma L, Yamada S, Gu C, Idei T, Takahashi K, Wirtz D et Coulombe PA. 2001. The nonhelical tail domain of keratin 14 promotes filament bundling and enhances the mechanical properties of keratin intermediate filaments in vitro. *J Cell Biol*. 155:747-54.

Boyce ST et Hansbrough JF. 1988. Biologic attachment, growth, and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes on a graftable collagen and chondroitin-6-sulfate substrate. *Surgery*. 103:421-31.

Boyce ST, Greenhalgh DG, Kagan RJ, Housinger T, Sorrell JM, Childress CP, Rieman M et Warden GD. 1993. Skin anatomy and antigen expression after burn wound closure with composite grafts of cultured skin cells and biopolymers. *Plast Reconstr Surg*. 91:632-41.

Buhl AE, Waldon DJ, Kawabe TT et Holland JM. 1989. Minoxidil stimulates mouse vibrissae follicles in organ culture. *J Invest Dermatol*. 92:315-20.

Burgeson RE et Christiano AM. 1997. The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol*. 9:651-8.

Burke JF, Yannas IV, Quinby WC, Jr., Bondoc CC et Jung WK. 1981. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*. 194:413-28.

Byrne C, Hardman M et Nield K. 2003. Covering the limb--formation of the integument. *J Anat*. 202:113-23.

Carter WG, Kaur P, Gil SG, Gahr PJ et Wayner EA. 1990. Distinct functions for integrins alpha 3 beta 1 in focal adhesions and alpha 6 beta 4/bullous pemphigoid antigen in a new stable anchoring contact (SAC) of keratinocytes: relation to hemidesmosomes. *J Cell Biol*. 111:3141-54.

Carvell GE et Simons DJ. 1990. Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J Neurosci*. 10:2638-48.

Caulin C, Ware CF, Magin TM et Oshima RG. 2000. Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Cell Biol*. 149:17-22.

Chase HB. 1954. Growth of the hair. *Physiol Rev*. 34:113-26.

Commo S, Gaillard O et Bernard BA. 2000. The human hair follicle contains two distinct K19 positive compartments in the outer root sheath: a unifying hypothesis for stem cell reservoir? *Differentiation*. 66:157-64.

Coraux C, Hilmi C, Rouleau M, Spadafora A, Hinnrasky J, Ortonne JP, Dani C et Aberdam D. 2003. Reconstituted skin from murine embryonic stem cells. *Curr Biol*. 13:849-53.

Cotsarelis G, Sun T-T et Lavker RM. 1990. Label retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implication for follicular stem cells, hair cycle and skin carcinogenesis. *Cell*. 61:1329-1337.

Cotta-Pereira G, Guerra Rodrigo F et Bittencourt-Sampaio S. 1976. Oxytalan, elaunin and elastic fibers in the human skin. *J Invest Dermatol*. 66:143.

Couchman J. 1986. Rat hair follicle dermal papillae have an extracellular matrix containing basement membrane components. *Journal of Investigative Dermatology*. 87:762-767.

Couchman JR et Gibson WT. 1985. Expression of basement membrane components through morphological changes in the hair growth cycle. *Dev Biol*. 108:290-8.

Coulombe PA, Kopan R et Fuchs E. 1989. Expression of keratin K14 in the epidermis and hair follicle: insights into complex programs of differentiation. *J Cell Biol*. 109:2295-312.

Coulombe PA et Fuchs E. 1990. Elucidating the early stages of keratin filament assembly. *J Cell Biol*. 111:153-69.

Coulombe PA, Hutton ME, Letai A, Hebert A, Paller AS et Fuchs E. 1991. Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. *Cell*. 66:1301-11.

Damour O, Gueugniaud PY, Berthin-Maghit M, Rousselle P, Berthod F, Sahuc F et Collombel C. 1994. A dermal substrate made of collagen--GAG--chitosan for deep burn coverage: first clinical uses. *Clin Mater*. 15:273-6.

DasGupta R et Fuchs E. 1999. Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development*. 126:4557-4568.

DasGupta R, Rhee H et Fuchs E. 2002. A developmental conundrum: a stabilized form of beta-catenin lacking the transcriptional activation domain triggers features of hair cell fate in epidermal cells and epidermal cell fate in hair follicle cells. *J Cell Biol*. 158:331-44.

Dellambra E, Golisano O, Bondanza S, Siviero E, Lacal P, Molinari M, D'Atri S et De Luca M. 2000. Downregulation of 14-3-3sigma prevents clonal evolution and leads to immortalization of primary human keratinocytes. *J Cell Biol.* 149:1117-30.

Duplan-Perrat F, Damour O, Montrocher C, Peyrol S, Grenier G, Jacob MP et Braye F. 2000. Keratinocytes influence the maturation and organization of the elastin network in a skin equivalent. *J Invest Dermatol.* 114:365-70.

Eaglstein WH et Falanga V. 1997. Tissue engineering and the development of Apligraf, a human skin equivalent. *Clin Ther.* 19:894-905.

Ebara S, Kumamoto K, Matsuura T, Mazurkiewicz JE et Rice FL. 2002. Similarities and differences in the innervation of mystacial vibrissal follicle-sinus complexes in the rat and cat: a confocal microscopic study. *J Comp Neurol.* 449:103-19.

Eckert RL. 1988. Sequence of the human 40-kDa keratin reveals an unusual structure with very high sequence identity to the corresponding bovine keratin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:1114-8.

Ellis T, Gambardella L, Horcher M, Tschanz S, Capol J, Bertram P, Jochum W, Barrandon Y et Busslinger M. 2001. The transcriptional repressor CDP (Cut11) is essential for epithelial cell differentiation of the lung and the hair follicle. *Genes Dev.* 15:2307-19.

Favier B, Fliniaux I, Thelu J, Viallet JP, Demarchez M, Jahoda CA et Dhouailly D. 2000. Localisation of members of the notch system and the differentiation of vibrissa hair follicles: receptors, ligands, and fringe modulators. *Dev Dyn.* 218:426-37.

Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabe-Heider F, Biernaskie J, Junek A, Kobayashi NR, Toma JG, Kaplan DR, Labosky PA, Rafuse V, Hui CC et Miller FD. 2004. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol.* 6:1082-93.

Fradette J, Godbout MJ, Michel M et Germain L. 1995. Localization of Merkel cells at hairless and hairy human skin sites using keratin 18. *Biochem Cell Biol.* 73:635-9.

Fradette J, Germain L, Sessaiah P et Coulombe PA. 1998. The type I keratin 19 possesses distinct and context-dependent assembly properties. *J Biol Chem.* 273:35176-84.

Fradette J. 1999. Caractérisation du processus de la différenciation terminale des cellules souches cutanées humaines: de l'étude des propriétés de la kératine 19 à l'analyse des cellules différenciées, soit les kératinocytes et les cellules de Merkel. Département de chirurgie. Université Laval, Québec. 210.

