



HAL
open science

Striae distensae : évaluation d'un nouveau traitement combiné : étude in vitro et in vivo

Simone La Padula

► To cite this version:

Simone La Padula. Striae distensae : évaluation d'un nouveau traitement combiné : étude in vitro et in vivo. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est; Università Campus Bio-Medico di Roma, 2020. Français. NNT : 2020PESC0068 . tel-03565380

HAL Id: tel-03565380

<https://theses.hal.science/tel-03565380>

Submitted on 10 Feb 2022

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.



**UNIVERSITE PARIS-EST
EN COTUTELE AVEC L'UNIVERSITÉ CAMPUS BIOMEDICO DI ROMA (ITALIE)**

MEMOIRE DE THÈSE DE SCIENCE

Présenté et soutenu publiquement le 21 Décembre 2020

Par le Dr La Padula Simone

Né le 26 Novembre 1983

À Vico Equense, Naples (Italie)

**STRIAE DISTNSAE. ÉVALUATION D'UN NOUVEAU TRAITEMENT
COMBINÉ : ÉTUDE *IN VITRO* ET *IN VIVO***

DIRECTRICE DE THÈSE: Madame Barbara HERSANT

CODIRECTION DE THÈSE: Professeur Jean Paul Meningaud, Professeur Paolo Persichetti,

JURY :

Docteur Baptiste Bertrand

Professeur Francesco D'Andrea

Professeur Fabrizio Schonauer

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

Remerciements.....p4

Résumé.....p5

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La peau et les fibroblastes.....p8

2. Les striae distensae.....p12

PARTIE EXPERIMENTALE – ÉTUDE *IN VITRO*

1. Introduction..... p13

2. Matériel et Méthodes.....p21

3. Résultats.....p35

ÉTUDE *IN VIVO*.....p50

4. Discussion.....p57

5. Perspectives futuresp59

REFERENCES.....p60

Abréviations :

alpha SMA : alpha actine du muscle lisse (actine alpha-musculaire lisse)

ARNm : Acide Ribonucléique Messenger

GF : Grow Factors (facteurs de croissance)

MEC : matrice extracellulaire

PN : Peau Normale (sans vergetures)

PrP : Plasma riche en Plaquettes

PS :Peau Saine (sans vergetures)

RT-PCR : Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction

SA : Striae Albae

SD :Striae distensae

SR : Striae Rubrae

Remerciements

Je tenais à remercier les personnes qui m'ont suivies et aidé dans la réalisation de ce projet et en particulier :

Christophe Chesné pour avoir cru en ce projet et son soutien constant.

Agnes Jamin pour son aide pendant les manipulations au laboratoire.

Ismail et toute l'Équipe de Biopredic International.

Le Docteur Barbara Hersant pour son énorme soutien, pour la révision et la correction du projet.

Le Professeur Jean Paul Meningaud pour l'approbation, la révision et la correction du projet.

Le Professeur Persichetti pour avoir cru en moi, pour son soutien et son aide sur le choix du sujet de thèse.

Le Professeur D'Andrea pour son soutien et pour avoir cru en moi; grâce à lui j'ai débuté ma carrière universitaire en Italie à Naples, ma ville d'origine, en Juillet 2020.

Le Professeur Fabrizio Schonauer, grâce à lui j'ai découvert en 2006 ma passion pour la chirurgie plastique.

Le Docteur Baptiste Bertrand pour avoir accepté de réviser mon travail et être le rapporteur de ma thèse.

Mes collègues et amis qui ont été à mes côtés et qui m'ont aidé et soutenu pendant la réalisation de ce projet : Chiara (pour être venue souvent avec moi à Rennes ou j'ai réalisé une partie des manip, et pour sa collaboration dans la réalisation de deux articles sur le sujet de cette thèse) Titti, Giovanni et Edoardo qui a donné un échantillon de sa graisse pour faire un test avant la réalisation de l'étude *in vivo*.

Toute l'équipe du Service de Chirurgie Plastique du CHU Henri Mondor

Brigitte David pour son soutien et son aide

RÉSUMÉ

Introduction

Les Vergetures ou Striae distensae (SD) se manifestent cliniquement sous forme de stries parallèles, perpendiculaires aux lignes de tension de la peau. Les SD évoluent en deux phases cliniques, une phase inflammatoire initiale ou striae rubrae (SR) et une phase chronique ou striae albae (SA). Les fibroblastes semblent jouer un rôle clé dans la pathogenèse des vergetures. Les résultats des études expliquant l'étiologie des SD sont discordants, c'est pourquoi nous avons essayé d'analyser le phénotype et la fonction des fibroblastes dans des lésions initiales et anciennes, et les comparer à ceux de la peau saine (PS) du même patient. Actuellement, il n'y a pas de traitement curatif pour les SA. Le laser fractionné non ablatif permet d'obtenir des résultats satisfaisants, mais seulement sur les lésions initiales (les SR). Les buts de cette étude étaient : décrire et analyser les fibroblastes des vergetures et les différences entre les fibroblastes issues des SR et des SA en comparaison aux fibroblastes de tissus sains du même donneur ; tester des traitements innovants (ascorbate de sodium et PrP) sur des cultures cellulaires de fibroblastes issues des SA *in vitro* ; la réalisation d'une étude *in vivo* utilisant la combinaison de PRP + nanofat.

Matériel et Méthodes

Afin de caractériser les fibroblastes de SD, l'expression d'*alpha actine du muscle lisse (alpha SMA)* et les forces contractiles générées par les fibroblastes issus de la PN des SR et des SA ont été étudiées grâce à l'utilisation d'un modèle de derme équivalent *in vitro*, le **lattice de collagène**. Les produits testés ont été les suivants :

PrP standard 1% et 5%, PrP concentré 1% et 5%, ascorbate de sodium (100µg /M), PrP standard 1% et 5% + ascorbate de sodium (100µg /M), PrP concentré 1% et 5% + ascorbate de sodium (100µg /M), aucun traitement (contrôle). Pour l'étude *in vivo* les produits testés ont été : PRP, PRP 20% + nanofat 80%, nanofat.

Résultats

En comparaison avec les fibroblastes de la PS, les fibroblastes des SR ont développé une force de contraction beaucoup plus intense. Cette différence a été statistiquement significative. Par rapport aux fibroblastes de la PN, une augmentation significative de l'alpha SMA a été observée pour les fibroblastes des SR ($P < 0,001$). Il n'y avait pas de différence significative entre les fibroblastes de SA et les fibroblastes de PN. La stimulation combinée par PrP standard et ascorbate de sodium des fibroblastes issus des SA a montré une reprise de l'activité métabolique de ces cellules par une augmentation de production de collagène de type I et de la prolifération cellulaire. Le PrP 1% et 5% et l'ascorbate de sodium ont contribué après 24 et 48 h d'incubation à augmenter la biosynthèse du collagène chez les fibroblastes issus des SA, de façon significative par rapport au contrôle. Un effet plus important a été observé pour les cultures cellulaires qui ont reçu un traitement combiné PrP-Ascorbate de Sodium ($p < 0.0001$). Le PrP concentré a montré avoir un effet non significatif sur la production de collagène ($p = 0.123$). Des résultats superposables ont été observés avec la RT-PCR. Après 24 heures d'incubation avec du PrP 1% et PrP5% + Ascorbate de sodium, la viabilité cellulaire était augmentée de 140% et 151% et de 156 et 178% après 48 heures respectivement par rapport au contrôle. Concernant l'étude *in vivo* : le PrP et le nanofat ont contribué à augmenter la biosynthèse du collagène des zones traitées de façon significative par rapport au contrôle. Un effet plus important a été observé pour les SA traitées par le traitement combiné PrP-Nanofat ($p < 0.0001$).

Conclusions

La recherche d'une stratégie efficace pour le traitement des SD et surtout des SA est nécessaire car la survenue des vergetures entraîne un retentissement psycho-social important. Nos résultats prometteurs nécessitent d'ultérieurs essais pour pouvoir confirmer la reproductibilité de cette stratégie thérapeutique notamment *in vivo*.

Keywords : Stretch marks, platelet rich plasma, ascorbic acid, nanofat, fibroblast.

LA PEAU

L'origine embryologique de l'épiderme est l'ectoderme, couche superficielle qui recouvre l'embryon, et qui donne également naissance au système nerveux central et périphérique et aux bulbes pileux. Cette connexion embryologique entre la peau et le système nerveux a certainement des conséquences physiopathologiques importantes sur l'homéostasie et les processus de réparation cutanée. Le derme, quant à lui, provient des somites qui se différencient à partir du mésoderme. Les interactions entre l'épiderme et le derme, entre, principalement, les kératinocytes et les fibroblastes, sont capitales; l'épiderme n'étant pas vascularisé, sa croissance et sa différenciation ainsi que sa régénération dépendent du **derme** qui doit pouvoir, grâce à un arbre vasculaire correctement irrigué, lui fournir tous les nutriments nécessaires. Dans le derme, **les fibroblastes** jouent des rôles majeurs, notamment de par la sécrétion d'une matrice extracellulaire qui, outre ses rôles de soutien, intervient également dans la migration des cellules et gère les réservoirs de facteurs de croissance qu'elle contient. De plus, les fibroblastes qui établissent des dialogues avec non seulement la vascularisation, mais également l'innervation, sont des cellules clés dans le maintien des équilibres qui concourent à la bonne santé de la peau. Enfin, lorsqu'ils se transforment en **myofibroblastes**, ils deviennent alors des acteurs essentiels dans la réparation tissulaire cutanée (1).

LA FONCTION DES FIBROBLASTES ET DES MYOFIBROBLASTES

Les fibroblastes et les myofibroblastes sont des acteurs principaux dans les processus de réparation cutanée et le compartiment dermique est un élément essentiel de cet organe qu'est la peau. La bonne santé de l'épiderme dépend en partie de la qualité des nutriments et des informations qui lui parviennent du derme. En effet, de part et d'autre de la jonction dermo-épidermique (JDE), un dialogue intense entre ces deux compartiments existe. Différentes

sous-populations fibroblastiques ont été mises en évidence dans le derme. Il est possible de les distinguer, en fonction bien sûr de leur localisation (fibroblastes papillaire ou réticulaire), mais également en fonction de leur capacité à jouer différents rôles notamment au cours de la réparation cutanée. Récemment en effet, il a été montré que des sous-populations dermiques présentent des capacités de différenciation particulières (2). Il est couramment admis que les myofibroblastes se forment à partir des fibroblastes dermiques présents dans les zones non lésées en profondeur ou en périphérie de la zone lésée. Cependant, d'autres sources peuvent être impliquées, notamment lorsque la lésion est très étendue et c'est bien sûr le cas des brûlures (dans ce cas, les myofibroblastes peuvent dériver des cellules de la moelle osseuse) (3). Par ailleurs, et c'est un aspect extrêmement important, les fibroblastes et les myofibroblastes sont liés à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de mécanotransducteurs complexes. Ainsi, la qualité de la matrice extracellulaire (notamment les protéines et leur composition en acides aminés) entourant ces cellules, mais également sa rigidité, influencera drastiquement le phénotype cellulaire. Une matrice rigide favorisera l'expression d'actine alpha-musculaire lisse dans les myofibroblastes et renforcera leurs propriétés contractiles (4). Par ailleurs, la rigidité de la matrice influencera également la biodisponibilité du TGF- β 1. Ainsi, les myofibroblastes sont les principaux acteurs dans les processus de rétraction qui surviennent dans les cicatrices hypertrophiques. Aarabi et al. ont montré en utilisant un modèle pertinent qu'un stress mécanique est capable d'induire chez le rongeur une lésion de type hypertrophique (il faut savoir que les animaux ne développent jamais de cicatrice hypertrophique) (5). De ce fait, il faut particulièrement prendre en compte le rôle des forces de traction dans le traitement des cicatrices hypertrophiques. Récemment, des dispositifs médicaux sont apparus qui "gèrent" l'environnement mécanique de la plaie pour éviter le développement d'une cicatrice hypertrophique soulignant l'importance des tensions mécaniques qui doivent être prises en compte dans la gestion des cicatrices (6).

