



HAL
open science

Différenciation et culture tridimensionnelle de neurones sensoriels humains et de cellules de Schwann dans un modèle de peau reconstruit par génie tissulaire.

Quentin Muller, Marie-Josée Beaudet, Valérie Chaumet, Thiéry de Serres-Bérard, Sabrina Bellenfant, Vincent Flacher, François Berthod

► **To cite this version:**

Quentin Muller, Marie-Josée Beaudet, Valérie Chaumet, Thiéry de Serres-Bérard, Sabrina Bellenfant, et al.. Différenciation et culture tridimensionnelle de neurones sensoriels humains et de cellules de Schwann dans un modèle de peau reconstruit par génie tissulaire.. *Revue Française d’Histotechnologie*, A paraître. hal-03035596v2

HAL Id: hal-03035596

<https://hal.science/hal-03035596v2>

Submitted on 14 Jun 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

DIFFÉRENCIATION ET CULTURE TRIDIMENSIONNELLE DE NEURONES SENSORIELS HUMAINS ET DE CELLULES DE SCHWANN DANS UN MODÈLE DE PEAU RECONSTRUIT PAR GÉNIE TISSULAIRE.

Quentin MULLER^{1,2}, Marie-Josée BEAUDET¹, Valérie CHAUMET²,
Thierry DE SERRES-BÉRARD¹, Sabrina BELLENFANT¹,
François BERTHOD^{1*}, Vincent FLACHER²

1. Centre LOEX de l'Université Laval (Centre de recherche du CHU de Québec - Université Laval, and Département de Chirurgie, Faculté de Médecine), 1401, 18e avenue, Québec, QC G1J 1Z4, Canada

2. Laboratoire CNRS UPR3572 / I2CT Immunologie, Immunopathologie et Chimie Thérapeutique, Université de Strasbourg, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 2 Allée Konrad Roentgen, 67084 Strasbourg, France

**Correspondance :*

Dr. François BERTHOD

LOEX, Centre de recherche du CHU de Québec- Université Laval
Hôpital de l'Enfant-Jésus, Aile R

1401, 18e avenue, Québec (QC) Canada G1J 1Z4

Phone: +1-418-990-8255, ext. 61705 ; Fax: +1-418-990-8248

E-mail address: francois.berthod@fmed.ulaval.ca

doi.org/10.25830/afh.rfh.2020.32.137.159

DIFFERENTIATION AND TRIDIMENSIONAL CULTURE OF HUMAN SENSORY NEURONS AND SCHWANN CELLS IN A TISSUE-ENGINEERED RECONSTRUCTED SKIN MODEL

ABSTRACT

Pathogens, chemicals and autoimmune diseases may trigger sensory neuron activation in the skin. No *in vitro* model comprises the required features to accurately study these responses. In particular, such models frequently lack an epidermal barrier, necessary to investigate topically applied compounds. This represents a major shortcoming and prevents accurate pre-clinical evaluation of drugs, vaccine adjuvants or potentially irritant chemicals. To resolve this, we developed a tissue-engineered skin of human origin comprising innervation derived from mouse embryonic dorsal root ganglia. Here, we describe a novel procedure that allows differentiation of neurons and Schwann cells from human induced pluripotent stem cells and their incorporation into a 3D skin model. The structure of the resulting co-culture and cell-specific markers were thoroughly characterized. This novel system is currently used for investigations of the neuro-immune crosstalk in the skin and for predictions of its role in cutaneous toxicity, angiogenesis and inflammation.

KEY WORDS

Skin, Axonal migration, Sensory neurons, Schwann cells, Substance P, Induced pluripotent stem cells

RESUME

Les micro-organismes pathogènes, des substances chimiques et des maladies auto-immunes peuvent stimuler l'activation de neurones sensoriels dans la peau. Il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant d'étudier ces réactions de manière fiable. Notamment, les modèles existants n'ont généralement pas de barrière épidermique, qui est nécessaire aux expériences portant sur l'application topique de substances. Ceci représente un défaut important qui limite les évaluations pré-cliniques de médicaments, d'adjuvants vaccinaux ou de substances chimiques potentiellement irritantes. Pour pallier ce manque, nous avons développé un modèle de peau humaine reconstruite par génie tissulaire comprenant une innervation générée à partir de ganglions de la racine dorsale provenant d'embryons de souris. Ici, nous décrivons un nouveau protocole permettant la différenciation de neurones et de cellules de Schwann à partir de cellules souches induites pluripotentes humaines, et leur incorporation dans un modèle 3D de peau. La structure des co-cultures créées ainsi et les marqueurs permettant de caractériser les différents types cellulaires ont été évalués en détail. Ce nouveau système est actuellement utilisé dans nos études des interactions neuro-immunitaires dans la peau et dans la prédiction de leur rôle dans la toxicité cutanée, l'angiogenèse et l'inflammation.

MOTS CLES

Peau, Neurones sensoriels, Cellules de Schwann, Migration axonale, Substance P, Cellules souches pluripotentes induites

INTRODUCTION

Bien que l'objectif principal de l'innervation sensorielle cutanée soit la perception du sens du toucher, de la douleur et de la température, elle joue également un rôle majeur dans la physiologie et la pathologie de la peau. En effet, les neurones sensoriels sont capables de déclencher une inflammation neurogène par la libération de neuropeptides. Ce processus induit une vasodilatation microvasculaire et une augmentation de la perméabilité vasculaire, ainsi qu'un chimiotactisme et une activation des cellules immunitaires [1]. Par conséquent, la réponse neuronale est intimement associée à la réponse immunitaire innée locale tôt après une lésion, pour moduler l'inflammation des tissus. De plus, il a été démontré récemment que les neurones sensoriels sont également impliqués dans la reconnaissance directe de pathogènes par les mêmes voies de signalisation que les cellules immunitaires, telles que les récepteurs de type Toll Like (TLR) [2, 3]. La densité d'innervation cutanée ainsi que la vitesse élevée des potentiels d'action neuronaux constituent des atouts majeurs pour la détection de signaux de danger. Enfin, l'innervation cutanée joue un rôle important dans le développement et l'entretien de pathologies cutanées, comme le psoriasis et la dermatite atopique [4].

La création *in vitro* d'une peau humaine intégrant un réseau nerveux représente un premier pas essentiel vers des études détaillées sur l'interaction des neurones nocicepteurs avec les cellules endothéliales, épithéliales et immunitaires, et dans la régulation de l'inflammation neurogène.