Fradette J, Larouche D, Fugère C, Guignard R, Beauparlant A, Couture V, Caouette-Laberge L, Roy A et Germain L. 2002. Dissociation and quantification of

normal human Merkel cells among epidermal cell populations derived from glabrous and hairy skin sites. The Merkel cell: structure-development-function-cancerogenesis / K.I. Baumann, Z. Halata, I. Moll (eds.). Springer-verlag, editor, Berlin. 105-112.

Franke WW, Schiller DL, Hatzfeld M et Winter S. 1983. Protein complexes of intermediate-sized filaments: melting of cytokeratin complexes in urea reveals different polypeptide separation characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:7113-7.

Fuchs E. 1990. Epidermal differentiation. *Current Opinion in Cell Biology.* 2:1028-1035.

Fuchs E. 1995. Keratins and the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:123-53.

Fuchs E, Tumber T et Guasch G. 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 116:769-78.

Fugère C. 2004. Étude des cellules souches cutanées: optimisation des conditions de culture. Faculté de Médecine. Université Laval, Québec. 156.

Gallico GG, 3rd, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O et Green H. 1984. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med.* 311:448-51.

Gandarillas A et Watt F. 1997. c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes and Development.* 11:2869-2882.

Gat U, DasGupta R, Degenstein L et Fuchs E. 1998. De novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated β -catenin in skin. *Cell.* 95:605-614.

Geerts D, Fontao L, Nievers MG, Schaapveld RQ, Purkis PE, Wheeler GN, Lane EB, Leigh IM et Sonnenberg A. 1999. Binding of integrin $\alpha 6 \beta 4$ to plectin prevents plectin association with F-actin but does not interfere with intermediate filament binding. *J Cell Biol.* 147:417-34.

Geesin JC, Darr D, Kaufman R, Murad S et Pinnell SR. 1988. Ascorbic acid specifically increases type I and type III procollagen messenger RNA levels in human skin fibroblast. *J Invest Dermatol.* 90:420-4.

Geesin JC, Gordon JS et Berg RA. 1993. Regulation of collagen synthesis in human dermal fibroblasts by the sodium and magnesium salts of ascorbyl-2-phosphate. *Skin Pharmacol.* 6:65-71.

Geras A. 1990. Dermatology: A medical artist's interpretation. Sandoz Medical Publications, Toronto. 139 pp.

Germain L et Auger FA. 1995. Tissue engineered biomaterials: biological and mechanical characteristics. *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, part B; Applications, Vol. 1. Marcel Dekker, inc. Publishers, NY USA. 699-734.

Germain L, Auger FA, Grandbois E, Guignard R, Giasson M, Boisjoly H et Guerin SL. 1999. Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology*. 67:140-7.

Germain L, Fradette J, Robitaille H, Guignard R, Grondin G, Nadeau A et Blouin R. 2000. The mixed lineage kinase leucine-zipper protein kinase exhibits a differentiation-associated localization in normal human skin and induces keratinocyte differentiation upon overexpression. *J Invest Dermatol*. 115:860-7.

Ghazizadeh S et Taichman LB. 2001. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *Embo J*. 20:1215-22.

Gilbert S, Loranger A, Daigle N et Marceau N. 2001. Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. *J Cell Biol*. 154:763-73.

Godwin AR et Capecchi MR. 1998. Hoxc13 mutant mice lack external hair. *Genes Dev*. 12:11-20.

Green H, Kehinde O et Thomas J. 1979. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:5665-8.

Guic-Robles E, Valdivieso C et Guajardo G. 1989. Rats can learn a roughness discrimination using only their vibrissal system. *Behav Brain Res*. 31:285-9.

Haeberle H, Fujiwara M, Chuang J, Medina MM, Panditrao MV, Bechstedt S, Howard J et Lumpkin EA. 2004. Molecular profiling reveals synaptic release machinery in Merkel cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:14503-8.

Hager B, Bickenbach J et Fleckman P. 1999. Long-term culture of murine epidermal keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 112:971-976.

Hakkinen L, Koivisto L et Larjava H. 2001. An improved method for culture of epidermal keratinocytes from newborn mouse skin. *Methods Cell Sci*. 23:189-96.

Halata Z, Grim M et Baumann KI. 2003. [The Merkel cell: morphology, developmental origin, function]. *Cas Lek Cesk*. 142:4-9.

Handjiski BK, Eichmuller S, Hofman U, Czarnetzki BM et Paus R. 1994. Alkaline phosphatase activity and localization during the murine hair cycle. *British Journal of Dermatology*. 131:303-310.

Hansbrough JF, Morgan JL, Greenleaf GE et Bartel R. 1993. Composite grafts of human keratinocytes grown on a polyglactin mesh-cultured fibroblast dermal substitute function as a bilayer skin replacement in full-thickness wounds on athymic mice. *J Burn Care Rehabil.* 14:485-94.

Hardy M. 1992. The secret life of the hair follicle. *Trends in Genetics.* 8:55-60.

Harris AK, Stopak D et Wild P. 1981. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature.* 290:249-51.

Hartmann MJ, Johnson NJ, Towal RB et Assad C. 2003. Mechanical characteristics of rat vibrissae: resonant frequencies and damping in isolated whiskers and in the awake behaving animal. *J Neurosci.* 23:6510-9.

Hatzfeld M et Burba M. 1994. Function of type I and type II keratin head domains: their role in dimer, tetramer and filament formation. *Journal of Cell Science.* 107:1959-1972.

Hayashi K, Mochizuki M, Nomizu M, Uchinuma E, Yamashina S et Kadoya Y. 2002. Inhibition of hair follicle growth by a laminin-1 G-domain peptide, RKRLQVQLSIRT, in an organ culture of isolated vibrissa rudiment. *J Invest Dermatol.* 118:712-8.

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B et Kinzler KW. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 281:1509-12.

Hesse M, Franz T, Tamai Y, Taketo MM et Magin TM. 2000. Targeted deletion of keratins 18 and 19 leads to trophoblast fragility and early embryonic lethality. *Embo J.* 19:5060-70.

Hofmann I, Winter H, Mucke N, Langowski J et Schweizer J. 2002. The in vitro assembly of hair follicle keratins: comparison of cortex and companion layer keratins. *Biol Chem.* 383:1373-81.

Horne KA, Jahoda CA et Oliver RF. 1986. Whisker growth induced by implantation of cultured vibrissa dermal papilla cells in the adult rat. *J Embryol Exp Morphol.* 97:111-24.

Huelsken J, Vogel R, Brinkmann V, Erdmann B, Birchmeier C et Birchmeier W. 2000. Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol.* 148:567-78.

Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G et Birchmeier W. 2001. beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell.* 105:533-45.