Enfin, les recherches sur les cellules souches, et particulièrement les cellules souches du derme et du tissu adipeux, pourraient permettre la mise en place de thérapies innovantes pour la cicatrisation notamment des grands brûlés. Les fibroblastes stimulées par des concentrations appropriées de Plasma riche en Plaquettes (PrP) grâce aux facteurs de croissance dérivées des plaquettes semblent aussi un traitement prometteur pour stimuler la formation de la MEC et du tissu dermique autologue en favorisant la cicatrisation des zones lésées. La stimulation et la prolifération des fibroblastes pourra être utile comme a été récemment démontré (étude in vitro sur la co-culture de keratinocytes et fibroblastes) la prolifération de keratinocytes et à la restauration du tissu cutané chez le grand brûlé (7).

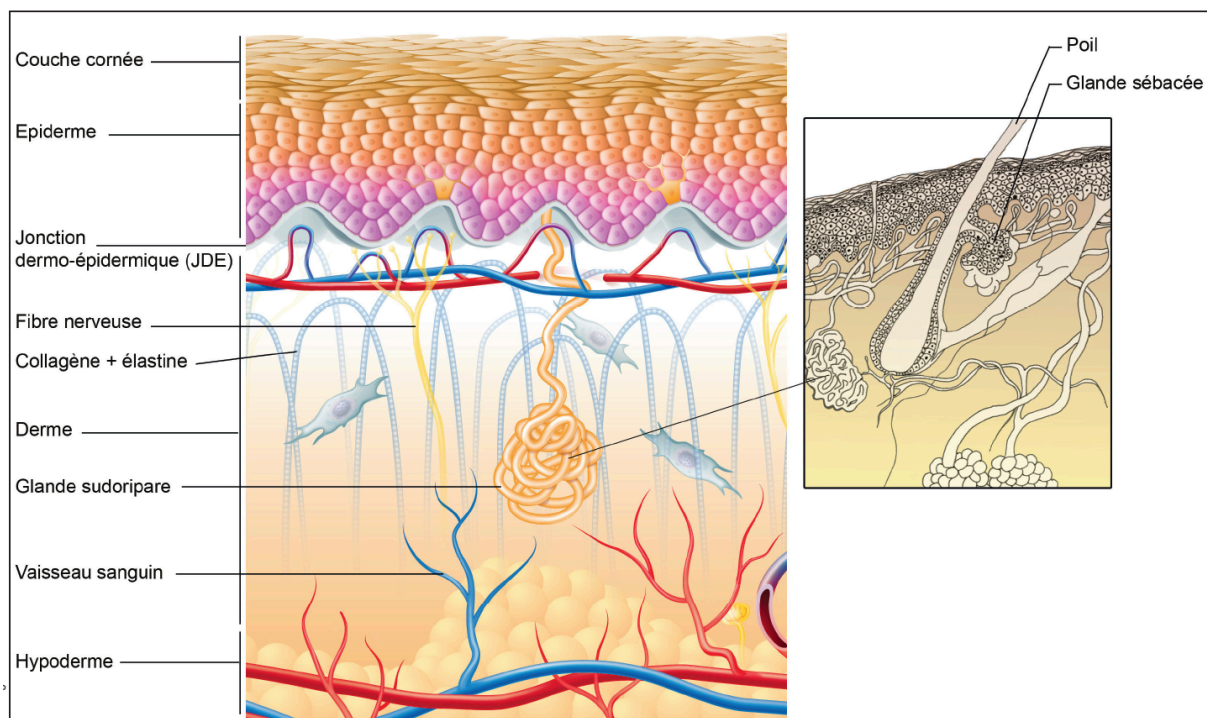


Figure 1. La peau humaine, une architecture complexe.

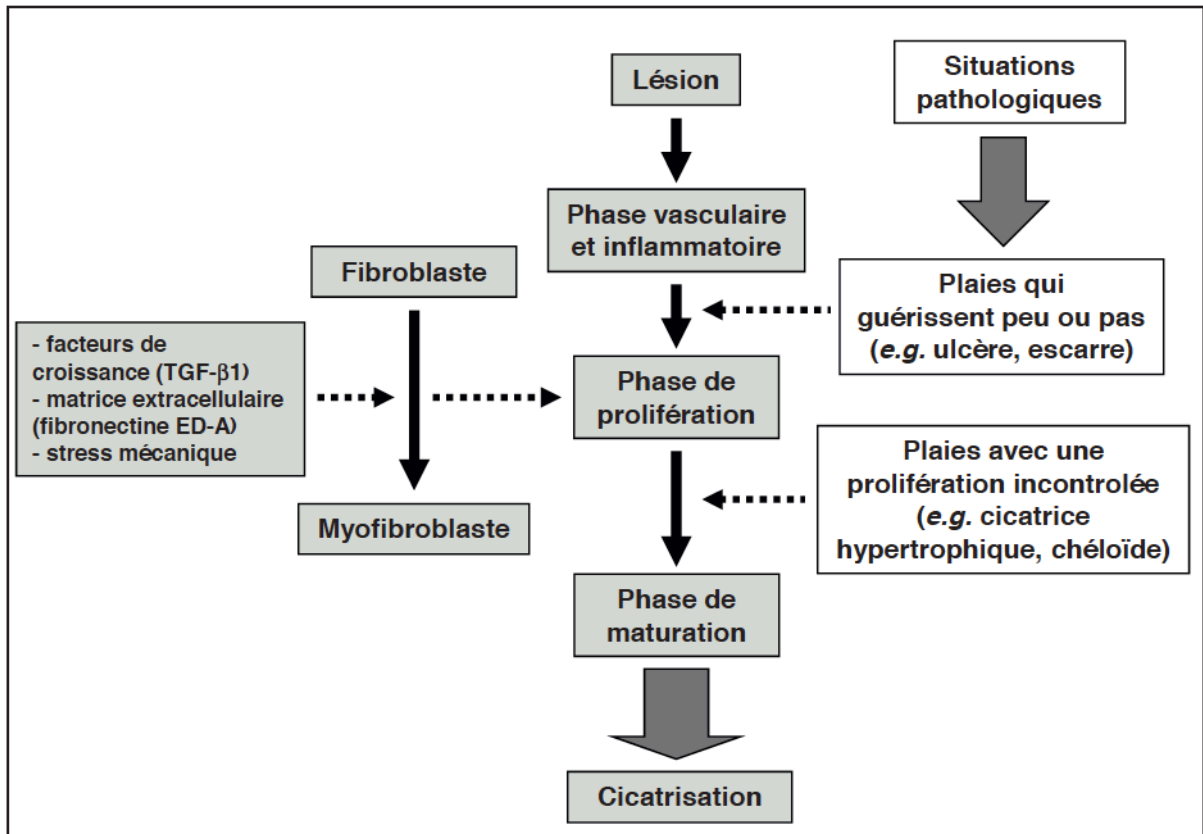


Figure 2. Différents mécanismes impliqués dans la réparation cutanée normale ou pathologique.

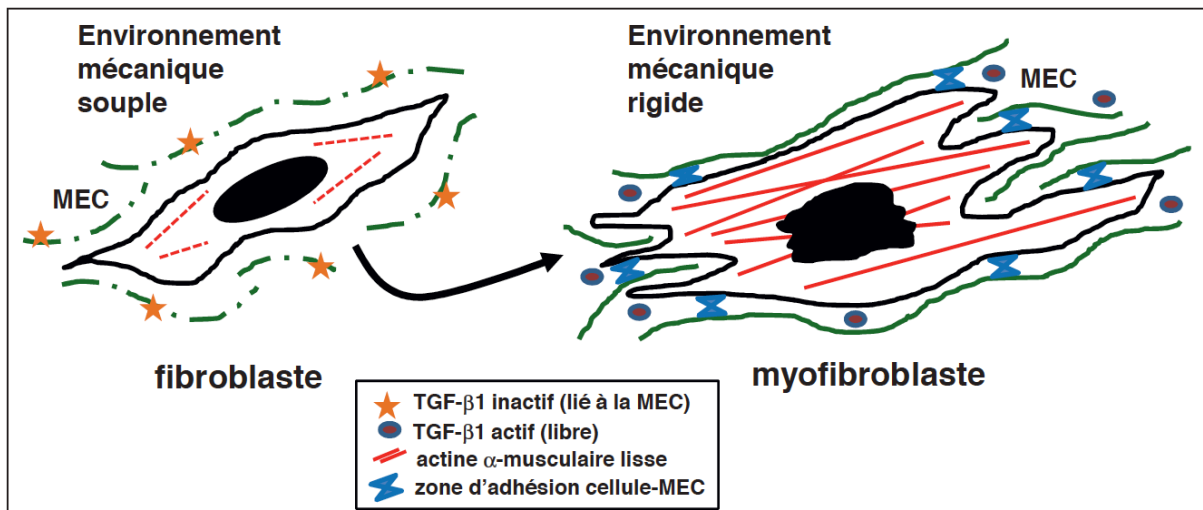


Figure 3. Schéma indiquant les modifications morphologiques et fonctionnelles observées lors de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. La matrice extracellulaire (MEC) qui traduit le caractère plus ou moins rigide de l'environnement mécanique est particulièrement impliquée grâce à la qualité des interactions cellule-matrice. Le *Transforming Growth Factor* (TGF)-β1 peut passer d'une forme inactive à une forme active selon la rigidité de l'environnement matriciel.

LES STRIAE DISTENSAE

Les Vergetures ou Striae distensae (SD) se manifestent cliniquement sous forme de stries parallèles, perpendiculaires aux lignes de tension de la peau. Les SD évoluent à travers deux phases cliniques, c'est-à-dire une phase inflammatoire initiale ou une phase de striae rubrae (SR) et une phase chronique ou striae albae (SA) (8).