Précédemment, nous avons développé un modèle de peau reconstruite par génie tissulaire, composé d'un derme et d'un épiderme stratifié à partir de cellules humaines et innervé par des neurones sensoriels provenant de ganglions de la racine dorsale (Dorsal Root Ganglia, DRG) d'embryons de souris [5, 6]. Les neurones murins, dont le corps cellulaire reste en bordure externe du derme de la peau reconstruite, projettent un réseau dense de fibres nerveuses à travers le derme et jusqu'à l'épiderme, produisent et sécrètent des neuropeptides suite à une stimulation. Nous avons démontré que la présence de ce réseau neuronal établit des interactions fonctionnelles avec les types cellulaires environnants. La réparation des lésions épidermiques et la croissance des cellules endothéliales s'en trouve favorisée [7, 8]. Les neuropeptides, tels que la substance P (SP), améliorent la réépithélialisation dans un modèle de cicatrisation de la plaie *in vitro*. Bien que, dans ce modèle, les neuropeptides murins activent avec succès les cellules humaines, l'origine animale des neurones pourrait constituer une limitation pour des études

ultérieures, en particulier pour la recherche et le développement en cosmétique en Europe, où l'utilisation de cellules animales est interdite. Pour développer un modèle de peau innervée plus fiable, l'utilisation de neurones sensoriels humains est donc hautement souhaitable. Cependant, la culture de neurones sensoriels humains représente un véritable challenge technique. En effet, ces cellules ne peuvent être extraites intactes qu'à partir des DRG de donneurs cadavériques et restent difficiles à maintenir en culture sur le long terme, ce qui limite leur usage à l'analyse du génome [9, 10].

Nous avons récemment créé un modèle de peau humaine innervé par des neurones dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs), adapté du même modèle contenant des neurones murins [11]. La caractérisation des neurones humains différenciés à partir d'iPSCs a permis de démontrer l'expression de canaux calciques de la sous-famille de canaux cationiques à potentiel transitoire (récepteurs TRP), caractéristiques des neurones sensoriels, régulant la libération de neuropeptides et intervenant dans les processus d'inflammation neurogénique. Grâce à notre nouvelle méthode de différenciation des iPSCs en neurones sensoriels, nous avons pu les introduire dans des cultures tridimensionnelles reproduisant la structure de la peau humaine. La stimulation du modèle par des agonistes exogènes des récepteurs TRP conduit à la libération de SP. Enfin, nous avons démontré que la présence de cellules de Schwann est nécessaire à la croissance axonale à travers le derme du modèle. Nous proposons ici une caractérisation complémentaire de la différenciation des iPSCs et neurones sensoriels et cellules de Schwann, ainsi que dans leurs interactions dans le modèle de peau reconstruite.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Culture cellulaire

Toutes les cellules humaines utilisées dans ces expériences ont été obtenues avec le consentement éclairé des donneurs. L'étude a été approuvée par le comité de révision éthique de la recherche du CHU de Québec-Université Laval et en 2008 par le comité d'éthique de la faculté de Strasbourg, dans le cadre d'une recherche non interventionnelle, hors loi Jardé. Les fibroblastes et kératinocytes ont été isolés à partir de biopsies de peau humaine issues d'interventions de chirurgie esthétique (abdominoplasties), comme décrit précédemment [12, 13]. Les fibroblastes extraits sont cultivés en milieu DMEM (Lonza), supplémenté avec 10% de sérum

de veau fœtal (SVF) (Corning). Les kératinocytes sont cultivés sur une couche de cellules nourricières (lignée NIH-3T3) irradiées à 60Gy avec du DMEM-Ham's F-12 1 :1 (DMEM-F12) (Lonza), supplémenté avec 5% de SVF ; 5 mg/mL d'insuline de pancréas bovin (Sigma-Aldrich) ; 10 ng/mL de facteur de croissance épidermique (EGF) recombinant humain (AUSTRAL Biologicals) ; 0,4 mg/mL d'hydrocortisone (Millipore) et 1.10^{-6} M d'isoproterenol hydrochloride (Sigma-Aldrich). Les cellules endothéliales microvasculaires humaines ont été extraites du prépuce comme décrit précédemment [14] et cultivées dans un milieu de croissance endothélial EBM-2 (Lonza). Tous les milieux de cultures sont supplémentés en 100 U/mL de Pénicilline/Streptomycine (Lonza) et 25 ng/mL de Gentamycine (Lonza).

Extraction des neurones sensoriels à partir d'embryons de souris

Les neurones sensoriels d'origine murine sont extraits à partir de ganglions de la racine dorsale (Dorsal Root Ganglia, DRG) d'embryons de souris BALB/c au stade E12.5, comme décrit précédemment. Les souris gestantes sont sacrifiées par élongation cervicale. Après lavage de l'abdomen à l'alcool, les embryons sont extraits par hystérectomie et placés en PBS ou milieu L15 (Lonza) frais et stérile en boîte de Petri. Sous une loupe binoculaire, la moelle épinière et les DRG sont extraits de l'embryon par incision du dos. Les DRG sont détachés de la moelle épinière à l'aide d'un scalpel. Les DRG sont lavés en PBS ou L15 froids et placés dans 1mL de 60% de L15 ou RPMI1640 (Lonza) et 40% de HBSS 1X (Lonza) avec 2 mg/mL de papaine. Les DRG sont digérés en bain-marie à 37°C en agitation lente pendant 20 minutes. 10mL de RPMI1640 avec 0,5 mL de DNase sont ajoutés pour terminer la dissociation mécanique des DRG pendant 5 minutes. Les cellules sont lavées en DMEM + 10% SVF et peuvent être directement utilisées en culture, pour le modèle 3D ou sur un support préalablement recouvert de 1 µg/mL de Poly-D-lysine (Sigma), avec du milieu DMEM supplémenté 10% SVF avec 10 ng/mL de NGFβ (PeproTech). Toutes les expériences sur des animaux ont été approuvées par le comité de protection des animaux du CHU de Québec-Université Laval conformément aux directives du Conseil canadien de protection des animaux.

Différenciation et culture des neurones sensoriels à partir de cellules souches humaines pluripotentes induites

Les iPSCs ont été reprogrammées par la plateforme iPSC Québec ou par l'équipe du Dr. Stéphane Viville [15]. L'entretien en colonies a été réalisé par la plate-

forme iPSC Québec ou par la plate-forme de culture cellulaire de l'IGBMC. Le protocole de différenciation des iPSCs humaines en neurones sensoriels est une adaptation et une optimisation d'un protocole préétabli [16]. Sept lignées de cellules, issues de cinq donneurs, ont été utilisées lors des phases de test du protocole de différenciation et pour l'optimisation des analyses des neurones. Les résultats présentés proviennent de 4 lignées de cellules générées à la plate-forme iPSC Québec (iPS81280, iPS99988, iPS52300P27, iPS52300-1P37) et de 3 lignées (LVPC3, LVPC118, RVPC145) fournies par le Dr. S. Viville et amplifiées par la plate-forme de culture cellulaire de l'IGBMC (Illkirch, France).