Hutton E, Paladini RD, Yu Q-C, Yen M et Coulombe PA. 1998. Functional differences between keratins of stratified and simple epithelia. *Journal of Cell Biology*. 143:487-499.

Ibrahim L et Wright E. 1975. The growth of rats and mice vibrissae under normal and some abnormal conditions. *Journal of embryology and experimental morphology*. 33:831-844.

Ibrahim L et Wright EA. 1978. The effect of a single plucking at different times in the hair cycle on the growth of individual mouse vibrissae. *Br J Dermatol*. 99:365-70.

Ibrahim L et Wright EA. 1982. A quantitative study of hair growth using mouse and rat vibrissal follicles. I. Dermal papilla volume determines hair volume. *J Embryol Exp Morphol*. 72:209-24.

Inada H, Izawa I, Nishizawa M, Fujita E, Kiyono T, Takahashi T, Momoi T et Inagaki M. 2001. Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD. *J Cell Biol*. 155:415-26.

Jahoda CA. 1992. Induction of follicle formation and hair growth by vibrissa dermal papillae implanted into rat ear wounds: vibrissa-type fibres are specified. *Development*. 115:1103-9.

Jahoda CA, Oliver RF, Reynolds AJ, Forrester JC, Gillespie JW, Cserhalmi-Friedman PB, Christiano AM et Horne KA. 2001. Trans-species hair growth induction by human hair follicle dermal papillae. *Exp Dermatol*. 10:229-37.

Jahoda CAB, Horne KA et Oliver RF. 1984. Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. *Nature*. 311:360-362.

Jahoda CAB, Reynolds AJ et Oliver RF. 1993. Induction of hair growth in ear wounds by cultured dermal papilla cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 101:584-590.

Jamora C et Fuchs E. 2002. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol*. 4:E101-8.

Jamora C, DasGupta R, Kocieniewski P et Fuchs E. 2003. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature*. 422:317-22.

Jave-Suarez LF, Winter H, Langbein L, Rogers MA et Schweizer J. 2002. HOXC13 is involved in the regulation of human hair keratin gene expression. *J Biol Chem*. 277:3718-26.

Jensen UB, Lowell S et Watt FM. 1999. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development*. 126:2409-18.

Jiang CK, Flanagan S, Ohtsuki M, Shuai K, Freedberg IM et Blumenberg M. 1994. Disease-activated transcription factor: allergic reactions in human skin cause nuclear translocation of STAT-91 and induce synthesis of keratin K17. *Mol Cell Biol*. 14:4759-69.

Jiang T-X, Liu Y-H, Widelitz R, Kundu R, Maxson R et Chuong C. 1999. Epidermal dysplasia and abnormal hair follicles in transgenic mice overexpressing homeobox gene MSX-2. *Journal of Investigative Dermatology*. 113:230-237.

Jones PH et Watt FM. 1993. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*. 73:713-24.

Jones PH, Harper S et Watt FM. 1995. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell*. 80:83-93.

Kajiya H, Tanaka N, Inazumi T, Seyama Y, Tajima S et Ishibashi A. 1997. Cultured human keratinocytes express Tropoelastin. *Journal of Investigative Dermatology*. 109:641-644.

Kalinin AE, Kajava AV et Steinert PM. 2002. Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays*. 24:789-800.

Kamimura J, Lee D, Baden HP, Brissette J et Dotto PG. 1997. Primary Mouse Keratinocyte Cultures Contain Hair Follicle Progenitor Cells with Multiple Differentiation Potential. *Journal of Investigative Dermatology*. 109:534-540.

Kanda T, Sullivan KF et Wahl GM. 1998. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr Biol*. 8:377-85.

Kaufman CK, Zhou P, Pasolli HA, Rendl M, Bolotin D, Lim KC, Dai X, Alegre ML et Fuchs E. 2003. GATA-3: an unexpected regulator of cell lineage determination in skin. *Genes Dev*. 17:2108-22.

Kaur P et Li A. 2000. Adhesive properties of human basal epidermal cells: An analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 114:413-420.

Kirschstein R et Skirboll L. 2001. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/>.

Kljuic Aw, Bazzi H, Sundberg JP, Martinez-Mir A, O'Shaughnessy R, Mahoney MG, Levy M, Montagutelli X, Ahmad W, Aita VM, Gordon D, Uitto J, Whiting D, Ott J, Fischer S, Gilliam TC, Jahoda CA, Morris RJ, Panteleyev AA, Nguyen VT et Christiano AM. 2003. Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell*. 113:249-60.

Kobayashi K, Rochat A et Barrandon Y. 1993. Segregation of colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. *Proceeding of National Academy of Science USA*:7391-7395.

Kobielak K, Pasolli HA, Alonso L, Polak L et Fuchs E. 2003. Defining BMP functions in the hair follicle by conditional ablation of BMP receptor IA. *J Cell Biol*. 163:609-23.

Koch PJ et Franke WW. 1994. Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*. 6:682-7.

Komuves LG, Michael E, Arbeit JM, Ma XK, Kwong A, Stelnicki E, Rozenfeld S, Morimune M, Yu QC et Largman C. 2002. HOXB4 homeodomain protein is expressed in developing epidermis and skin disorders and modulates keratinocyte proliferation. *Dev Dyn*. 224:58-68.

Kopan R et Weintraub H. 1993. Mouse notch: expression in hair follicles correlates with cell fate determination. *J Cell Biol*. 121:631-41.

Kowalczyk AP, Bornslaeger EA, Norvell SM, Palka HL et Green KJ. 1999. Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. *Int Rev Cytol*. 185:237-302.

L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L et Auger FA. 1998. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *Faseb J*. 12:47-56.

Laflamme K, Roberge CJ, Labonte J, Pouliot S, D'Orleans-Juste P, Auger FA et Germain L. 2005. Tissue-engineered human vascular media with a functional endothelin system. *Circulation*. 111:459-64.

Lafrance H, Yahia L, Germain L, Guillot M et Auger FA. 1995. Study of the tensile properties of living skin equivalents. *Biomed Mater Eng*. 5:195-208.

Lamandé SR et Bateman JF. 1993. A mouse 3T6 fibroblast cell culture model for the study of normal and protein-engineered collagen synthesis and deposition into the extracellular matrix. *Matrix*. 13:323-30.

Langbein L, Rogers MA, Winter H, Praetzel S, Beckhaus U, Rackwitz HR et Schweizer J. 1999. The catalog of human hair keratins. I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *J Biol Chem.* 274:19874-84.

Langbein L, Rogers MA, Winter H, Praetzel S et Schweizer J. 2001. The catalog of human hair keratins. II. Expression of the six type II members in the hair follicle and the combined catalog of human type I and II keratins. *J Biol Chem.* 276:35123-32.

Laplante AF, Germain L, Auger FA et Moulin V. 2001. Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *Faseb J.* 15:2377-89.

Lavker RM et Sun TT. 1982. Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. *Science.* 215:1239-41.