Les vergetures apparaissent notamment lors d'hyperfonctionnement cortico-surrénalien ou lors de l'administration de corticoïdes par voie générale ou locale. Elles apparaissent aussi lors de l'augmentation rapide de volume d'un organe ou du tissu adipeux sous-cutané (grossesse, prise de poids) exposant la peau à un étirement important. Ces deux facteurs étiologiques sont souvent associés (9). Les vergetures sont des cicatrices définitives et leur pathogénie reste mal connue (10).

Récemment Youssef et al. (11) ont démontré une augmentation significative de l'expression du récepteur des androgènes et des glucocorticoïdes dans les lésions précoces (SR), tandis que une expression déclinée du récepteur des estrogènes a été observée. Les résultats obtenus par ces auteurs soulignent l'importance de ces récepteurs hormonaux dans le développement des stries. Ces informations sont importantes pour étudier des nouvelles cibles pour la prévention et le traitement des SD.

PARTIE EXPERIMENTALE – ÉTUDE *IN VITRO*

STRIAE DISTENSAE : ETUDE *IN VITRO* DES FIBROBLASTES ET EVALUATION *IN VITRO* DE TRAITEMENTS PAR ASCORBATE DE SODIUM EN ASSOCIATION AU PLASMA RICHE EN PLAQUETTES

INTRODUCTION

Les SD évoluent en deux phases cliniques: une phase inflammatoire initiale, phase de striae rubrae (SR) et une phase chronique ou des striae albae (SA). Les SD représentent la conséquence des lésions du tissu conjonctif dermique qui est associée, au début, à des phénomènes inflammatoires qui évoluent ensuite dans le sens cicatriciel. Ce qui sous-tend l'apparition de SD semble être une modification qualitative et quantitative du collagène dermique suite à certaines anomalies des fonctions métaboliques des fibroblastes.

L'événement initial semble être une distension cutanée excessive qui implique des dommages mécaniques des composants du derme. Les changements initiaux trouvés en microscopie électronique sont la dégranulation des mastocytes, la présence de macrophages activés associés avec une élastolyse modérée du derme. Ces observations suggèrent que la production et la libération d'élastases de mastocytes représente un des phénomènes initiaux parmi les plus importante dans l'apparition des striae (12). À partir du moment où les striae commencent être cliniquement visibles, les fibres de collagène commencent à montrer des signes d'altération structurale et certaines anomalies des fibroblastes sont déjà évidentes. A ce stade, les mastocytes disparaissent. On peut observer un œdème du derme, une infiltration lymphocytaire et une augmentation des glycosaminoglycanes (13).

Contrairement aux lésions inflammatoires qui représentent la phase initiale des SR, les SA sont caractérisées par une atrophie de l'épiderme, des anomalies du collagène, et sont

superposables (au microscope) au tissu dermique cicatriciel. Cependant les résultats des études qui visent à expliquer l'étiologie des SD sont assez discordantes, raison pour laquelle nous avons voulu essayer de clarifier certains aspects concernant les fibroblastes dans les lésions initiales et anciennes, et les comparer à ceux de la peau saine du même patient.

Dans tous les cas, les **fibroblastes** semblent jouer un rôle clé dans la pathogenèse du SD (14).

La survenue de vergetures est un événement avec un fort retentissement psycho-social surtout pour les femmes, ce d'autant que celles-ci ne sont pas considérées par les médecins comme une priorité médicale. Il n'existe que peu d'études, et dont les résultats sont contradictoires sur une thérapie ciblée. Actuellement, il n'y a pas de traitement résolutif pour le SD (12-14).

Une approche qui semble être prometteuse est celle de la médecine régénérative qui est principalement basée sur l'utilisation de plasma riche en plaquettes (PrP) et micro-needling (15). Une autre méthode qui semble améliorer l'aspect de la peau avec SD est le laser fractionné non ablatif. Néanmoins ce traitement permet d'obtenir des résultats satisfaisants seulement sur les lésions initiales (les SR) (16).

Nous croyons que la stimulation des fibroblastes pourrait améliorer, voir résoudre ces lésions.

Les fibroblastes dermiques et leur stimulation

Il a été supposé que les fibroblastes des SA soient dans un état de quiescence et produisent des quantités inférieures de collagène par rapport aux fibroblastes de la peau saine (11-15). Il a été démontré que le plasma riche en plaquette (PrP) et que l'acide ascorbique peuvent augmenter la production de collagène chez les fibroblastes normaux (17). Aucune étude n'a jamais testé les effets de la stimulation combinée par le PrP et l'acide ascorbique sur des cultures de fibroblastes des SD in vitro, et surtout les méthodes de préparation du PrP et la concentration plaquettaire (qui représentent des éléments fondamentaux pour la validité et reproductibilité des résultats) ne sont pas décrits (17-19).

Le **Plasma riche en plaquettes (PRP)** est défini comme un échantillon de sang avec une concentration de plaquettes (PLT) supérieure aux valeurs de base. L'échantillon de PRP est obtenu par centrifugation du sang et séparation de la fraction sanguine appropriée. En fonction de la méthode utilisée, il peut contenir 1,3 à 8 fois la concentration de PLT dans le plasma que dans le sang total (18).

Le PRP est également une riche source de nombreuses cytokines et facteurs de croissance (GF). Les plaquettes (PLT), et en particulier les facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF) contenus dans leurs granules alpha, sont responsables des effets biologiques de PRP (19). L'interaction entre ces GF et les récepteurs de surface sur les cellules cibles active les voies de signalisation intracellulaires, ce qui induit l'expression de gènes nécessaires à des processus régénératifs tels que la prolifération cellulaire et la formation de matrice extracellulaire (20).

Le composant le plus abondant du tissu conjonctif responsable du maintien de son architecture et de son intégrité est le collagène.

Le **collagène** joue également un rôle important dans l'interaction avec les récepteurs des intégrines à la surface cellulaire, à travers lesquels il peut participer à la régulation de l'expression génique, à la différenciation, à la croissance et à d'autres fonctions cellulaires.

L'interaction est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette, le transport ionique intracellulaire, le métabolisme des lipides, l'activation des kinases, l'expression des gènes, la régulation du cycle cellulaire et les métastases du cancer (21).

Outre le rôle de protéine structurale, le collagène est un ligand des récepteurs des intégrines qui transmettent des signaux pour la croissance cellulaire, la régulation positive de l'activité de la prolidase et la stimulation de la biosynthèse du collagène. Tous ces processus sont nécessaires à la régénération des tissus pendant la cicatrisation. Le PRP aide efficacement à la réparation des tissus en stimulant le métabolisme du collagène (22). On en sait peu sur le

mécanisme du PRP sur la biosynthèse du collagène. L'intérêt pour le PRP est axé sur son application à la cicatrisation des tissus lésés.

Certains aspects peuvent être communs aux tissus lésés et aux vergetures : une phase inflammatoire qui caractérise les SR et une atrophie cutanée (cicatrice pathologique) responsable des SA.

Il nous semble clair que l'efficacité de ce processus dépend de la manière dont le PrP est préparé. Cependant, malgré les nombreux avantages associés au PRP et les résultats prometteurs rapportés pour son potentiel thérapeutique, les résultats cliniques sont hétérogènes et parfois contradictoires. Ces résultats controversés sont dus surtout à l'absence de standardisation des procédures de préparation des PRP. Cela a conduit à la disponibilité d'un grand nombre de produits différents en termes de types de cellules et de quantité, et donc de teneur en GF et en cytokines et de temps de libération. L'activation plaquettaire est une étape cruciale susceptible d'influer sur la disponibilité des molécules bioactives et donc sur les effets thérapeutiques du PrP (23).

Une étape d'activation avant l'administration du PRP est incluse dans de nombreux protocoles utilisés, généralement en ajoutant de la thrombine et / ou du chlorure de calcium (CaCl₂). Certains médecins préfèrent injecter le PRP non activé parce que il a été démontré que les plaquettes peuvent être activées de façon spontanée après contact avec le collagène natif présent dans les tissus conjonctifs (24).

Le Plasma riche en plaquette (PrP)

Selon Marx et al. (18) le PRP est défini comme étant un petit volume de plasma à haute concentration plaquettaire. Chez l'adulte sain le taux normal de plaquettes varie entre 150 000 et 350 000/ml . Des études ont montré qu'une concentration d'environ 1 million de plaquettes par ml, produisait des bénéfices cliniques (25). Les plaquettes contiennent en moyennes 50 à 80 granules alphas. Ces granules renferment différents facteurs de croissance

essentiels pour le processus de cicatrisation (26) :

- platelet-derived growth factor (PDGF-AA, PDGF-BB, and PDGF-AB)
- transforming growth factor-b (TGF-b1 and TGF- b2)
- vascular endothelial growth factor (VEGF)
- epithelial growth factor (EGF)
- insulin-like growth factor (IGF-I, IGF-II)
- fibroblast growth factor (FGF)
- endothelial cell growth factor (ECGF)
- platelet-derived angiogenesis factor (PDAF)

De nombreuses études (27-28) ont montré le rôle de préparations de PRP autologue, obtenues à partir du propre sang du patient, dans la cicatrisation des tissus mous et durs. Il a spécifiquement été mis en évidence que l'utilisation de PRP pour le traitement des plaies conduisait à une régénération plus rapide des tissus endommagés, ainsi qu'à une réduction de l'inflammation et de la douleur, dues à la libération par les plaquettes des facteurs de croissance agissant localement et qui sont essentiels à la différenciation cellulaire et à la régénération de nouveaux tissus. La sécrétion active de ces facteurs de croissance est initiée par le contact des plaquettes avec la matrice extracellulaire. L'activation correspond à un processus de dégranulation au cours duquel les granules alphas fusionnent avec la membrane plaquettaire, libérant ainsi les facteurs de croissance.

Différentes techniques d'activation du PRP existent à ce jour. Marx et al. ont décrit une technique d'activation qui consiste à mélanger 6ml de PRP avec 1ml de chlorhydrate de calcium / thrombine bovine. Cette activation permet un relargage des facteurs de croissance en 1 heure (29). Un autre processus d'activation consiste à mélanger le PRP seulement avec du chlorhydrate de calcium sans thrombine, permettant la formation d'une matrice de fibrine englobant les facteurs de croissance qui vont ainsi être libérés dans le milieu très

progressivement sur une durée de 7 jours.