Au jour 0 de la différenciation, les iPSCs sont dissociées en Stempro acutase (Gibco) +Y-27632 (R&D) etensemencées sur un support recouvert de gélatine Geltrex (StemCell). Les cellules sont incubées avec du DMEM-F12 vierge + milieu Neurobasal (StemCell) 1:1 (volume/volume), le tout supplémenté avec 1X de N2 (StemCell); 1X de B27 (StemCell) ; 0,01mM de β -mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific) ; 50 μ g/mL d'acide ascorbique (Sigma-Aldrich); 5 μ M d'Y-27632 (Abcam) ; 1% de L-alanyl-L-glutamine (Corning) ; 1% d'acides aminés non essentiels (Corning) ; 0,01% de Trace elements A (Corning) ; 0,01% de Trace elements B (Corning) ; 0,01% de Trace elements C (Corning) ; 40 μ M de SB431542 (Sigma-Aldrich); 0,2 μ M de LDN193189 (Sigma-Aldrich) ; 3 μ M de CHIR99021 (Sigma-Aldrich). Les cellules en différenciation restent proliférantes. En cas de confluence, l'étape de dissociation et de remise en culture, toujours sur support recouvert de gélatine Geltrex, sera répétée. La confluence des cellules peut survenir aux jours 3, 5 et/ou 6 de la culture.

Au jour 5, le même milieu de culture est conservé pour un changement quotidien, mais cette fois sans SB431542 et LDN193189.

Au jour 7, le même milieu de culture est conservé pour un changement quotidien, mais cette fois sans CHIR99021. C'est le dernier jour où il est possible de procéder à l'amplification des cellules. Si ces dernières sont à confluence ou sur le point de l'être, l'étape de dissociation et de remise en culture doit être répétée.

Au jour 9, le même milieu de culture est utilisé, cette fois supplémenté avec 10 μ M de DAPT (24-diamino-5-phenylthiazole) (Selleckchem) qui sera conservé dans le milieu de culture jusqu'au jour 13. Le DAPT est un bloqueur de la voie des Notch3 et va empêcher la prolifération cellulaire, permettant ainsi la différenciation des cellules en neurones.

Au jour 11, le β -mercaptoethanol, le L-alanyl-L-glutamine, les acides aminés non essentiels et les Trace éléments A, B et C sont enlevés du milieu de culture, qui est également supplémenté avec 20 ng/mL de BDNF recombinant humain/souris/rat (PeproTech) et 10 ng/mL de GDNF recombinant humain (PeproTech). A cette étape, les neurones immatures peuvent être dissociés suivant le même protocole qu'au jour 0. Ils sont introduits dans le modèle 3D pour finir leur différenciation ou sont congelés en solution d'albumine bovine (Sigma-Aldrich) à 20% pH7,4 dans du PBS avec 10% de DMSO (Sigma-Aldrich).

Au jour 13, le DAPT est enlevé du milieu de culture, qui est alors supplémenté avec 10 ng/mL de NGF β . Le milieu de culture complet pour cette dernière étape sera constitué de DMEM-F12 vierge + milieu Neurobasal 1 :1 (volume/volume), le tout supplémenté avec 1X de N2 ; 1X de B27 ; 50 μ g/mL d'acide ascorbique ; 5 μ M de ROCK inhibiteur (Y-27632) ; 20 ng/mL de BDNF ; 10 ng/mL de GDNF ; 10 ng/mL de NGF β .

Ce milieu de culture sera conservé pour toutes les expériences réalisées sur les monocultures de neurones sensoriels dérivés d'iPSCs humaines.

Différenciation et culture des cellules de Schwann différenciées à partir d'iPSC humaines

Le protocole de différenciation des iPSCs humaines en cellules de Schwann est une adaptation et une optimisation d'un protocole précédemment publié [17].

Au jour -1, les iPSCs sont dissociées pendant 5 minutes à 37°C avec 500 μ L de Stempro accutase supplémenté avec 5 μ M de ROCK inhibiteur (Y-27632) et ensemencées à 200 000 cellules/cm² en milieu commercial mTeSR (STEMCELL Technologies).

Du jour 1 au jour 3, le milieu de culture est changé quotidiennement. Dès le jour 1 de culture, le β -mercaptoéthanol est enlevé et les suppléments 1X de B27 sans vitamine A et 35 ng/mL d'acide rétinolique sont ajoutés au milieu.

Au jour 4, les cellules, qui doivent proliférer et être proches de la confluence, sont dissociées à la Stempro accutase et ensemencées sur un support de culture recouvert de 1 μ g/mL de Poly-D-lysine. Elles sont ensemencées à 90 000 cellules/cm² (approximativement 6.10⁶ cellules par T75, pour 12mL de milieu de culture) en milieu commercial STEMdiff Appel (STEMCELL Technologies) supplémenté avec 1X de N2 ; 1X de B27 sans vitamine A ; 5 μ M de Y-27632 ; 1% de L-alanyl-L-glutamine ;

1% d'acides aminés non essentiels ; 0,1% de Trace elements A ; 0,1% de Trace elements B et 0,1% de Trace elements C ; 5 ng/mL de PDGF-bb (Thermo Fisher Scientific) ; 10 ng/mL de β FGF (PeproTech) ; 14 μ M de Forskoline (Sigma-Aldrich) et 192 ng/mL de NRG1 recombinant humain (R&D System). Le milieu de culture est changé quotidiennement jusqu'au 6^{ème} jour de culture.

Au jour 7, la même composition de milieu est conservée, mais le volume passe de 12mL par T75 à 20 mL par T75 et le milieu peut ensuite être changé tous les 2 jours jusqu'au jour 14.

Au jour 14, 5% de SVF est ajouté au milieu et ce dernier est changé quotidiennement jusqu'au jour 17.

Au jour 17, les iPSCs ont terminé leur différenciation en cellules de Schwann et peuvent être dissociées en trypsine 0,25% avec 5mM d'EDTA, congelées en SVF+10%DMSO ou ensemencées sur le modèle 3D. Il est aussi possible de continuer la culture en milieu DMEM-F12 supplémenté avec 10% SVF ; 5 μ M de Forskoline ; 50 ng/mL de NRG1 ; 1X de N2 et 1% de L-alanyl-L-glutamine. Les cellules de Schwann à ce stade sont des précurseurs à la vitesse de prolifération lente.