Lee D, Lee E, Cho K et Yang J. 2003. The effect of Keratinocytes and fibroblasts on the formation of basement membrane in skin equivalent models. *Journal of Investigative Dermatology.* 121:x, abstract #0243.

Lee DY et Cho KH. 2005. The effects of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in three-dimensional culture systems. *Arch Dermatol Res.* 296:296-302.

Lefort K et Dotto GP. 2004. Notch signaling in the integrated control of keratinocyte growth/differentiation and tumor suppression. *Semin Cancer Biol.* 14:374-86.

Leigh IM, Navsaria H, Purkis PE, McKay IA, Bowden PE et Riddle PN. 1995. Keratins (K16 and K17) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis in vivo and in vitro. *Br J Dermatol.* 133:501-11.

Lenoir MC, Bernard BA, Pautrat G, Darmon M et Shroot B. 1988. Outer root sheath cells of human hair follicle are able to regenerate a fully differentiated epidermis in vitro. *Dev Biol.* 130:610-20.

Levy L, Broad S, Diekmann D, Evans RD et Watt FM. 2000. beta1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms. *Mol Biol Cell.* 11:453-66.

Li A, Simmons PJ et Kaur P. 1998. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proceeding of National Academy of Science USA.* 95:3902-3907.

Li J, Tzu J, Chen Y, Zhang YP, Nguyen NT, Gao J, Bradley M, Keene DR, Oro AE, Miner JH et Marinkovich MP. 2003. Laminin-10 is crucial for hair morphogenesis. *Embo J.* 22:2400-10.

Liang L et Bickenbach JR. 2002. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. *Stem Cells*. 20:21-31.

Liao J et Omary MB. 1996. 14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor. *J Cell Biol*. 133:345-57.

Lichti U, Weinberg WC, Goodman L, Ledbetter S, Dooley T, Morgan D et Yuspa SH. 1993. In vivo Regulation of Murine Hair Growth: Insights from grafting Defined Cell Populations onto Nude Mice. *Journal of Investigative Dermatology*. 101:124s-129s.

Lichti U, scandurro AB, Kartasova T, Rubin JS, LaRochelle W et Yuspa SH. 1995. hair follicle development and hair growth from defined cell populations grafted onto nude mice. *Journal of Investigative Dermatology*. 104:43s-44s.

Limat A, Hunziker T, Waelti E, Inaebnit S, Wiesmann U et Braathen L. 1993. Soluble factor from human hair papilla cells and dermal fibroblasts dramatically increase the clonal growth of outer root sheath cells. *Archives of Dermatology*. 285:205-210.

Lin H. 2002. The stem-cell niche theory: lessons from flies. *Nat Rev Genet*. 3:931-40.

Liu Y, Lyle S, Yang Z et Cotsarelis G. 2003. Keratin 15 promoter targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge. *J Invest Dermatol*. 121:963-8.

Lloyd C, Yu Q-C, Cheng J, Turksen K, Degenstein L, Hutton E et Fuchs E. 1995. The basal keratin network of stratified squamous epithelia: Defining k15 function in the absence of K14. *Journal of Cell Biology*. 129:1329-1344.

Lo Celso C, Prowse DM et Watt FM. 2004. Transient activation of beta-catenin signalling in adult mouse epidermis is sufficient to induce new hair follicles but continuous activation is required to maintain hair follicle tumours. *Development*. 131:1787-99.

Lowell S, Jones P, Le Roux I, Dunne J et Watt FM. 2000. Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Curr Biol*. 10:491-500.

Lowell S et Watt FM. 2001. Delta regulates keratinocyte spreading and motility independently of differentiation. *Mech Dev*. 107:133-40.

Lussier M, Ouellet T, Lampron C, Lapointe L et Royal A. 1989. Mouse keratin 19: complete amino acid sequence and gene expression during development. *Gene*. 85:435-44.

Lyle S, Christofidou-Solomidou M, Liu Y, Elder DE, Albelda S et Cotsarelis G. 1998. The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. *Journal of Cell Science*. 111:3179-2188.

Lyle S, Christofidou-Solomidou M, Liu Y, Elder D, Albelda S et Cotsarelis G. 1999. Human hair follicle bulge cells are biochemically distinct and possess an epithelial stem cell phenotype. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 4:296-301.

Ma L, Xu J, Coulombe PA et Wirtz D. 1999. Keratin filament suspensions show unique micromechanical properties. *J Biol Chem*. 274:19145-51.

Ma L, Yamada S, Wirtz D et Coulombe PA. 2001. A 'hot-spot' mutation alters the mechanical properties of keratin filament networks. *Nat Cell Biol*. 3:503-6.

Magin T, Hesse M et Schröder R. 2000. Novel insights into intermediate-filament function from studies of transgenic and knockout mice. *Protoplasma*. 211:140-150.

Mansbridge J, Liu K, Patch R, Symons K et Pinney E. 1998. Three-dimensional fibroblast culture implant for the treatment of diabetic foot ulcers: metabolic activity and therapeutic range. *Tissue Eng*. 4:403-14.

Martin KH, Slack JK, Boerner SA, Martin CC et Parsons JT. 2002. Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science*. 296:1652-3.

Matic M, Taichman L et Simon M. 1999. Basal foreskin keratinocytes that lack expression of connexin 43 exhibit stem cell characteristics. American society for cell biology, Washington.

Matic M et Simon M. 2003. Label-retaining cells (presumptive stem cells) of mice vibrissae do not express gap junction protein connexin 43. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 8:91-5.

Mazzalupo S, Wong P, Martin P et Coulombe PA. 2003. Role for keratins 6 and 17 during wound closure in embryonic mouse skin. *Dev Dyn*. 226:356-65.

McElwee K et Hoffmann R. 2000. Growth factors in early hair follicle morphogenesis. *Eur J Dermatol*. 10:341-50.

McElwee KJ, Kissling S, Wenzel E, Huth A et Hoffmann R. 2003. Cultured peribulbar dermal sheath cells can induce hair follicle development and contribute to the dermal sheath and dermal papilla. *J Invest Dermatol*. 121:1267-75.

McGowan K et Coulombe PA. 1998a. The wound repair-associated keratins 6, 16, and 17. Insights into the role of intermediate filaments in specifying keratinocyte cytoarchitecture. *Subcell Biochem*. 31:173-204.

McGowan KM et Coulombe PA. 1998b. Onset of keratin 17 expression coincides with the definition of major epithelial lineages during skin development. *J Cell Biol.* 143:469-86.

McGowan KM et Coulombe PA. 2000. Keratin 17 expression in the hard epithelial context of the hair and nail, and its relevance for the pachyonychia congenita phenotype. *J Invest Dermatol.* 114:1101-7.

McGowan KM, Tong X, Colucci-Guyon E, Langa F, Babinet C et Coulombe PA. 2002. Keratin 17 null mice exhibit age- and strain-dependent alopecia. *Genes Dev.* 16:1412-22.