L'activation des plaquettes induit la libération de nombreux facteurs de croissance précoces, parmi lesquels le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), l'Insulin-like growth factor (IGF), en plus de facteurs de croissance plus tardifs tels que le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), et le facteur de croissance transformant (TGF). Les plaquettes sécrètent également d'autres protéines, telles que le fibrinogène, la vitronectine et la fibronectine, qui jouent un rôle critique dans la régulation des interactions cellulaires et l'organisation spatiale des cellules. Les facteurs de croissance plaquettaires sont capables de stimuler la réplication de cellules mésenchymateuses, telles que les fibroblastes, et des cellules endothéliales, et de favoriser le chimiotactisme des macrophages, des monocytes et des cellules polymorphonucléaires. Une fois libérés, ces facteurs de croissance induisent diverses cascades de signalisation qui activent l'angiogenèse, la prolifération et la différenciation cellulaires et la synthèse d'une nouvelle matrice extracellulaire pour la régénération du tissu. Des tentatives d'utilisation de facteurs de croissance isolés se sont révélées infructueuses en raison de leur coût élevé de production et de l'incapacité d'un seul facteur de croissance délivré à un moment donné de réguler le processus entier de régénération. Au contraire, le PRP autologue représente une approche économiquement viable, sûre et efficace grâce à la libération sur le site d'administration d'un cocktail approprié de facteurs de croissance dans leurs proportions relatives naturelles et physiologiques. Le PRP autologue a été utilisé de manière sûre dans de nombreuses disciplines, dont la dentisterie, la chirurgie maxillo-faciale, la chirurgie plastique et reconstructrice, la chirurgie orthopédique, la dermatologie, la chirurgie cardiovasculaire et le traitement des plaies aiguës et chroniques. Le PRP autologue peut ainsi être utilisé comme système de délivrance pour les applications d'ingénierie tissulaire *in vivo*. En effet, de nombreuses substances actives sont contenues

dans les granules a des plaquettes; ces substances actives pourraient stimuler les fibroblastes quiescentes des SA pour les rendre à nouveau capable de sécréter des quantités importantes de protéines de la MEC.

L'acide L-ascorbique (vitamine C)

L'acide L-ascorbique (vitamine C) est un acide naturel soluble dans l'eau et anti-oxydant qui a été utilisé dans les cosmétiques en tant que conservateur, pour ajusteur le pH, et / ou comme composé actif. Il a été prouvé que cette molécule favorise la synthèse du collagène dans les fibroblastes de la peau humaine *in vitro*. En particulier l'Ascorbate de Sodium semble être la forme plus efficace dans la stimulation de la production de collagène (30). Les concentrations d'ascorbate de sodium, testées dans une étude récente, qui ont démontrées pouvoir améliorer la sécrétion de collagène des cultures des fibroblastes sains humains *in vitro* était entre 50 et 200 μM (31).

Des concentrations plus élevées (400 μM) n'ont pas montré une meilleure efficacité et des concentrations encore plus élevées (800 μM) avaient par contre un effet inhibiteur sur la synthèse de collagène (32). Une utilisation simultanée d'ascorbate de sodium et PrP n'a pas été encore étudié. Nous voulons tester ces deux produits seuls et associés pour vérifier si il y a un effet de potentialisation sur la stimulation des fibroblastes des SD *in vitro*.

La difficulté de la création d'un modèle de SD *in vitro* rend difficile l'expérimentation des traitements qui pourraient s'avérer très efficaces. Etant donné que les SD sont très fréquentes (70% des femmes après grossesse) et mal tolérées sur le plan psychologique, il y a beaucoup d'intérêt à développer un traitement efficace qui puisse agir sur les mécanismes pathogéniques de cette condition.

HYPOTHÈSE:

- 1) Les fibroblastes des SR et des SA présentent des altérations fonctionnelles et phénotypiques différents qui sont responsables de l'installation et la chronicisation des SD.
- 2) La stimulation des fibroblastes présents dans le SD, médié par des facteurs de croissance, augmenterait la production de collagène *in vitro* et *in vivo*, avec une augmentation conséquente de l'épaisseur du derme capable de faire disparaître les lésions des vergetures anciennes (SA).

OBJECTIFS

Les **Objectives** de cette étude sont :

- Décrire et analyser les fibroblastes des vergetures et les différences entre les fibroblastes issues des SR et des SA en comparaison aux fibroblastes de tissus sain du même donneur.
- Tester des traitements innovants (ascorbate de sodium et PrP) sur des cultures cellulaires de fibroblastes issues des SA *in vitro*.

MATERIEL ET METHODE

Notre projet de recherche se divise en deux parties *in vitro*: une partie de l'étude sera l'analyse des fibroblastes des vergetures et les différences avec les fibroblastes issues des SR et des SA en parallèle avec les fibroblaste dérivants de la peau saine des mêmes patients, et une autre partie visant à déterminer les effets d'un traitement combinant le plasma riche en plaquette à l'ascorbate de sodium sur des cultures cellulaires de fibroblastes issues des Striae Albae (SA) *in vitro*. Le choix de tester des traitements seulement sur les fibroblastes issus des SA réside sur le fait que les SR peuvent être beaucoup améliorées par le laser fractionné non ablatif (16) et que la majorité des patientes qui viennent voir le médecin présentent des lésions désormais anciennes (SA), pour lesquelles aucun traitement a montré une vraie efficacité. En plus plusieurs conditions sont présentes dans les lésions initiales (SR) (inflammation etc) que nous n'allons pas pouvoir reproduire *in vitro* pour l'instant.

OBTENTION, ISOLATION ET MISE EN CULTURE DES FIBROBLASTES

Trois femmes âgées de 30 à 40 ans sans comorbidités et avec un IMC ≤ 30 , avec des SR au niveau de la région abdominale et un nombre égal de femmes ayant des SA avec les mêmes caractéristiques ont été incluses dans cet l'étude après l'acquisition du consentement éclairé rédigé par le laboratoire Biopredic International (France, Rennes). Ces patientes avaient été programmées pour une intervention de plastie abdominale classique envisagée et programmée volontairement depuis au moins 3 mois du début de l'étude. Deux semaine avant l'intervention ces patients avaient été informées du projet vergetures et de la possibilité de donner aux laboratoires Biopredic la peau en excès, destinée à être jetée, pour cette étude, avec le garantie du respect de l'anonymat.

Pour chaque prélèvement de peau, 4 biopsies cutanées réalisées par punch biopsy de 2 mm, et centrées sur des zones avec SD (3SR et 3SA) et deux biopsie de peau saine ont été réalisées (pour permettre d'obtenir 4 cultures cellulaires primaires de fibroblastes des SD et deux de PS dérivées du même patient). Ce choix a permis d'éliminer toutes les variations inter-

individuelles qui peuvent interférer avec les résultats. Trois carrés de 1cm x 1cm de peau avec SA ont été prélevés chez les patients avec des SA pour étudier les images des SA au microscope confocal.

Table 1. Données des patients

	SR	SA
Numéro de patients	3	3
IMC	≤ 30	≤ 30
Apparition des vergetures	<12 mois	>12 mois



Figure 4a : Image préopératoire : les zones avec des SD sont repérées à l'aide d'un crayon dermographique



Figure 4b : les zones avec des SD (dans ce cas des SA) sont repérées

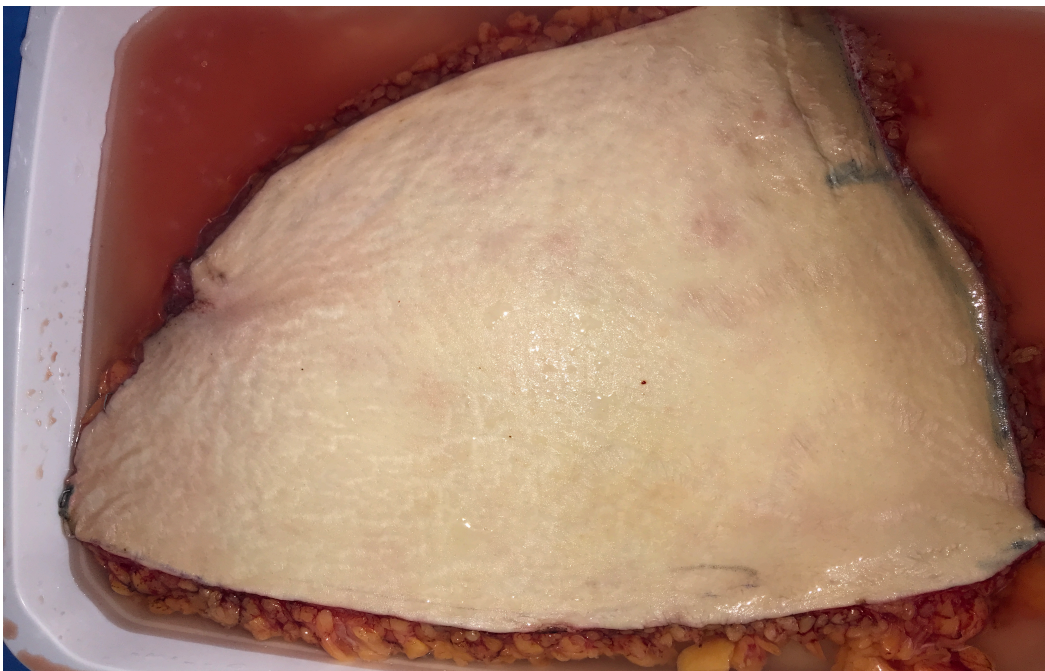


Figure 5 : Prélèvement de peau sur laquelle nous avons réalisées les biopsies



Figure 6 : Les biopsie sont déposées dans un glacier à -80C° et envoyées aux laboratoires Biopredic