Préparation du modèle de peau reconstruite en 3D par génie tissulaire

Des éponges à base de collagène et chitosan, préparé comme précédemment décrit [7], sont ensemencées avec 800 000 fibroblastes humains et 800 000 cellules endothéliales (**Figure 1a**), et cultivées en un mélange 1:1 (volume/volume) de milieu EBM-2 et de milieu DMEM, supplémenté par 10% SVF et 50 μ g/mL d'acide ascorbique pendant 7 jours. Ensuite, l'éponge est retournée pour être réensemencée sur la face opposée de l'éponge avec 400 000 fibroblastes humains et 400 000 cellules endothéliales (**Figure 1b**), avec les mêmes conditions de culture que précédemment. Après 7 jours, l'éponge est placée en interface air-liquide sur un support de plastique pour être ensemencée en neurones sensoriels immatures de souris ou en neurones immatures à J11 et cellules de Schwann dérivées d'iPSCs, à raison d'1 million pour chaque type cellulaire (**Figure 1c**). Le milieu de culture DMEM-F12 est supplémenté avec 10% SVF ; 50 μ g/mL d'acide ascorbique et 10 ng/mL de NGF β pour les neurones murins ou supplémenté avec 10% SVF ; 50 μ g/mL d'acide ascorbique ; 5 μ M de Forskoline ; 50 ng/mL de NRG1 ; 5 mM Y-27632 ; 20 ng/mL BDNF ; 10 ng/mL GDNF et 10 ng/mL de NGF β pour les cellules de Schwann dérivées d'iPSCs. Après 14 jours de culture, l'éponge est retournée,

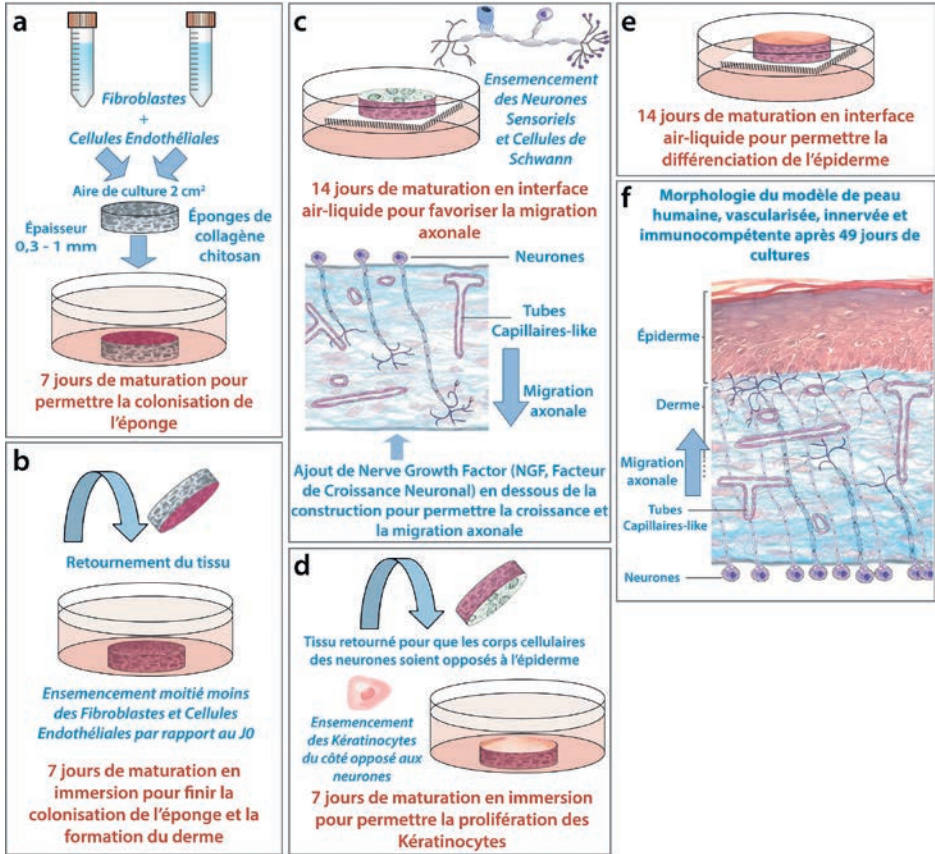


Figure 1 : Représentation schématique des étapes de création du modèle de peau reconstruite.

Des éponges de collagène bovin et de chitosan sont utilisées pour ensemercer des fibroblastes humains et des cellules endothéliales humaines (a, b). Le derme néoformé est placé en interface air-liquide et ensemercé avec des neurones sensoriels provenant de ganglions de la racine dorsale (DRG) d'embryons de souris (BALB/c) au stade E12 ou de neurones humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites (c). L'éponge est retournée pour permettre l'ensemencement de kératinocytes humains (d). Le modèle est placé en interface air-liquide pour permettre la différenciation des kératinocytes dans les différentes couches de l'épiderme (e). Le modèle est complet après environ 50 jours de culture (f, représentation schématique du modèle de peau, basée sur une coloration hématoxyline-éosine d'une coupe transversale du modèle) : une peau humaine reconstruite par génie tissulaire, vascularisée et innervée.

replacée en immersion dans le milieu de culture DMEM-F12 supplémenté avec 5% de SVF ; 50 µg/mL d'acide ascorbique ; 5 mg/mL d'insuline ; 10 ng/mL de EGF ; 0,4 mg/mL d'hydrocortisone et 1.10^{-6} M d'isoproterenol, pour ensemercer 1 million de kératinocytes sur la face de l'éponge opposée aux corps cellulaires des neurones (**Figure 1d**). Chaque milieu de culture est supplémenté avec 10 ng/mL de NGFβ si l'éponge contient des neurones murins ou 5 µM de Forskoline ; 20 ng/mL BDNF ; avec 10 ng/mL GDNF et 10 ng/mL de NGFβ si l'éponge contient des cellules dérivées d'iPSCs. Après 7 jours de culture, l'éponge est placée en interface air-liquide sur support de plastique (**Figure 1e**) jusqu'à la différenciation des kératinocytes en épiderme stratifié, avec le même milieu de culture que précédemment, à l'exception de l'EGF. Le processus de stratification de l'épiderme nécessite un minimum de 14 jours de culture, pour obtenir le modèle de peau reconstruite (**Figure 1f**).

Immunofluorescence

Les cellules sur lamelles ou les peaux reconstruites entières sont fixées avec de la PFA à 4% en solution saline tamponnée au phosphate (phosphate-buffered saline, PBS ; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4), pendant 20 minutes à température ambiante, puis rincées à 3 reprises en PBS. Les cellules sont directement utilisées pour réaliser l'immunomarquage, pendant que les échantillons de peau reconstruite entièrement fixés peuvent être directement utilisés ou inclus en composé de type OCT. L'inclusion se fait de façon à garder les échantillons le plus possible à l'horizontale, pour conserver l'orientation derme-épiderme lors de la coupe des échantillons. Ces derniers sont congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C avant d'être coupés à -20°C dans un cryostat Leica CM3050S. Les coupes, d'une épaisseur de 30 µm pour permettre de visualiser l'arborisation des neurones sur la totalité du derme, sont déposées sur des lames adhésives pour microscopie Superfrost Plus™ (ThermoFisher) et utilisées directement pour l'immunomarquage. Les échantillons (cellules sur lamelles, peau reconstruite entière, ou coupes déposées sur lamelles) sont incubés 1 heure à température ambiante dans la solution d'immunomarquage, composée de PBS, de 2% (masse/volume) d'albumine bovine et 0,1% (volume/volume) de Triton X-100 (Biorad) pour assurer la saturation et la perméabilisation des cellules. Les échantillons sont ensuite incubés toute une nuit avec les anticorps primaires dilués en solution d'immunomarquage, individuellement ou ensemble selon le marquage et leur espèce d'origine. Après 3 rinçages en PBS, les échantillons sont incubés

1 heure à température ambiante, à l'abri de la lumière, avec les anticorps secondaires, ensemble ou séparément en fonction du marquage et de l'espèce des anticorps primaires, dilués au 1:500 et le DAPI au 1:1000 en solution d'immunomarquage. Après 3 lavages en PBS, les échantillons sont montés entre lame et lamelle avec le milieu de montage Fluoromount-G® (SouthernBiotech).