McLean WH, Rugg EL, Lunny DP, Morley SM, Lane EB, Swensson O, Dopping-Hepenstal PJ, Griffiths WA, Eady RA et Higgins C. 1995. Keratin 16 and keratin 17 mutations cause pachyonychia congenita. *Nat Genet.* 9:273-8.

Mehta SB et Kleinfeld D. 2004. Frisking the whiskers. Patterned sensory input in the rat vibrissa system. *Neuron.* 41:181-4.

Meng JJ, Bornslaeger EA, Green KJ, Steinert PM et Ip W. 1997. Two-hybrid analysis reveals fundamental differences in direct interactions between desmoplakin and cell type-specific intermediate filaments. *J Biol Chem.* 272:21495-503.

Merrill BJ, Gat U, DasGupta R et Fuchs E. 2001. Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev.* 15:1688-705.

Messenger A, Elliott K, Temple A et Randall V. 1991. Expression of basement membrane proteins and interstitial collagens in dermal papillae of human hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology.* 96:93-97.

Méthot S, Moulin V, Rancourt D, Bourdages M, Goulet D, Plante M, Auger FA et Germain L. 2001. Morphological Changes of Human Skin Cells Exposed to a DC Electric Field In Vitro Using a New Exposure System. *The Canadian Journal of Chemical Engineering.* 79:668-677.

Michel M, Germain L, Belanger PM et Auger FA. 1995. Functional evaluation of anchored skin equivalent cultured in vitro: percutaneous absorption studies and lipid analysis. *Pharm Res.* 12:455-8.

Michel M, Torok N, Godbout MJ, Lussier M, Gaudreau P, Royal A et Germain L. 1996. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci.* 109:1017-28.

Michel M, L'Heureux N, Auger FA et Germain L. 1997. From newborn to adult: phenotypic and functional properties of skin equivalent and human skin as a function of donor age. *J Cell Physiol.* 171:179-89.

Michel M, L'Heureux N, Pouliot R, Xu W, Auger FA et Germain L. 1999. Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 35:318-26.

Millar SE, Willert K, Salinas PC, Roelink H, Nusse R, Sussman DJ et Barsh GS. 1999. WNT signaling in the control of hair growth and structure. *Dev Biol.* 207:133-49.

Miller RK, Vikstrom K et Goldman RD. 1991. Keratin incorporation into intermediate filament networks is a rapid process. *J Cell Biol.* 113:843-55.

Moles JP et Watt FM. 1997. The epidermal stem cell compartment: variation in expression levels of E-cadherin and catenins within the basal layer of human epidermis. *J Histochem Cytochem.* 45:867-74.

Moll I. 1994a. Merkel cell distribution in human hair follicles of the fetal and adult scalp. *Cell Tissue Res.* 277:131-8.

Moll I, Paus R et Moll R. 1996. Merkel cells in mouse skin: intermediate filament pattern, localization, and hair cycle-dependent density. *J Invest Dermatol.* 106:281-6.

Moll R, Franker W et Schiller D. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 81:11-24.

Moll R, Krepler R et Franke WW. 1983. Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. *Differentiation.* 23:256-69.

Moll R. 1994b. Cytokeratins in the histological diagnosis of malignant tumors. *Int J Biol Markers.* 9:63-9.

Moresi JM et Horn TD. 1997. Distribution of Langerhans cells in human hair follicle. *J Cutan Pathol.* 24:636-40.

Morris R, Fischer S, Klein-Szanto A et Slaga T. 1990. Subpopulations of primary adult murine epidermal basal cells sedimented on density gradients. *Cell tissue kinetics.* 23:587-602.

Morris R et Potten C. 1994. Slowly cycling (label-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells in vitro. *Cell Proliferation.* 27:279-289.

Morris RJ et Potten CS. 1999. Highly persistent label-retaining cells in the hair follicles of mice and their fate following induction of anagen. *J Invest Dermatol.* 112:470-5.

Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin JS, Sawicki JA et Cotsarelis G. 2004. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol.* 22:411-7.

Moulin V, Castilloux G, Jean A, Garrel DR, Auger FA et Germain L. 1996. In vitro models to study wound healing fibroblasts. *Burns.* 22:359-62.

Nanba D, Hieda Y et Nakanishi Y. 2000. Remodeling of desmosomal and hemidesmosomal adhesion systems during early morphogenesis of mouse pelage hair follicles. *J Invest Dermatol.* 114:171-7.

Naughton G, Mansbridge J et Gentzkow G. 1997. A metabolically active human dermal replacement for the treatment of diabetic foot ulcers. *Artif Organs.* 21:1203-10.

Neimark MA, Andermann ML, Hopfield JJ et Moore CI. 2003. Vibrissa resonance as a transduction mechanism for tactile encoding. *J Neurosci.* 23:6499-509.

Niemann C, Owens DM, Hulsken J, Birchmeier W et Watt FM. 2002. Expression of DeltaN Lef1 in mouse epidermis results in differentiation of hair follicles into squamous epidermal cysts and formation of skin tumours. *Development.* 129:95-109.

Niemann C, Unden AB, Lyle S, Zouboulis Ch C, Toftgard R et Watt FM. 2003. Indian hedgehog and beta-catenin signaling: role in the sebaceous lineage of normal and neoplastic mammalian epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 Suppl 1:11873-80.

Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M, Jackson IJ, Barrandon Y, Miyachi Y et Nishikawa S. 2002. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature.* 416:854-60.

Noveen A, Jiang TX, Ting-Berreth SA et Chuong CM. 1995. Homeobox genes Msx-1 and Msx-2 are associated with induction and growth of skin appendages. *J Invest Dermatol.* 104:711-9.

Ohlstein B, Kai T, Decotto E et Spradling A. 2004. The stem cell niche: theme and variations. *Curr Opin Cell Biol.* 16:693-9.

Oliver RF. 1967. The experimental induction of whisker growth in the hooded rat by implantation of dermal papillae. *J Embryol Exp Morphol.* 18:43-51.

Oliver RF. 1970. The induction of hair follicle formation in the adult hooded rat by vibrissa dermal papillae. *J Embryol Exp Morphol.* 23:219-36.

Oliver RF et Jahoda CA. 1988. Dermal-epidermal interactions. *Clin Dermatol.* 6:74-82.

Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K et Barrandon Y. 2001. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell.* 104:233-45.

Paladini RD, Takahashi K, Bravo NS et Coulombe PA. 1996. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol.* 132:381-97.

Paladini RD et Coulombe PA. 1999. The functional diversity of epidermal keratins revealed by the partial rescue of the keratin 14 null phenotype by keratin 16. *J Cell Biol.* 146:1185-201.

Panteleyev AA, Rosenbach T, Paus R et Christiano AM. 2000. The bulge is the source of cellular renewal in the sebaceous gland of mouse skin. *Arch Dermatol Res.* 292:573-6.