ISOLEMENT ET CULTURE DE FIBROBLASTES

Le même protocole a été utilisé pour réaliser des cultures cellulaires des fibroblastes des SR et SA. Pour isoler les fibroblastes dermique *le protocole CELLNTEC* a été utilisé. Pour des performances optimales, les fibroblastes ont été cultivés à 37 ° C avec 5% de CO₂. Pour détacher les cellules pour les passages, nous avons utilisé l'Accutase à la place de la trypsine / EDTA. L'Accutase (Cat # CnT-Accutase-100) est un mélange d'enzymes protéolytiques et collagénolytiques isolées de crustacés. Il est exempt de composants mammifères. L'accutase est l'enzyme de détachement recommandée par Cellntec en raison de son action douce qui laisse la plupart des protéines de surface intactes, et le fait qu'il ne nécessite pas un réactif séparé pour arrêter la réaction (il faut diluer simplement avec le milieu immédiatement après le détachement cellulaire). Les biopsies cutanées de SD et de PS ont été placées dans le

milieu CnT-PR-F (15 ml de milieu dans un tube de 50 ml). Le milieu CnT-PR-F (CnT-Prime Fibroblast) est caractérisé par une composante sérique à 1% offrant une meilleure efficacité d'isolation et de croissance cellulaire par rapport aux milieux sériques traditionnels à 10%. Les morceaux de peau ont été placés dans un tube à centrifugeuse de 15 mL contenant 10 mL de solution de diaspase 1x, et 2 x d'antibiotiques / antimycotiques (Pénicilline-Streptomycine 1/1000+ Fungizone). La peau a été incubée pendant une nuit (~ 16 h) à 4 ° C en position horizontale. Le lendemain, la peau avec la solution de Dispase a été transférée dans une boîte de Pétri. Chaque morceau de tissu a été en suite transféré dans une nouvelle boîte de Pétri contenant du PBS pour éliminer l'excès de diaspase. Tout en maintenant la peau immergée dans le PBS, le derme a été séparé délicatement (rose, opaque, gluant) de l'épiderme (blanchâtre, semi-transparent) avec deux paires de pinces courbes, en fixant le tissu avec une paire de pinces tout en détachant l'épiderme avec la deuxième paire. Le derme a été en suite coupé en très petits morceaux à l'aide d'une nouvelle lame, les morceaux de derme ont été transféré dans un tube de centrifugation contenant 5 ml de collagénase A (Roche # 10103578001, concentration 1 mg / ml dans CnT-PR-F), plus 0,5 x CnT-GAB10 antibiotique / antimycotique. Les tubes ont en suite été incubés à 37 ° C pendant 8 heures en mélangeant occasionnellement. Nous avons en suite ajouté 15 ml de milieu CnT-PR-F pour diluer la collagénase, et mélangé en pipetant de haut en bas, puis la suspension obtenue a été passée à travers un tamis cellulaire de 70 um (BD # 08-771-2) pour obtenir une suspension monocellulaire. La suspension unicellulaire a été en suite centrifugée pendant 5 min, 200 x g à température ambiante. Le surnageant est jeté et le culot (pellet) a été remis en suspension dans 1 ml de CnT-PR-F. Une numération cellulaire a été effectuée et nous avonsensemencé environ 4 000 cellules par cm² dans LE MILIEU CnT-PR-F. Les cellules ont été cultivées à 37 ° C et 5% de CO², avec un premier changement de milieu 24-48 heures plus tard. Puis le milieu a été changé tous les 2-3 jours. Pour les passages des cellules il a été utilisé l'accutase.

Les fibroblastes ont été utilisés entre le 3^{ème} et 8^{ème} repiquage, parce que il a été démontré que le fibroblastes cultivés dans des passages inférieurs à 8 conservent leurs caractéristiques in vivo. Au-delà, ils s'adaptent à la conditions de in vitro (17).

1) CARACTERISATION DES FIBROBLASTES DES SD

Afin de caractériser les fibroblastes de SD, l'expression d'*alpha actine du muscle lisse (alpha SMA)* et les forces contractiles générées par les fibroblastes issus de la PN des SR et des SA ont été étudiées. Les forces contractiles générées par les fibroblastes ont été mesurés avec le **Force-box**, dispositif mise au point des ingénieurs des Laboratoires Biopredic International (Rennes).

Pour mieux caractériser les fibroblastes des SD nous disposons d'un modèle de derme équivalent in vitro, le **lattice de collagène** constitué d'un mélange de fibroblastes dans un gel de collagène. Cette culture tridimensionnelle permet d'étudier la capacité qu'ont les fibroblastes à rétracter le gel dans lequel ils sontensemencés pour former une structure compacte. Pour cette première phase expérimentale de notre étude ce modèle de culture 3D pourra mieux reproduire donc les caractéristiques « in vivo » de cette population cellulaire. Le but de cet essai était donc de reconstituer un équivalent dermique in vitro à l'aide de fibroblastes issus de vergetures afin d'étudier leur comportement mécanique au sein de la matrice, comparativement à des lattices constitués de fibroblastes sains issus du même patient.

DISPOSITIF FORCE-BOX (BIOPREDIC INTERNATIONAL)

Ce dispositif a été utilisé pour étudier le modification des lattices de fibroblastes issues des SA, SR et de la PN. La structure principale était composée de 8 plaques de cultures rectangulaires (26x33 mm) dans lesquels on laisse développer les lattices .Deux feuilles de silicone opposés (200 µm d'épaisseur, 20 mm de largeur et 45 mm de hauteur) pendent dans chaque plaque et sont séparées l'une de l'autre d'une distance de 27 mm. Le lattice était

attaché à ce capteur à travers une grille directement gravée sur la partie inférieure des feuilles de silicone. Une jauge de contrainte de 4,5 kW de résistance a été déposée à la surface du faisceau par dépôt physique en phase vapeur (PVD) gravé par photolithographie et connecté pour former un pont Wheastone. La sortie de signal des jauges de contrainte a été amplifiée, puis convertie et collectée par un ordinateur doué d'une carte d'acquisition du signal et d'un programme spécifique pour donner directement une estimation des forces en temps réel.

Force-box a été calibrée contre des poids allant de 0 g à 1,9 g. L'étalonnage a montré la haute linéarité du système et une sensibilité de 0,1 mN. L'appareil était stérilisé à 120° C pendant 20 min.

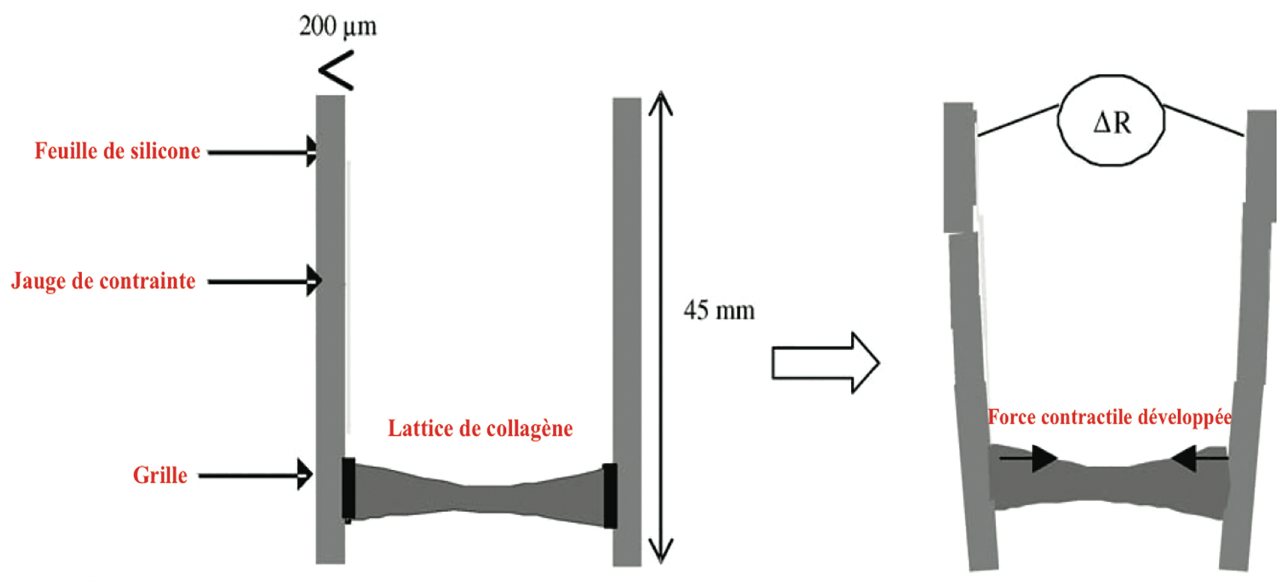


Figure 7 : Schéma du Force-Box

PREPARATION DES LATTICES DE COLLAGENE ET MESURE DE LA FORCE CONTRACTILE

Pour cet expérience, les fibroblastes ont été suspendus juste avant la confluence avec une solution de trypsine-EDTA (1 X). Un échantillon a été pris pour déterminer le nombre de cellules obtenues. La suspension a été centrifugée et un compte final a été effectué avant d'amener les fibroblastes à la concentration de 8×10^5 C / ml. Les fibroblastes ont été intégrés dans des gels de collagène hydratés avec l'obtention d'une culture tridimensionnelle.

Deux ml de milieu DMEM concentré à 1,76 X (avec de la gentamycine, 0,1 N NaOH et NaHCO_3) ont été ajoutés à 1 ml d'une solution de collagène de queue de rat de type I (2 mg / ml) (Biopredic, Rennes, France), et à 0,33 ml de suspension des fibroblastes dans le milieu de culture. Le lattice obtenu a été versé dans un puits de culture rectangulaire de la Force-box et polymérisé en moins de 5 min à 37 ° C. Deux millilitres de milieu de culture ont été ajoutés. La Force-box a ensuite été placée dans un incubateur humidifié à 37 C, et les mesures de la force contractile ont été démarrées immédiatement.

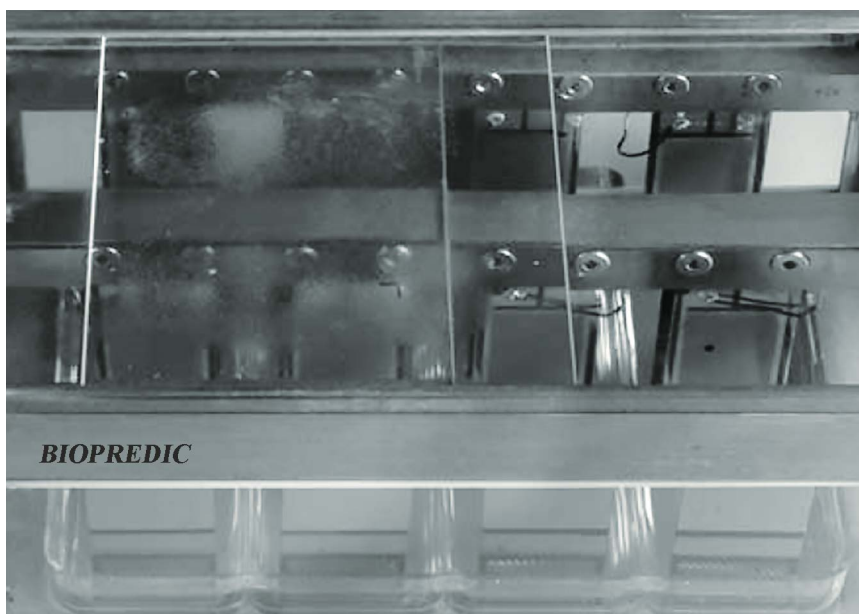


Figure 8 : Le Force-Box

DETECTION DE L'ALPHA SMA - (MICROSCOPIE A FLUORESCENCE)

Les lattices utilisés pour les mesures de la force de contraction étaient âgés de 2 jours. Ils ont été fixés sous tension dans la plaque de culture avec une solution au 3% de PFA dans du PBS pendant 30 min. Après rinçage au PBS, les fibroblastes dans le lattice ont été perméabilisés par le traitement avec 0,4% de Triton X100 pendant 15 min suivi par les trois changements de PBS. Les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués à température ambiante par une incubation de 10 minutes dans une solution contenant 1% de glycine dans du PBS suivi d'une incubation d'une heure dans une solution de BSA à 3% dans du PBS contenant 10% sérum normal de chèvre et 0,1% de Triton X100. Ensuite, les échantillons étaient incubés pendant une nuit à température ambiante et en milieu humide avec des anticorps monoclonal de souris anti-alpha SMA (dilué à 1: 100 dans du PBS contenant 1% de BSA et 0,1% de Triton) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Pour le contrôle, une pièce de lattice a été incubée dans du PBS au lieu des anticorps primaires. L'excès d'anticorps a été retiré à travers trois changements de 10 min chacun de PBS + 1% BSA + 0,1% Triton X 100.