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : monoclonal souris anti- β 3Tubuline TUBB1 (1:1000; BioLegend), monoclonal souris anti-Substance P SP-DE4-21 (1:500; Abcam), monoclonal souris anti-m/r/h Myelin Basic Protein Clone # 932908 (1:500; R&D), monoclonal lapin anti-S100 β EP1576Y (1:500; Abcam), polyclonal poulet anti-Neurofilament Medium 160kDa (1:1000; Abcam), polyclonal poulet anti-Kératine 14 Poly9060 (1:1000; BioLegend), polyclonal chèvre anti-Sox10 (1:500; R&D). Les anticorps secondaires utilisés sont les suivants : Alexa fluor 555 âne anti-souris (1:500; Molecular Probes), Alexa fluor 647 âne anti-souris (1:500; Molecular Probes), Alexa fluor 488 âne anti-lapin (1:500; Molecular Probes), Alexa fluor 647 âne anti-lapin (1:500; Molecular Probes), Alexa fluor 488 âne anti-poulet (1:500; Jackson), Cy3 âne anti-poulet (1:500; Jackson), Alexa fluor 647 âne anti-poulet (1:500; Jackson) et Cy3 âne anti-chèvre (1:500; Jackson).

Les échantillons immuno-marqués ont été observés au microscope Confocal Zeiss LSM700 et les images ont été acquises par le logiciel propriétaire ZEN 2010. La configuration des canaux et de la plage de détection des lasers ont été réalisées avec l'outil Smart Setup de Zen 2010, en fonction des fluorochromes utilisés avec les anticorps secondaires. Les images ont été prises sur plusieurs plans (Z-stack) et en mosaïques (Tile Scan) avec 10% de recouvrement (Overlap 10%) sur chaque plan de la mosaïque. La jonction entre les différents plans de la mosaïque a été faite dans l'outil de traitement Stitching de ZEN 2010 pour obtenir un seul fichier. Les images brutes à l'extension .zvi ou .ism ont été analysées par le logiciel libre de droit ImageJ dans sa version ImageJ-2 Fiji. Les images exportées sont des superpositions de piles d'images (Z-projection) moyennées suivant l'intensité maximum (Max intensity) de leur signal. Le contraste et la luminosité des images ont également été traités sous ImageJ avant leur exportation en .tif, .png ou .jpg.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les neurones humains dérivés des iPSCs produisent de la substance P

Le maintien des iPSCs en culture 2D pendant 19 jours sur support recouvert de Geltrex permet de les différencier en cellules exprimant les caractères phénotypiques de neurones. Cette différenciation est observée quotidiennement en microscopie à contraste de phase, pour contrôler successivement la prolifération des cellules se différenciant, la mortalité cellulaire par l'apparition de débris, l'arrêt de la prolifération après 10 jours de culture, et enfin, après 19 jours de culture, la forme des cellules, qui présentent des extensions axonales (**Figure 2a**).

La confirmation de la différenciation des iPSCs vers une lignée neuronale se fait en immunofluorescence, par l'observation de marqueurs comme la β 3-Tubuline (β 3-Tub), microtubule spécifique des neurones et considéré comme un marqueur pan-neuronal, et le Neurofilament 160 (NF160), filament intermédiaire spécifique des neurones à axone de gros diamètre. Ces marqueurs nous permettent de confirmer la différenciation en neurones après 19 jours de culture. Nous constatons la présence de deux populations de neurones, l'une exprimant uniquement la β 3-Tub et l'autre coexprimant la β 3-Tub et le NF160 (**Figure 2b**). Pour connaître la proportion exacte de cellules s'étant différenciées en neurones, un marqueur nucléaire pan-neuronal comme BRN3A peut être utilisé, comme réalisé précédemment [8].

La présence de neuropeptides comme la Substance P (SP) est un élément important pour montrer l'évolution des neurones vers un phénotype sensoriel. Un marquage en immunofluorescence avec la SP et NF160 révèle deux populations distinctes, les cellules étant strictement positives pour SP ou bien pour NF160 (**Figure 2c**).

A plus fort grossissement, il est possible de montrer que le marquage SP présente un aspect ponctué caractéristique d'un stockage dans des vésicules intracytoplasmiques, comme attendu pour un neurotransmetteur (**Figure 2d**). Il est intéressant de constater que, en culture 2D, les neurones nouvellement différenciés se regroupent dans des structures d'aspect pseudo-ganglionnaires, où sont concentré les noyaux des cellules et d'où partent les prolongements axonaux (**Figure 2**).

Figure 2 : Caractérisation des neurones sensoriels humains dérivés d'iPSCs en culture 2D.

(a) Images à contraste de phase des iPSCs en cours de différenciation en neurones sensoriels à différents stades de culture. Barre d'échelle = 50µm. (b-d) Immunofluorescence des neurones dérivés d'iPSCs après 19 jours de différenciation en 2D. Les neurones sont marqués avec des anticorps reconnaissant le Neurofilament 160 (NF160, en vert dans b, c et d), le marqueur pan-neuronal β -3Tubuline (β 3-Tub, en rouge dans b) et le marqueur spécifique des neurones sensoriels peptidergiques, Substance P (SP, en rouge dans c et d). Les images sont prises à l'objectif 20x (b, c), barre d'échelle = 100µm, ou à l'objectif 63x (d), barre d'échelle = 20µm.

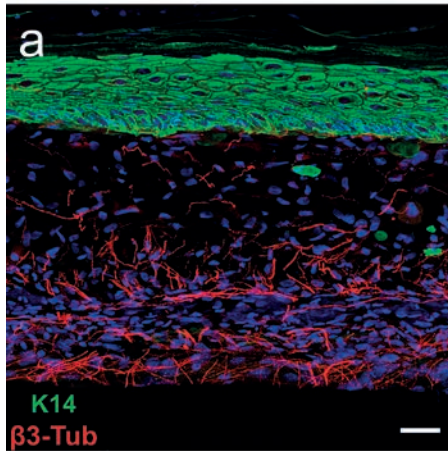
La capacité des neurones humains à réaliser une croissance axonale dépend de la présence de cellules de Schwann

Le jour 11 de la différenciation des iPSCs a été choisi pour l'intégration des neurones prédifférenciés dans la culture 3D sur la base de nos précédents travaux de mise en place du protocole de différenciation. En effet, le suivi des cellules en 2D nous a permis de déterminer la présence de marqueurs démontrant l'engagement des iPSCs vers une lignée neuronale, ainsi que l'absence de marqueurs de prolifération. Il a également été tenu compte de la survie cellulaire lors du détachement des neurones prédifférenciés pour le passage de la culture 2D à la 3D, ainsi que de la possibilité de congélation des cellules pour de futures cultures 3D [11].