Paquette JS, Goulet F, Boulet LP, Laviolette M, Tremblay N, Chakir J, Gennain L et Auger FA. 1998. Three-dimensional production of bronchi in vitro. *Can Respir J.* 5:43.

Paquette JS, Moulin V, Tremblay P, Bernier V, Boutet M, Laviolette M, Auger FA, Boulet LP et Goulet F. 2004. Tissue-engineered human asthmatic bronchial equivalents. *Eur Cell Mater.* 7:1-11; discussion 1-11.

Paramio J, Casanova M, Segrelles C, Mittnacht S, Lane B et Jorcano J. 1999. Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Molecular and Cellular Biology.* 19:3086-3094.

Paramio JM, Segrelles C, Ruiz S et Jorcano JL. 2001. Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKCzeta mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol.* 21:7449-59.

Paus R, van der Veen C, Eichmuller S, Kopp T, Hagen E, Muller-Rover S et Hofmann U. 1998. Generation and cyclic remodeling of the hair follicle immune system in mice. *J Invest Dermatol.* 111:7-18.

Paus R, Muller-Rover S, Van Der Veen C, Maurer M, Eichmuller S, Ling G, Hofmann U, Foitzik K, Mecklenburg L et Handjiski B. 1999. A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol.* 113:523-32.

Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, Ponzin D, McKeon F et De Luca M. 2001. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:3156-61.

Pelton RW, Saxena B, Jones M, Moses HL et Gold LI. 1991. Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J Cell Biol.* 115:1091-105.

Peters B, Kirfel J, Bussow H, Vidal M et Magin TM. 2001. Complete cytolysis and neonatal lethality in keratin 5 knockout mice reveal its fundamental role in skin integrity and in epidermolysis bullosa simplex. *Mol Biol Cell.* 12:1775-89.

Philpott M, Green M et Kealey T. 1990. Human hair growth in vitro. *Journal of Cell Science.* 97:463-471.

Philpott M, Green M et Kealy T. 1992. Rat hair follicle growth in vitro. *British Journal of Dermatology.* 127:600-607.

Philpott M, Sanders D et Kealey T. 1995. Cultured human hair follicles and growth factors. *Journal of Investigative Dermatology.* 104:44s-45s.

Philpott M, Sanders D et Kealy T. 1996. Whole hair follicle culture. *Dermatologic Clinics.* 14:595-607.

Philpott MP et Kealey T. 2000. Cyclical changes in rat vibrissa follicles maintained In vitro. *J Invest Dermatol.* 115:1152-5.

Porter R, S L, Melton D, Swensson O, Eady R et Magin T. 1996. Gene targeting at the mouse cytokeratin 10 locus: severe skin fragility and changes of cytokeratin expression in the epidermis. *Journal of Cell Biology.* 132:925-936.

Pouliot R. 1999. Contribution à la compréhension de la dynamique tégumentaire à l'aide de différents modèles d'équivalents cutanés humains produits par ingénierie tissulaire. Pharmacie. Laval, Québec. 253.

Purdue GF. 1997. Dermagraft-TC pivotal efficacy and safety study. *J Burn Care Rehabil.* 18:S13-4.

Purdue GF, Hunt JL, Still JM, Jr., Law EJ, Herndon DN, Goldfarb IW, Schiller WR, Hansbrough JF, Hickerson WL, Himel HN, Kealey GP, Twomey J, Missavage AE, Solem LD, Davis M, Totoritis M et Gentzkow GD. 1997. A multicenter clinical trial of a biosynthetic skin replacement, Dermagraft-TC, compared with cryopreserved human cadaver skin for temporary coverage of excised burn wounds. *J Burn Care Rehabil.* 18:52-7.

Raghow R. 1994. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *Faseb J.* 8:823-31.

Randall VA, Sundberg JP et Philpott MP. 2003. Animal and in vitro models for the study of hair follicles. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 8:39-45.

Reddy S, Andl T, Bagasra A, Lu MM, Epstein DJ, Morrisey EE et Millar SE. 2001. Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis. *Mech Dev.* 107:69-82.

Regnier M, Duval C, Galey JB, Philippe M, Lagrange A, Tuloup R et Schmidt R. 1999. Keratinocyte-melanocyte co-cultures and pigmented reconstructed human epidermis: models to study modulation of melanogenesis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 45:969-80.

Reichelt J et Magin TM. 2002. Hyperproliferation, induction of c-Myc and 14-3-3sigma, but no cell fragility in keratin-10-null mice. *J Cell Sci.* 115:2639-50.

Reynolds A, Lawrence C, Cserhalmi-Friedman P, Christiano A et Jahoda C. 1999. Trans-gender induction of hair follicles. *Nature.* 402:33-34.

Reynolds AJ, Oliver RF et Jahoda CAB. 1991. Dermal cell population show variable competence in epidermal cell support: stimulatory effects of hair papilla cells. *Journal of Cell Science.* 98:75-83.

Reynolds AJ et Jahoda CAB. 1992. Cultured dermal papilla cells induce formation and hair growth by transdifferentiation of an adult epidermis. *Development.* 115:587-593.

Rheinwald JG et Green H. 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 6:331-43.

Robinson M, Reynolds AJ, Gharzi A et Jahoda CA. 2001. In vivo induction of hair growth by dermal cells isolated from hair follicles after extended organ culture. *J Invest Dermatol.* 117:596-604.

Robitaille H, Proulx R, Robitaille K, Blouin R et Germain L. 2005. The mitogen-activated protein kinase kinase dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) acts as a key regulator of keratinocyte terminal differentiation. *J Biol Chem.* 280:12732-41.

Rochat A, Kobayashi K et Barrandon Y. 1994. Localisation of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell.* 76:1063-1073.

Rogers G, Martinet N, Steinert P, Wynn P, Roop D, Kilkenny A, Morgan D et Yuspa SH. 1987. Cultivation of Murine Hair Follicles as Organoids in a Collagen Matrix. *Journal of Investigative Dermatology*. 89:369-379.

Rogers G, Winter B, McLaughlan C, Powell B et Nesci T. 1997. Peptidylarginine deiminase of the hair follicle: characterization, localization, and function in keratinizing tissues. *J Invest Dermatol*. 108:700-7.

Rogers GE et Powell BC. 1993. Organization and expression of hair follicle genes. *J Invest Dermatol*. 101:50S-55S.

Rogers GE. 2004. Hair follicle differentiation and regulation. *Int J Dev Biol*. 48:163-70.

Rosenthal DS, Steinert PM, Chung S, Huff CA, Johnson J, Yuspa SH et Roop DR. 1991. A human epidermal differentiation-specific keratin gene is regulated by calcium but not negative modulators of differentiation in transgenic mouse keratinocytes. *Cell Growth Differ*. 2:107-13.