Les anticorps polyclonaux IgG de chèvre anti-souris conjugués à la rhodamine (dilué à 1:40 dans du PBS contenant 1% de BSA et 0,1% de Triton) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) ont été appliqué pendant 1 heure à température ambiante dans une chambre humide. Après lavage et trois changements de 10 min chacun de PBS, les fragments de lattice ont été incubés avec 2,5 µg / ml Hoechst 33258 (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) dans du PBS pendant 10 min dans l'obscurité à température ambiante.

Après un nouveau lavage, ils ont été doucement transportés sur un lame histologique et laminé avec le milieu de montage Vectashield (Biosys, Compiègne, France). Les préparations ont été examinées par un microscope à fluorescence (Olympus IX50).

CYTOMETRIE EN FLUX

Les lattices utilisés dans les mesures de la force contractile et âgés de 2 jours, ont été laissés digérés par la collagénase de type I de Clostridium Histolyticum (0,150 U / mg) à 37 °C pendant 1 heure. Les suspensions cellulaires ont été fixées avec du PFA à 3% dans du PBS pendant 10 minutes, perméabilisé dans du Triton X100 à 0,4% pendant 15 min et colorées pour l' alpha SMA actine comme décrit précédemment.

Pour le contrôles des cellules incubées seulement avec le anticorps secondaire ont été utilisées. Les échantillons ont été analysés sur un Cytomètre en flux FACScan (Beckman Coulter) avec Excitation à 488 nm et filtre passe-bande à 610 nm pour la rhodamine. Pour toutes les analyses de cytométrie en flux, 20 000 cellules ont été analysées.

2) EFFECTS DES DIFFERENTS TRAITEMENTS SUR LES FIBROBLASTES

DERMIQUES DES SA

Les fibroblastes dermiques adultes isolés des SA (par punch biopsy de 2mm) ont été incubés dans différents milieux de cultures contenant 1% et 5% de PRP standard et des mêmes concentrations de PrP concentré pendant 24 et 48h. Nous avons aussi voulu tester au même temps les effets de l'acide ascorbique (100µg /M). Les mêmes mesures ont été réalisées pour les cultures de contrôle dans lesquelles aucune molécule n'a été testé.

Chaque procédure a été réalisée trois fois pour chaque culture cellulaire dérivant du même donneur. Les produits testés ont été les suivantes :

PrP standard 1% et 5%, PrP concentré 1% et 5%, ascorbate de sodium (100µg /M), PrP standard 1% et 5% + ascorbate de sodium (100µg /M), PrP concentré 1% et 5% + ascorbate de sodium (100µg /M), aucun traitement (contrôle). Le modèle contrôle a été utile pour évaluer si les fibroblastes ont réacquis un phénotype "Normal" induit par le traitement ou par simple mise en culture. Les cultures cellulaires ont été incubées avec les différents traitements

pendant 24 et 48h. Nous avons voulu examiner et quantifier le collagène type I chez les fibroblaste de la peau saine, des SA avant et après l'administration des différents traitements.

PREPARATION DU PRP

Les 3 patients volontaires avec SA qui avaient accepté de donner à la recherche la peau en excès dérivant des leurs interventions de plastie abdominale n'avaient pris aucun médicaments, y compris l'aspirine et d'autres anti-inflammatoires non stéroïdiens, au cours des 2 semaines précédant l'intervention et la préparation du PrP. Le PrP a été produit en utilisant le kit RegenKit®-BCT. Pour la préparation du PrP, deux tubes de 8 ml de sang veineux ont été recueillis pour chaque patient. Chaque tube a été centrifugé à 1500 tr / min pendant 5 minutes, obtenant ainsi 4 ml de PrP. Pour obtenir le PrP concentré le plasma obtenu (le PRP) avec le deuxième tube a été centrifugé à nouveau spin plus élevé (2330 tr, pendant 10 min). Deux ml du platelet poor plasma (PPP) ont été aspirées et éliminées pour ainsi obtenir le PrP concentré. Une petite partie de chaque échantillon a été utilisé pour des analyses hématologiques. La concentration plaquettaire a été mesurée avec un compteur de cellules sanguines automatisé (XS-1000i; Sysmex Co.). Avant de tester nos PrP nous en avons voulu mesurer la concentration en plaquettes.

ASCORBATE DE SODIUM

Dans toutes les expériences décrites, nous avons utilisé le (+) - sodium L-ascorbate (CAS 134-03-2) de Sigma – Aldrich (St. Louis, MO) préparé dans le forme en poudre pure à 99,0% adaptée aux cultures cellulaires (A4034).

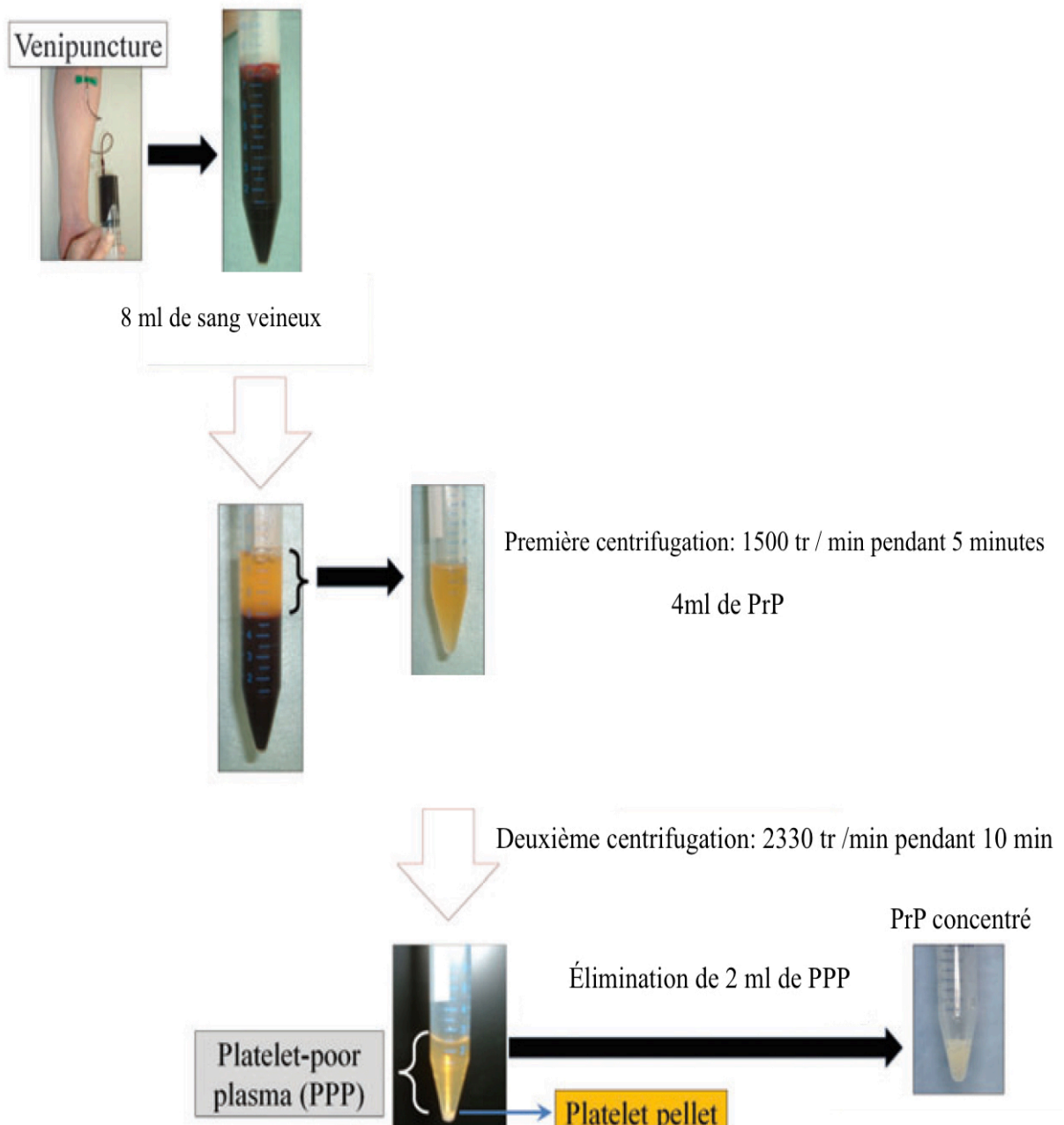


Figure 9 : Préparation du PrP standard et du PrP concentré

QUANTIFICATION DU COLLAGEN I PAR ELISA

La concentration du collagène de type I dans le surnageant des cellules en culture a été déterminée à travers le dosage de la COLIA1, réalisé par technique Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) selon les recommandations du fournisseur

(Biotechne). L'absorbance à 450 nm a été déterminée dans un lecteur de microplaques (E max; Molecular Devices, Sunnyvale, Californie, États-Unis).

ANALYSE PCR EN TEMPS REEL (COLLAGÈNE TYPE I)

Les ARN ont été isolées en utilisant du trizol (life technologies), puis la reverse transcriptase (Superscript First-Strand Synthesis System de Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) a été utilisée pour la synthèse des cDNA et amplification au SYbR green (cycle de PCR et modèle de machin utilisées). Les réactions de RT-PCR quantitatives ont été effectuées par un système 7900 PCR en temps réel de détection (Applied Biosystems) en utilisant la SYBR Green qPCR Platinum SuperMix (Invitrogen). Les conditions de PCR étaient 50 ° C pendant 2 min, 95 ° C pendant 2 min, 45 cycles à 95 ° C pendant 15s, et 60 ° C pendant 45s, en utilisant la GAPDH ou SF3A1 comme gène de référence. Les séquences des amorces pour le collagène de type I ont été :

Collagène de type I, 5'-C TGGCAAAGAAGGCGGCAAA-3' et 5'-CTCACCAC GATCACC ACTCT-3' (503 pb).

PROLIFERATION CELLULAIRE

La **prolifération cellulaire** a été mesurée par CellTiter 96 Aqueous One solution (Promega, Madison, WI, États-Unis). Le réactif CellTiter 96® AQueous One Solution contient un composé de tétrazolium [3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxyméthoxyphényl) -2- (4-sulfophényl) -2H-tétrazolium, sel interne); MTS] et un réactif de couplage électronique (phénazine éthosulfate; PES). Le PES a amélioré la stabilité chimique, ce qui lui permet d'être combiné avec le MTS pour former une solution stable.