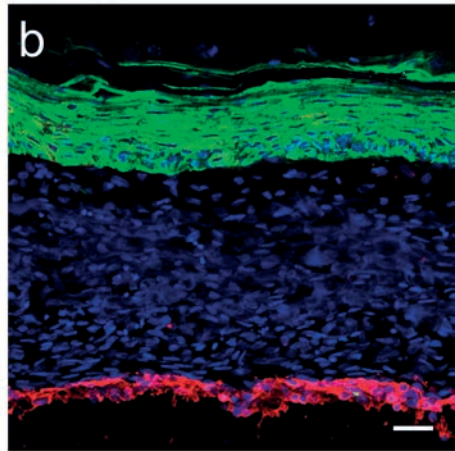
Sur une coupe transversale d'un modèle de peau innervé, le marquage β 3-Tub révèle les axones projetés à partir des corps cellulaires des neurones de souris situés à la base du modèle de peau (**Figure 3a**) [11]. Ces axones sont visibles sur toute l'épaisseur du derme et jusqu'à la base de l'épiderme, marqué spécifiquement par des anticorps reconnaissant la Kératine 14. En revanche, les neurones dérivés d'iPSCs humaines ne présentent pas de croissance axonale dans l'épaisseur du derme (**Figure 3b**). Les neurones des souris sont extraits à partir de DRG d'embryons de souris au stade E12, stade embryonnaire où les neurones, immatures, n'ont pas débuté de croissance axonale en direction des organes périphériques. Dans ces DRG, diverses populations de cellules autres que les neurones sont présents, comme des précurseurs de cellules gliales et cellules de Schwann.

Les cellules de Schwann humaines ont pu être dérivées à partir d'iPSC en parallèle de la génération des neurones sensoriels. En effet, au jour 6 de la culture d'iPSCs, les cellules peuvent être récupérées et utilisées pour poursuivre une différenciation

Neurones + Schwann de souris
(DRGs)



Neurones humains
(iPSCs-NS)



Neurones + Schwann humains
(iPSCs-NS / iPSCs-Sch)

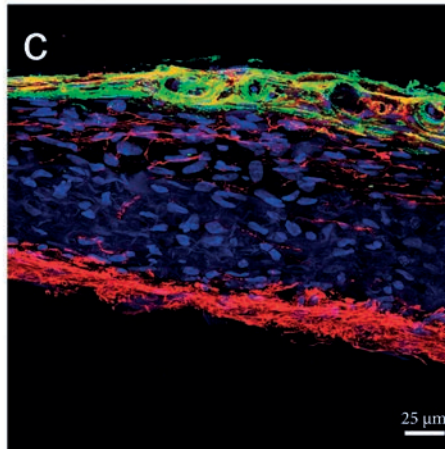


Figure 3 : Caractérisation par immunofluorescence de la capacité des neurones à former un réseau d'axones en 3D dans le modèle de peau reconstruite.

Le modèle de peau reconstruite par génie tissulaire fait d'un épiderme de kératinocytes (marqué avec Kératine 14, K14, en vert), de fibroblastes et de neurones sensoriels dérivés (a) de DRG embryonnaires murins, (b) d'iPSCs (iPSCs-NS) seules ou (c) en présence de cellules de Schwann dérivées d'iPSCs (iPSCs-Sch). Les neurones sont identifiés par un marquage de la $\beta 3$ Tubuline ($\beta 3$ -Tub, en rouge). Barre d'échelle = 25 μ m.

soit en neurones sensoriels, soit en cellules de Schwann. Le suivi du phénotype et de la prolifération des cellules se fait quotidiennement en microscopie à contraste de phase (**Figure 4a**).

Le facteur de transcription Sox-10, spécifique des cellules gliales, est l'unique facteur nécessaire à la génération de ces cellules lors de la formation de la crête neurale. La protéine cytoplasmique liant le calcium S100 β est potentiellement présente dans toutes les cellules de la lignée neuronale. Ces deux marqueurs ne sont donc pas spécifiques aux cellules de Schwann, mais leur co-expression permet de s'assurer de l'orientation prise par la différenciation. La co-expression des marqueurs S100 β et Sox-10 observée par immunofluorescence sur les cellules après 21 jours de différenciation (**Figure 2b**) nous permet ainsi de caractériser des cellules de Schwann matures et immatures.

Dans nos conditions de culture, où sont à la fois présents neurones et cellules de Schwann, il est nécessaire de s'assurer que le marquage S100 β suffit à lui seul à caractériser les cellules de Schwann. Par observation en immunofluorescence, il est possible de constater l'absence du marquage S100 β sur une culture de neurones dérivés d'iPSCs seuls (**Figure 4b**), comparé à la co-culture de cellules de Schwann et neurones dérivés d'iPSCs où le marquage est bien présent mais uniquement sur les cellules de Schwann, puisqu'il n'est pas présent sur les cellules positives pour NF160 (**Figure 4c**). Nous pouvons conclure à la spécificité du marquage S100 β qui suffit à lui seul à caractériser les cellules de Schwann dans nos conditions de culture.

Le co-ensemencement des cellules de Schwann et neurones dérivés d'iPSCs sur le modèle de peau permet d'induire une innervation du derme, visible sur les marquages immunofluorescents en coupes transversales (**Figure 3c**). Les axones formés sont comparables à ceux résultant de l'ensemencement des différentes populations (neurones et précurseurs gliaux) contenues dans les DRG murins (**Figure 3a**) [11]. Les cellules de Schwann apparaissent donc indispensables à l'innervation du modèle de peau par des neurones humains dérivés d'iPSCs, une condition nécessaire dans la perspective de tests par application topique de substances agissant sur les neurones sensoriels.