Rothnagel JA et Rogers GE. 1986. Trichohyalin, an intermediate filament-associated protein of the hair follicle. *J Cell Biol*. 102:1419-29.

Rutberg SE, Saez E, Glick A, Dlugosz AA, Spiegelman BM et Yuspa SH. 1996. Differentiation of mouse keratinocytes is accompanied by PKC-dependent changes in AP-1 proteins. *Oncogene*. 13:167-76.

Santos M, Paramio JM, Bravo A, Ramirez A et Jorcano JL. 2002. The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis. *J Biol Chem*. 277:19122-30.

Schlake T, Schorpp M, Maul-Pavicic A, Malashenko AM et Boehm T. 2000. Forkhead/winged-helix transcription factor Whn regulates hair keratin gene expression: molecular analysis of the nude skin phenotype. *Dev Dyn*. 217:368-76.

Schmidt-Ullrich R et Paus R. 2005. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *Bioessays*. 27:247-61.

Schon M, Benwood J, O'Connell-Willstaedt T et Rheinwald JG. 1999. Human sweat gland myoepithelial cells express a unique set of cytokeratins and reveal the potential for alternative epithelial and mesenchymal differentiation states in culture. *J Cell Sci*. 112 (Pt 12):1925-36.

Sellheyer K, Bickenbach JR, Rothnagel JA, Bundman D, Longley MA, Krieg T, Roche NS, Roberts AB et Roop DR. 1993. Inhibition of skin development by overexpression of transforming growth factor beta 1 in the epidermis of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:5237-41.

Sephel GC, Davidson BS et Davidson JM. 1986. Elastin production in human skin fibroblast cultures and its decline with age. *Journal of Investigative Dermatology.* 86:279-285.

Shang L, Pruett ND et Awgulewitsch A. 2002. Hoxc12 expression pattern in developing and cycling murine hair follicles. *Mech Dev.* 113:207-10.

Sieber-Blum M et Grim M. 2004. The adult hair follicle: cradle for pluripotent neural crest stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 72:162-72.

Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF et Szeder V. 2004. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev Dyn.* 231:258-69.

Slominski A, Wortsman J, Plonka PM, Schallreuter KU, Paus R et Tobin DJ. 2005. Hair follicle pigmentation. *J Invest Dermatol.* 124:13-21.

Smith F, Corden L, Rugg E, Ratnavel R, Leigh I, Moss C, Tidman M, Hohl D, Huber M, Kunkeler L, Munro C, Lane B et McLean W. 1997. Missense mutations in keratin 17 cause either pachyonychia congenita type 2 or a phenotype resembling steatocystoma multiples. *Journal of Investigative Dermatology.* 108:220-223.

Smola H, Stark HJ, Thiekotter G, Mirancea N, Krieg T et Fusenig NE. 1998. Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture. *Exp Cell Res.* 239:399-410.

Stasiak P, Purkis P, Leigh I et Lane B. 1989. Keratin 19: predicted amino acid sequence and broad tissue distribution suggest it evolved from keratinocyte keratins. *Journal of Investigative Dermatology.* 92:707-716.

Stasiak PC et Lane EB. 1987. Sequence of cDNA coding for human keratin 19. *Nucleic Acids Res.* 15:10058.

Stelnicki EJ, Komuves LG, Holmes D, Clavin W, Harrison MR, Adzick NS et Largman C. 1997. The human homeobox genes MSX-1, MSX-2, and MOX-1 are differentially expressed in the dermis and epidermis in fetal and adult skin. *Differentiation.* 62:33-41.

Stelnicki EJ, Komuves LG, Kwong AO, Holmes D, Klein P, Rozenfeld S, Lawrence HJ, Adzick NS, Harrison M et Largman C. 1998. HOX homeobox genes exhibit spatial and temporal changes in expression during human skin development. *J Invest Dermatol.* 110:110-5.

Stenn KS et Paus R. 2001. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev.* 81:449-494.

- Strelkov SV, Herrmann H et Aebi U.** 2003. Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays*. 25:243-51.
- Suzuki K, Yamanishi K, Mori O, Kamikawa M, Andersen B, Kato S, Toyoda T et Yamada G.** 2000. Defective terminal differentiation and hypoplasia of the epidermis in mice lacking the Fgf10 gene. *FEBS Lett.* 481:53-6.
- Szabowski A, Maas-Szabowski N, Andrecht S, Kolbus A, Schorpp-Kistner M, Fusenig NE et Angel P.** 2000. c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell.* 103:745-55.
- Szeder V, Grim M, Halata Z et Sieber-Blum M.** 2003. Neural crest origin of mammalian Merkel cells. *Dev Biol.* 253:258-63.
- Takahashi K, Yan B, Yamanishi K, Imamura S et Coulombe PA.** 1998. The two functional keratin 6 genes of mouse are differentially regulated and evolved independently from their human orthologs. *Genomics.* 53:170-83.
- Tam BY, Germain L et Philip A.** 1998. TGF-beta receptor expression on human keratinocytes: a 150 kDa GPI- anchored TGF-beta1 binding protein forms a heteromeric complex with type I and type II receptors. *J Cell Biochem.* 70:573-86.
- Tamai Y, Ishikawa T, Bosl MR, Mori M, Nozaki M, Baribault H, Oshima RG et Taketo MM.** 2000. Cytokeratins 8 and 19 in the mouse placental development. *J Cell Biol.* 151:563-72.
- Tani H, Morris RJ et Kaur P.** 2000. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:10960-5.
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT et Lavker RM.** 2000. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell.* 102:451-61.
- Tetsu O et McCormick F.** 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature.* 398:422-6.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et Jones JM.** 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 282:1145-1147.
- Tkatchenko AV, Visconti RP, Shang L, Papenbrock T, Pruett ND, Ito T, Ogawa M et Awgulewitsch A.** 2001. Overexpression of Hoxc13 in differentiating keratinocytes results in downregulation of a novel hair keratin gene cluster and alopecia. *Development.* 128:1547-58.

Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR et Miller FD. 2001. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol.* 3:778-84.

Toma JG, McKenzie IA, Bagli D et Miller FD. 2005. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells.* 23:727-37.

Tong X et Coulombe PA. 2004. A novel mouse type I intermediate filament gene, keratin 17n (K17n), exhibits preferred expression in nail tissue. *J Invest Dermatol.* 122:965-70.

Tremblay PL, Hudon V, Berthod F, Germain L et Auger FA. 2005. Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am J Transplant.* 5:1002-10.

Trempus CS, Morris RJ, Bortner CD, Cotsarelis G, Faircloth RS, Reece JM et Tennant RW. 2003. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J Invest Dermatol.* 120:501-11.

Trent JF et Kirsner RS. 1998. Tissue engineered skin: Apligraf, a bi-layered living skin equivalent. *Int J Clin Pract.* 52:408-13.