Les tests ont été effectués en ajoutant une petite quantité du réactif CellTiter 96® AQueous One Solution directement dans les plaques de culture, en incubant pendant 1 à 4 heures, puis en enregistrant l'absorbance à 490 nm avec un lecteur de plaque à 96 puits. La quantité de

formazan mesurée par la quantité d'absorbance de 490 nm est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes en culture.

IMMUNOCYTOLOGIE

Après incubation des cultures cellulaires pendant 48 h maintenues en présence et en l'absence des traitements testées, les cellules ont été fixées dans du paraformaldéhyde à 4% à 24°C (pour la détection du collagène I). Les fibroblastes cultivés ont en suite été incubés avec 10µg d'anticorps polyclonale contre le collagène de type I (Chemicon, Temecula, CA). Les cultures ont été puis incubés avec les anticorps secondaires conjugué à la fluorescéine. Les noyaux ont été détectés avec le iodure de propidium (Sigma, Sigma, St. Louis, MO). Toutes les cultures ont ensuite été examinées avec un Microscope Nikon Eclipse E1000.

STATISTIQUE

Gestion des données et statistiques :

Les résultats obtenus ont été traités à l'aide du logiciel Prism, Version 5 (Graph Pad, USA).

L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel JMP 10 (SAS institute Inc).

Dans toutes les expériences, les valeurs moyennes pour les trois essais \pm SD ont été calculées. Les résultats ont été soumis à une analyse statistique en utilisant le test t de Student unilatéral non apparié. Les résultats ont été considérés statistiquement significatifs lorsque la probabilité est inférieure à 0.05 ($p < 0,05$).

RESULTATS

1) CARACTERISATION DES FIBROBLASTES DES SD

Génération des forces contractiles

Nous avons utilisé un appareil mis au point par les ingénieurs du Group Biopredic International, pour mesurer les forces contractiles dans des lattices de collagène tendus. Les mesures de la force ont été enregistrées en continu pendant 2 jours. Les profils de forces contractile générés par les fibroblastes de la PN des SA et des SR ont été divisés en deux phases. La première phase s'est produite dans les 2 h suivant le début de l'expérience; pendant cette phase aucune force contractile n'a été enregistrée. La deuxième phase, entre 2 et 24 h, a montré une augmentation de la force quasi linéaire. En comparaison avec les fibroblastes de la PS, les fibroblastes des SR ont développé une force de contraction beaucoup plus intense. Cette différence a été statistiquement significative mais que à partir de la 12^{ème} heure de l'expérimentation ($p < 0.05$).

La force contractile maximale développée par les fibroblastes des SR a été 28% fois plus importante que les fibroblastes de la PN. En revanche, la force contractile développée par les fibroblastes des SA ne différait pas significativement de celle ci produit par les fibroblastes de la PN.

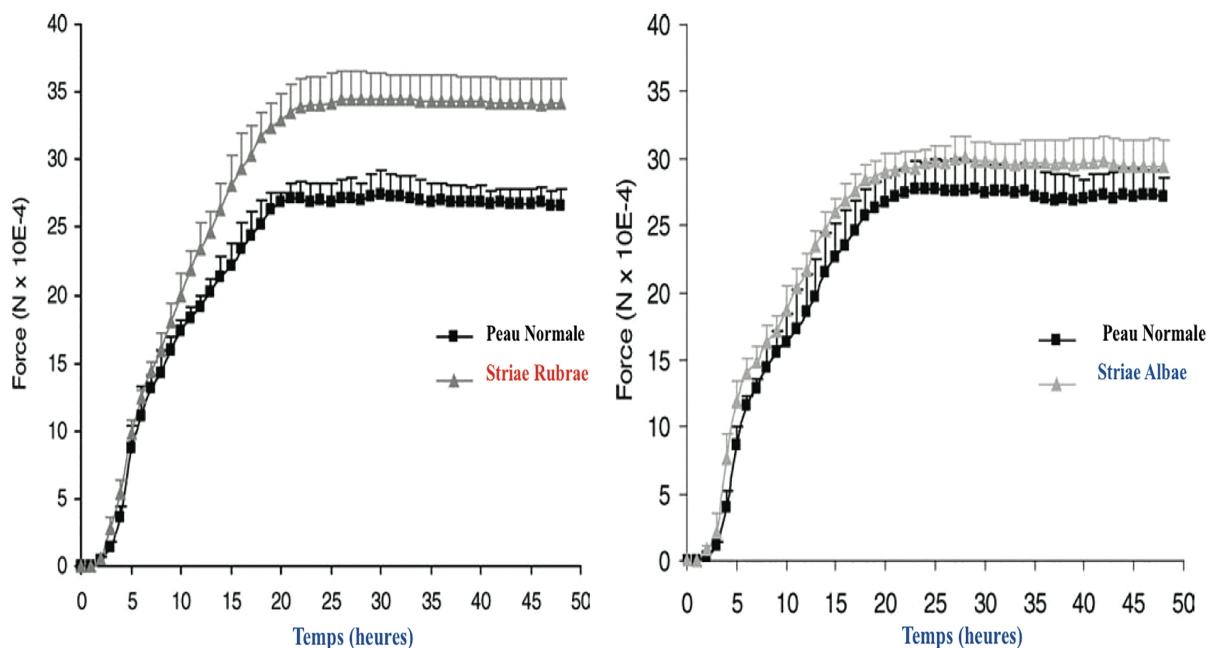


Figure 10 : Forces générées par les Striae Rubrae, Striae Albae et Peau Normale.

Expression de l'alpha SMA

Les fibroblastes ont été cultivés dans les lattices de collagène tridimensionnels pendant 2 jours. Nous avons utilisé des techniques d'immunofluorescence pour la mise en évidence de l'alpha-SMA et d'histo-fluorescence pour les noyaux.

Les fibroblastes de SR ont montré une positivité importante pour l'alpha SMA. En revanche, les fibroblastes de la PS n'expriment pas l'alpha SMA.

Nous n'avons pas pu observer des filaments de alpha SMA chez les fibroblastes de SA et de la PS. Les analyses par cytométrie en flux de l'expression de l'alpha SMA sur les fibroblastes de PN, SR et PN et SA, ont montré une intensité moyenne de coloration de $2,3 \pm 0,6$; $5,7 \pm 0,4$ et de $2,9 \pm 0,5$ et $3,7 \pm 0,3$, respectivement. Par rapport aux fibroblastes de la PN, une augmentation significative de l'alpha SMA a été observée pour les fibroblastes des

SR ($P < 0,001$). Il n'y avait pas différence significative entre les fibroblastes de SA et les fibroblastes de PN.