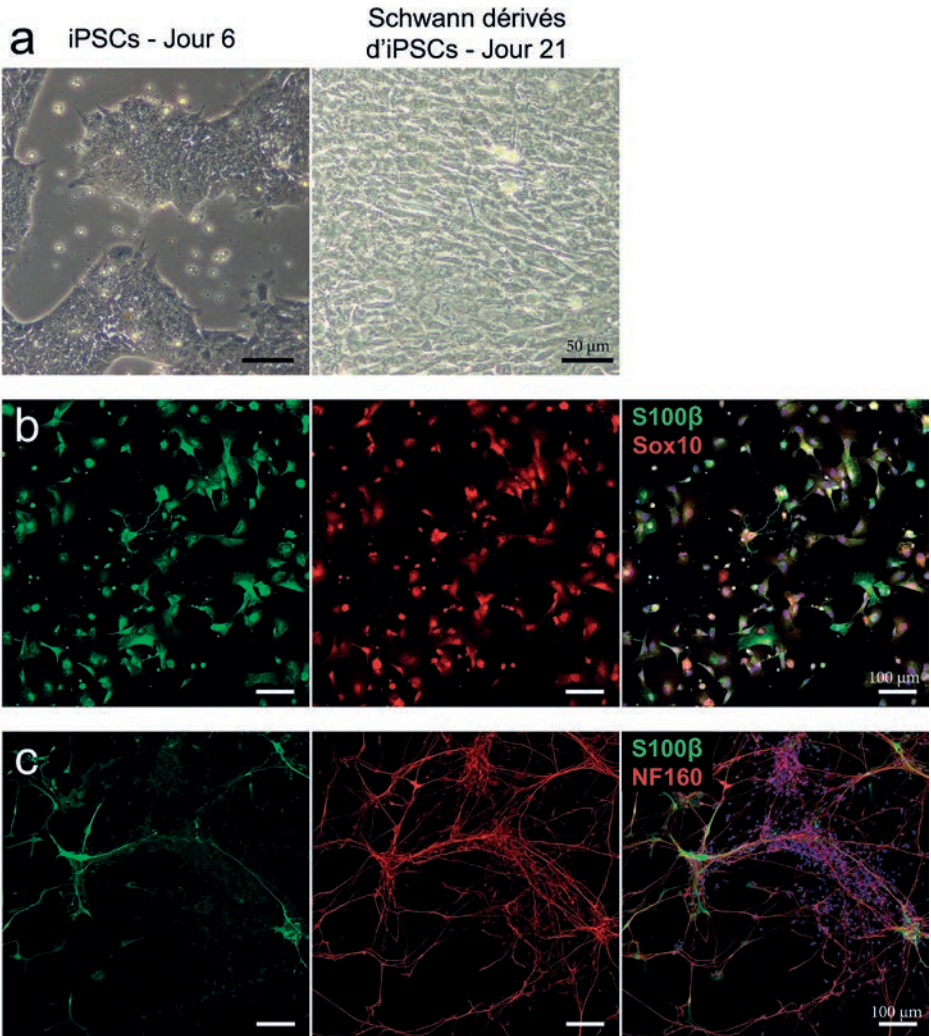


Figure 4 : Caractérisation des cellules de Schwann humaines dérivées d'iPSCs en culture 2D, en absence ou en présence de neurones dérivés d'iPSCs.

Images à contraste de phase des iPSCs en cours de différenciation en cellules de Schwann aux stades jour 6 et jour 21 de la culture. Barre d'échelle = 50µm. (b-d) Immunofluorescence des cellules de Schwann dérivées d'iPSCs après 21 jours de culture (b) et en co-culture avec les neurones dérivés d'iPSCs (c). Les cellules de Schwann sont caractérisées par le marqueur cytoplasmique S100β (en vert dans b et c) et par le facteur de transcription Sox10 (en rouge dans b). Les neurones sont marqués par le Neurofilament 160 (NF160, en rouge en c). Barre d'échelle (b, c) = 100µm.

Les cellules de Schwann produisent de la myéline en co-culture avec les neurones sensoriels.

Une des caractéristiques fonctionnelles des cellules de Schwann est leur capacité à réaliser la myélinisation des neurones. Celle-ci peut s'évaluer par leur expression de la protéine basique de la myéline (MBP). Les cellules de Schwann et neurones dérivés d'iPSCs et placés en coculture 2D sur lamelles pendant 7 jours permettent d'observer, par immunofluorescence, la présence de MBP, révélée à proximité du marquage S100 β caractéristique des cellules de Schwann et ne se colocalisant pas systématiquement avec le marquage NF160 des neurones (données non présentées). Le même type de marquage a été réalisé sur des modèles de peaux ensemencés avec les neurones sensoriels murins, confirmant que les DRG contiennent à la fois neurones et cellules de Schwann et que ces dernières produisent également la MBP (**Figure 5a**). Le long des axones des neurones sensoriels murins, visibles avec NF160, il est possible d'observer ces cellules de Schwann (S100 β positive) productrices de MBP, les 3 marquages se superposant (**Figure 5d**). Le co-ensemencement des cellules de Schwann et des neurones dérivés d'iPSCs dans le modèle de peau montre également la présence de MBP produite par les cellules de Schwann (**Figure 5b**). En revanche, les 3 marquages NF160, S100 β et MBP ne se superposent pas le long des axones des neurones sensoriels humains (**Figure 5e**). Cependant, il est possible de conclure que le marquage MBP est bien spécifique et caractéristique des cellules de Schwann matures, mises en présence des neurones sensoriels, puisque ce marquage est absent lorsque le modèle de peau est ensemencé uniquement avec des neurones dérivés d'iPSCs (**Figure 5c**). Le faible bruit de fond détecté lors du marquage S100 β ne semble pas correspondre aux axones des neurones sensoriels (**Figure 5f**).

CONCLUSION

Nous avons précédemment démontré qu'il était possible de remplacer des neurones murins par des neurones humains dérivés d'iPSCs, pouvant recréer une innervation au travers d'un modèle de peau grâce à l'ajout de cellules de Schwann humaines, également dérivées d'iPSCs [11]. Ici, nous proposons une vision complète du suivi par imagerie du protocole de différenciation, incluant la microscopie en