Troyanovsky SM, Guelstein VI, Tchipsheva TA, Krutovskikh VA et Bannikov GA. 1989. Patterns of expression of keratin 17 in human epithelia: dependency on cell position. *J Cell Sci.* 93 (Pt 3):419-26.

Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M et Fuchs E. 2004. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science.* 303:359-63.

van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, Ypma A, Hursh D, Jones T, Bejsovec A, Peifer M, Mortin M et Clevers H. 1997. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. *Cell.* 88:789-99.

van der Flier A et Sonnenberg A. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305:285-98.

van Genderen C, Okamura RM, Farinas I, Quo RG, Parslow TG, Bruhn L et Grosschedl R. 1994. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev.* 8:2691-703.

Waikel RL, Kawachi Y, Waikel PA, Wang XJ et Roop DR. 2001. Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. *Nat Genet.* 28:165-8.

Wan H, Dopping-Hepenstal PJ, Gratian MJ, Stone MG, McGrath JA et Eady RA. 2003a. Desmosomes exhibit site-specific features in human palm skin. *Exp Dermatol.* 12:378-88.

Wan H, Stone MG, Simpson C, Reynolds LE, Marshall JF, Hart IR, Hodivala-Dilke KM et Eady RA. 2003b. Desmosomal proteins, including desmoglein 3, serve as novel negative markers for epidermal stem cell-containing population of keratinocytes. *J Cell Sci.* 116:4239-48.

Wang CS, Goulet F, Auger F, Tremblay N, Germain L et Tetu B. 2001. Production of bioengineered cancer tissue constructs in vitro: epithelium-mesenchyme heterotypic interactions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 37:434-9.

Wang JH, Jia F, Gilbert TW et Woo SL. 2003. Cell orientation determines the alignment of cell-produced collagenous matrix. *J Biomech.* 36:97-102.

Wang WP, Widelitz RB, Jiang TX et Chuong CM. 1999. Msx-2 and the regulation of organ size: epidermal thickness and hair length. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 4:278-81.

Warren R, Chesnut MH, Wong Tk, Otte TE, Lammers KM et Meili ML. 1992. Improved method for the isolation and cultivation of human scalp dermal papilla cells. *Journal of Investigative Dermatology.* 98:693-699.

Watson SAJ, Pisansarakit P et Moore GPM. 1994. Sheep vibrissa dermal papillae induce hair follicle formation in heterotypic skin equivalents. *British Journal of Dermatology.* 131:827-835.

Watt FM. 2002a. The stem cell compartment in human interfollicular epidermis. *J Dermatol Sci.* 28:173-80.

Watt FM. 2002b. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *Embo J.* 21:3919-26.

Wawersik MJ, Mazzalupo S, Nguyen D et Coulombe PA. 2001. Increased levels of keratin 16 alter epithelialization potential of mouse skin keratinocytes in vivo and ex vivo. *Mol Biol Cell.* 12:3439-50.

Webb A, Li A et Kaur P. 2004. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation.* 72:387-95.

Weinberg WC, Goodman LV, George C, Morgan DL, Ledbetter S, Yuspa SH et Lichti U. 1993. Reconstitution of Hair Follicle Development In Vivo: Determination of Follilce Formation, Hair Growth, an Hair Quality by Dermal Cells. *Journal of Investigative Dermatology.* 100:229-236.

- Whitbread LA et Powell BC.** 1998. Expression of the intermediate filament keratin gene, K15, in the basal cell layers of epithelia and the hair follicle. *Exp Cell Res.* 244:448-59.
- Wilson A, Coulombe P et Fuchs E.** 1992. The roles of K5 and K14 head, tail, and R/KLLEGE domains in keratin filament assembly in vitro. *Journal of Cell Biology.* 119:401-414.
- Windoffer R, Woll S, Strnad P et Leube RE.** 2004. Identification of novel principles of keratin filament network turnover in living cells. *Mol Biol Cell.* 15:2436-48.
- Winkelmann RK et Breathnach AS.** 1973. The Merkel cell. *J Invest Dermatol.* 60:2-15.
- Worst PK, Valentine EA et Fusenig NE.** 1974. Formation of epidermis after reimplantation of pure primary epidermal cell cultures from perinatal mouse skin. *J Natl Cancer Inst.* 53:1061-4.
- Wu H, Stanley JR et Cotsarelis G.** 2003. Desmoglein isotype expression in the hair follicle and its cysts correlates with type of keratinization and degree of differentiation. *J Invest Dermatol.* 120:1052-7.
- Yamada S, Wirtz D et Coulombe PA.** 2002. Pairwise assembly determines the intrinsic potential for self-organization and mechanical properties of keratin filaments. *Mol Biol Cell.* 13:382-91.
- Yamamoto N, Tanigaki K, Han H, Hiai H et Honjo T.** 2003. Notch/RBP-J signaling regulates epidermis/hair fate determination of hair follicular stem cells. *Curr Biol.* 13:333-8.
- Yannas IV, Burke JF, Orgill DP et Skrabut EM.** 1982. Wound tissue can utilize a polymeric template to synthesize a functional extension of skin. *Science.* 215:174-6.
- Yannas IV, Lee E, Orgill DP, Skrabut EM et Murphy GF.** 1989. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:933-7.
- Yoon KH, Yoon M, Moir RD, Khuon S, Flitney FW et Goldman RD.** 2001. Insights into the dynamic properties of keratin intermediate filaments in living epithelial cells. *J Cell Biol.* 153:503-16.
- Yoshikawa K, Takahashi S, Imamura Y, Sado Y et Hayashi T.** 2001. Secretion of non-helical collagenous polypeptides of alpha1(IV) and alpha2(IV) chains upon depletion of ascorbate by cultured human cells. *J Biochem (Tokyo).* 129:929-36.

Young R et Oliver R. 1976. Morphological changes associated with the growth cycle of vibrissal follicles in the rat. *Journal of embryology and experimental morphology*. 36:597-607.

Yuspa SH, Kilkenny AE, Steinert PM et Roop DR. 1989. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol.* 109:1207-17.

Yuspa SH, Wang Q, Weinberg WC, Goodman L, Ledbetter S, dooley T et Lichti U. 1993. Regulation of hair follicle development: An *in vitro* model for hair follicle invasion of dermis and associated connective tissue remodeling. *Journal of Investigative Dermatology*. 101:27s-32s.

Zhou P, Byrne C, Jacobs J et Fuchs E. 1995. Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate. *Genes Dev.* 9:700-13.

Zhu A, Haase I et Watt F. 1999. Signaling via $\beta 1$ integrins and mitogen-activated protein kinase determines human epidermal stem cell fate in vitro. *Proceeding of National Academy of Science USA*. 96:6728-6733.

Zhu A et Watt F. 1999. β -Catenin signaling modulates proliferative potential of human epidermal keratinocytes independently of intercellular adhesion. *Development*. 126:2285-2298.