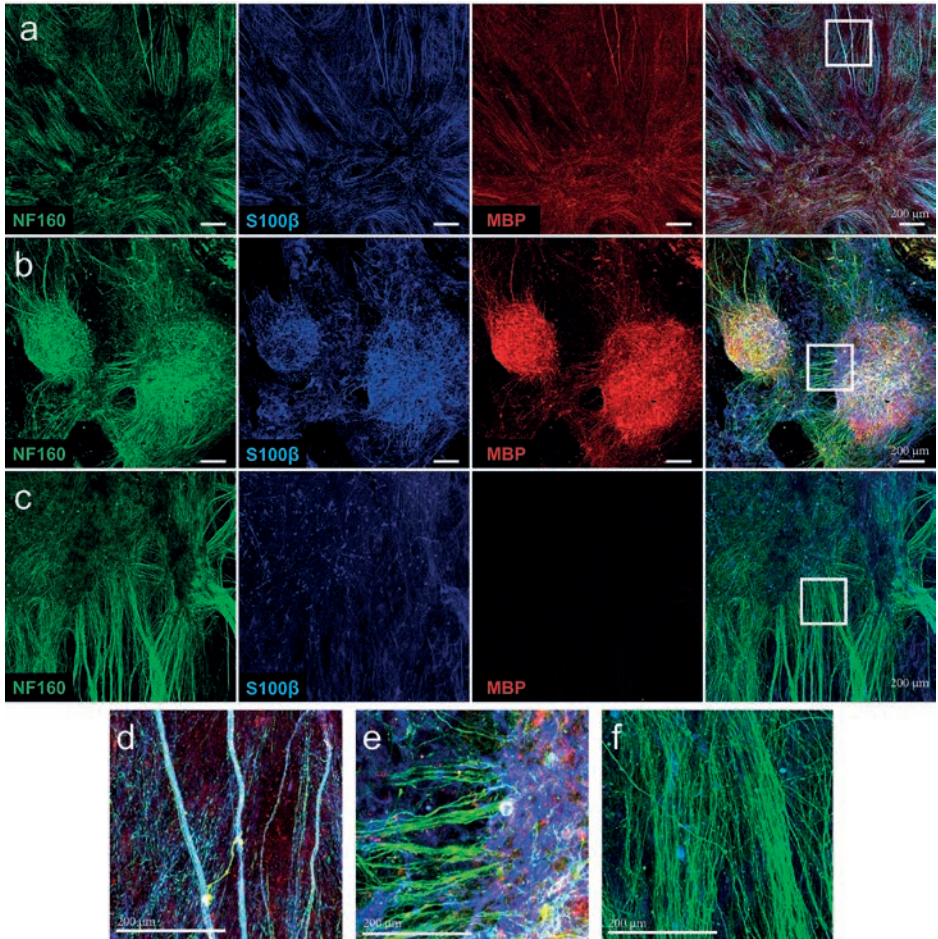


Figure 5 : Caractérisation par immunofluorescence des neurones et cellules de Schwann dérivés d'iPSCs en 2D et 3D dans le modèle de peau reconstruite.

Les neurones sensoriels, murins (DRG) ou humains dérivés d'iPSCs sont marqués avec le Neurofilament 160 (NF160, en vert) et les cellules de Schwann murines (DRG) ou humaines dérivées d'iPSCs sont marquées avec le marqueur spécifique cytoplasmique S100 β (en bleu) et la protéine basique de la myéline (MBP, en rouge). Les neurones de souris (DRG) (a) ; les neurones issus d'iPSCs au Jour 11 et les cellules de Schwann issues d'iPSCs au Jour 11 (iPSCs-NS + iPSCs-Sch) (b) et les neurones seuls issus d'iPSCs au Jour 11 (iPSCs-NS) (c) sont ensemencés dans un modèle de peau reconstruite composé de fibroblastes, cellules endothéliales et kératinocytes. Les encadrés de grossissement sont réalisés sur la superposition des marquages (d pour a ; e pour b ; f pour c). Les images sont prises par le dessous du derme, côté corps cellulaire des neurones. Barre d'échelle = 200 μ m.

contraste de phase des cultures cellulaires. De plus, nous confirmons nos résultats précédemment établis en observant une population hétérogène de neurones dérivés d'iPSCs (population β 3-Tub et NF160 et double positive et population β 3-Tub seule), où le marquage SP suggère que seuls les neurones de faibles diamètres seraient peptidergiques, en adéquation avec les caractéristiques connues des fibres de type C et A δ .

Nous avons également mis en évidence un marquage S100 β spécifique aux cellules de Schwann de notre modèle, pouvant être utilisé pour les distinguer des neurones dans des travaux ultérieurs. Enfin, même si nous avons montré l'expression de MBP par les cellules de Schwann en co-culture 2D avec les neurones et intégrées au modèle de peau innervé, preuve d'un phénotype fonctionnel de ces cellules, ce seul marquage reste insuffisant pour statuer sur la présence d'une gaine de myéline. Une caractérisation devrait pour cela être réalisée en microscopie électronique. Nous concluons cependant qu'une interaction fonctionnelle s'établit entre neurones et cellules de Schwann dérivés d'iPSCs, dans le cadre d'une co-culture en 2D ou dans un environnement 3D.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les Drs. Philippe Tropel (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada) et Stéphane Vville (Institut de Parasitologie et Pathologie Tropicale, Strasbourg, France) pour nous avoir généreusement donné accès à leurs lignées d'iPSCs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. PETERS E.M., *et al.* Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol*, 2006, **126** (9): 1937-1947 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16912691>
2. CHIU I.M., VON HEHN C.A. & WOOLF C.J. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nat Neurosci*, 2012, **15** (8): 1063-1067 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22837035>

3. LIU X.J., et al. TLR signaling adaptor protein MyD88 in primary sensory neurons contributes to persistent inflammatory and neuropathic pain and neuroinflammation. *Sci Rep*, 2016,**6** 28188 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27312666>
4. RIOL-BLANCO L., et al. Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. *Nature*, 2014,**510** (7503): 157-161 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24759321>
5. GAGNON V., et al. Hair follicles guide nerve migration in vitro and in vivo in tissue-engineered skin. *J Invest Dermatol*, 2011,**131** (6): 1375-1378 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21368770>
6. GINGRAS M., PARADIS I. & BERTHOD F. Nerve regeneration in a collagen–chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice. *Biomaterials*, 2003,**24** (9): 1653-1661
7. BLAIS M., GRENIER M. & BERTHOD F. Improvement of nerve regeneration in tissue-engineered skin enriched with schwann cells. *J Invest Dermatol*, 2009,**129** (12): 2895-2900 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19587695>
8. ROGGENKAMP D., et al. Epidermal nerve fibers modulate keratinocyte growth via neuropeptide signaling in an innervated skin model. *J Invest Dermatol*, 2013,**133** (6): 1620-1628 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23283070>
9. MCDERMOTT L.A., et al. Defining the Functional Role of NaV1.7 in Human Nociception. *Neuron*, 2019,**101** (5): 905-919 e908 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30795902>
10. OETJEN L.K., et al. Sensory Neurons Co-opt Classical Immune Signaling Pathways to Mediate Chronic Itch. *Cell*, 2017,**171** (1): 217-228 e213 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28890086>
11. MULLER Q., et al. Development of an innervated tissue-engineered skin with human sensory neurons and Schwann cells differentiated from iPS cells. *Acta Biomater*, 2018,**82** 93-101 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30316025>
12. GERMAIN L., et al. Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns*, 1993,**19** (2): 99-104 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8471157>
13. SCHAEFFER E., et al. Dermal CD14(+) Dendritic Cell and Macrophage Infection by Dengue Virus Is Stimulated by Interleukin-4. *J Invest Dermatol*, 2015,**135** (7): 1743-1751 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25521455>
14. BLAIS M., et al. Sensory neurons accelerate skin reepithelialization via substance P in an innervated tissue-engineered wound healing model. *Tissue Eng Part A*, 2014,**20** (15-16): 2180-2188 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24716723>

15. JUNG L., et al. ONSL and OSKM cocktails act synergistically in reprogramming human somatic cells into induced pluripotent stem cells. *Mol Hum Reprod*, 2014,**20** (6): 538-549 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24501429>
16. MAURY Y., et al. Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat Biotechnol*, 2015,**33** (1): 89-96 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25383599>
17. FARONI A., et al. Differentiation of adipose-derived stem cells into Schwann cell phenotype induces expression of P2X receptors that control cell death. *Cell Death Dis*, 2013,4 e743 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23887634>