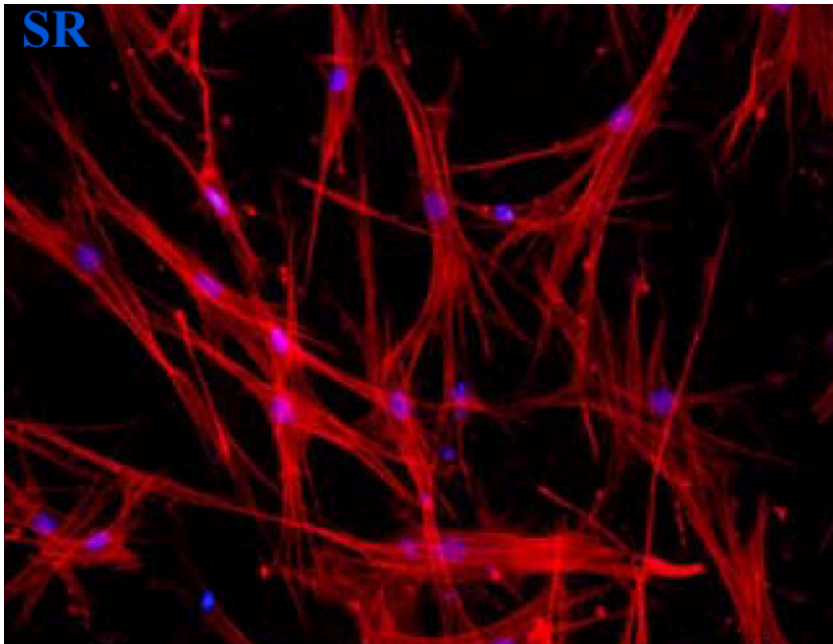


Figure 11 : Marquage alpha SMA, fibroblastes issus des SR

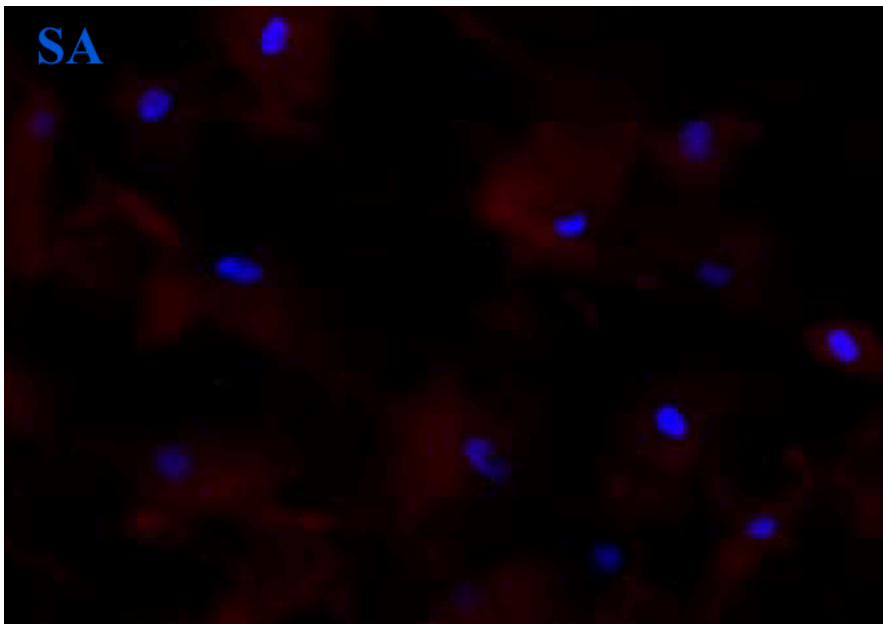


Figure 12 : Marquage alpha SMA fibroblastes issus des SA

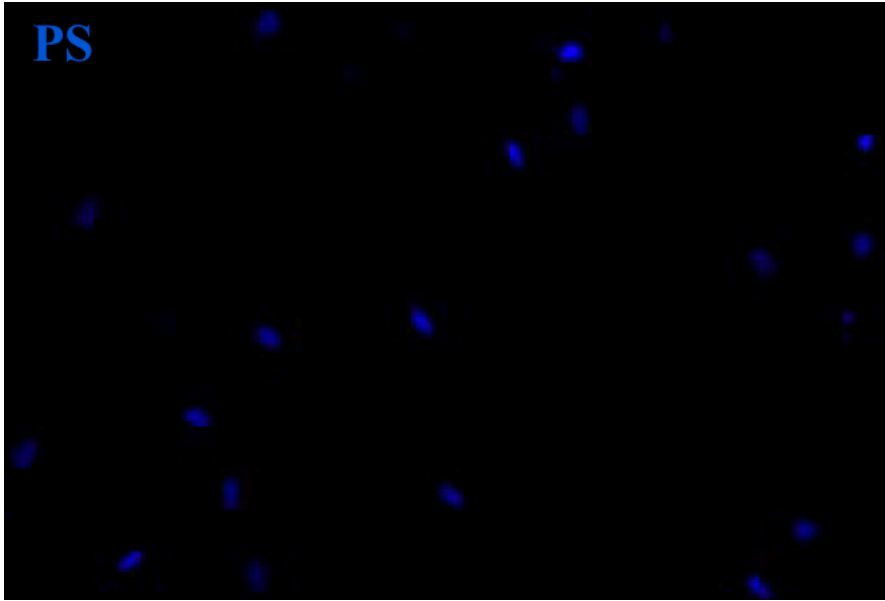


Figure 13 : Marquage alpha SMA fibroblastes issus de la Peau Saine

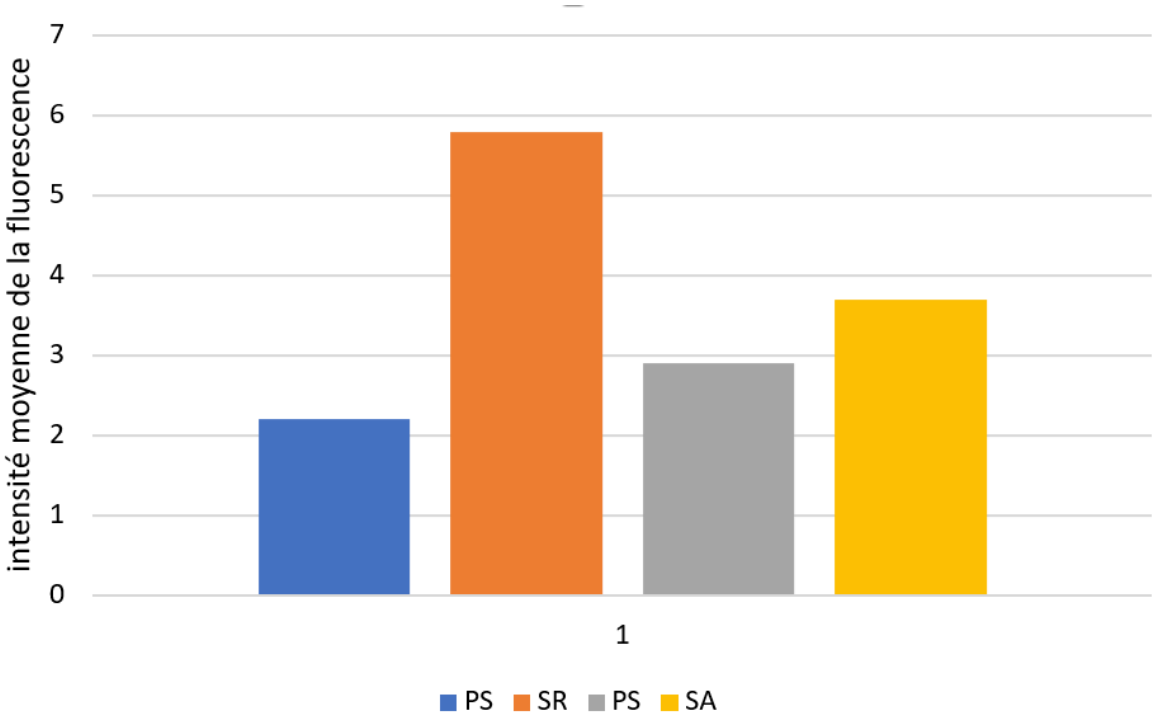


Figure 14 : Intensité de la fluorescence (positivité pour alpha SMA) détectée par cytométrie en flux

2) EFFECTS DES DIFFERENTS TRAITEMENTS SUR LES FIBROBLASTES

DERMIQUES

Quantification du collagène I par ELISA

La concentration moyenne de collagène de type I obtenues par dosage de la COLIA1 du surnageant des fibroblastes issues de la peau saine était en moyenne de 1750 ± 390 pg/mL, de 550 ± 239 pg/mL chez les fibroblastes issus de la peau avec Striae Albae et 1313 ± 247 pg/mL chez les fibroblastes issus de la peau avec Striae Rubrae. Des différences statistiquement significatives ($p < 0.05$) ont été observées seulement entre la production de collagène des fibroblastes des SA et de la PS.

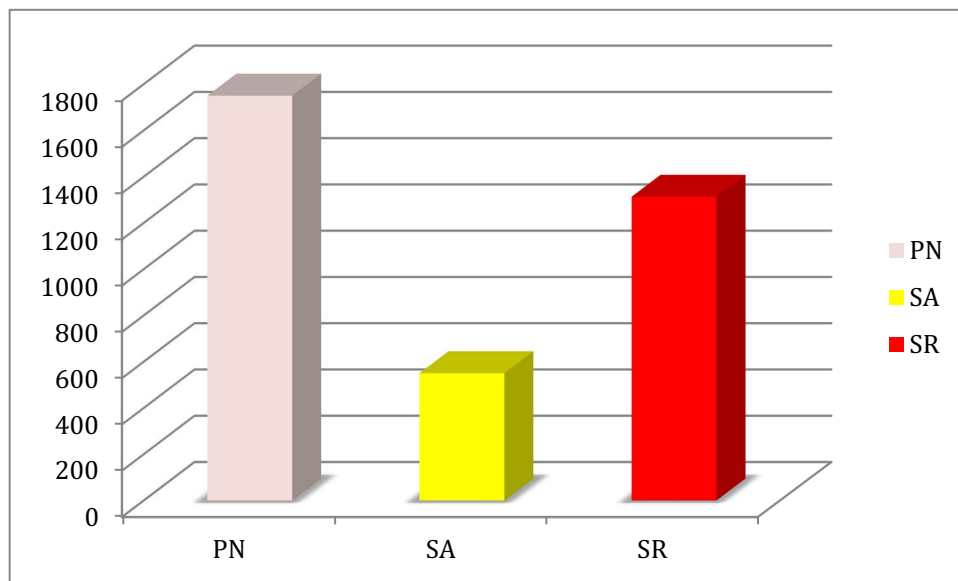


Figure 15 : Quantité de pro collagène type I. X= Peau Normale (PN), Striae Albae (SA), Striae Rubrae (SR); Y= Concentration pg/ml

Après 24 h de privation de sérum, les fibroblastes dérivant des SA ont été cultivées dans un milieu de culture dépourvu de sérum et incubés pendant 24 et 48 heures avec différentes concentrations (1%-5%) de PrP « standard » ou PrP « concentré » (cPrP) plus ou moins $100 \mu\text{M}$ d'ascorbate de sodium. Les différents résultats ont été comparés aux cultures contrôles

qui n'ont reçu aucun traitement.

La **concentration plaquettaire moyenne** ($\times 10^4 \mu\text{L}$) a été de 22.4 ± 4.59 (sang entier) avant le premier cycle de centrifugation, de 62.3 ± 13.8 pour le PrP et de 319.6 ± 31.8 pour le PrP concentré.

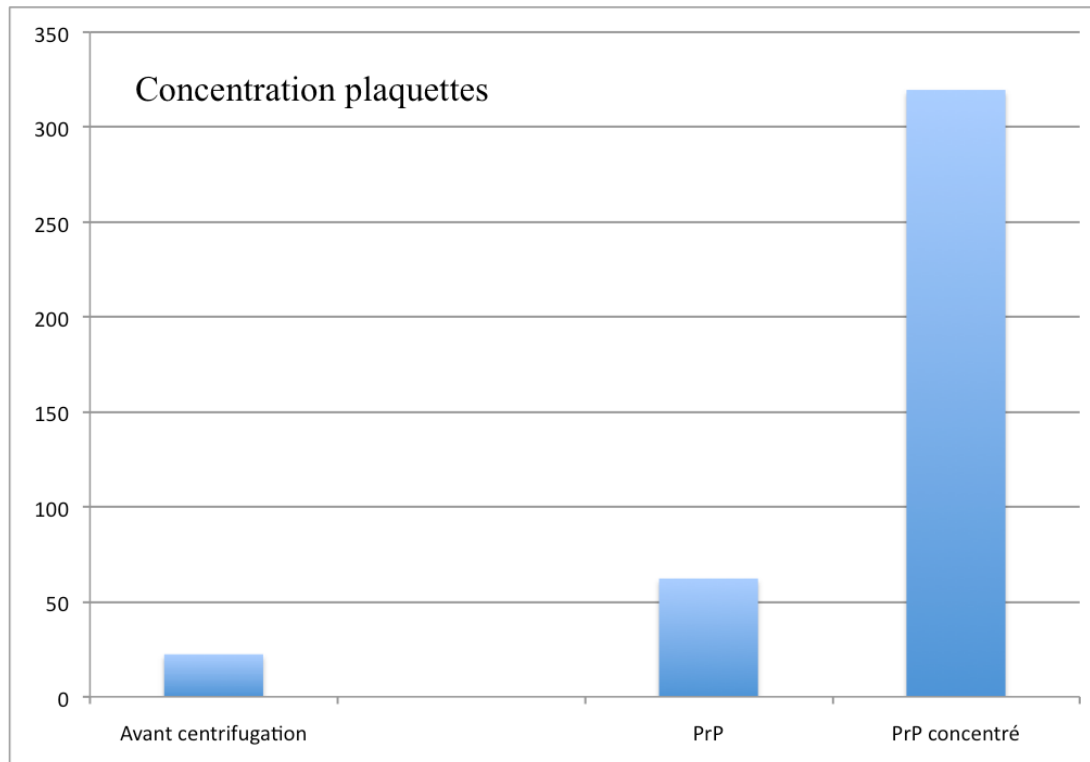


Figure 16 : Concentration plaquettaire moyenne. X= Avant centrifugation (sang entier), PrP standard, PrP concentré; Y= Concentration ($\times 10^4 \mu\text{L}$).

La **biosynthèse du collagène** a été mesurée chez les fibroblastes dermiques issus des SA traités avec 1% et 5% de PRP, 1% et 5% de PrP concentré plus ou moins ascorbate de sodium. Comme on peut le voir (figures 17-20), le PrP 1% et 5% et l'ascorbate de sodium ont contribué après 24 et 48 h d'incubation à augmenter biosynthèse du collagène de façon significative par rapporte au contrôle. Un effet plus important a été observé pour les cultures

cellulaires qui ont reçu un traitement combiné PrP-Ascorbate de Sodium ($p < 0.0001$). Le PrP concentré a montré avoir un effet non significatif sur la production de collagène ($p=0.123$)

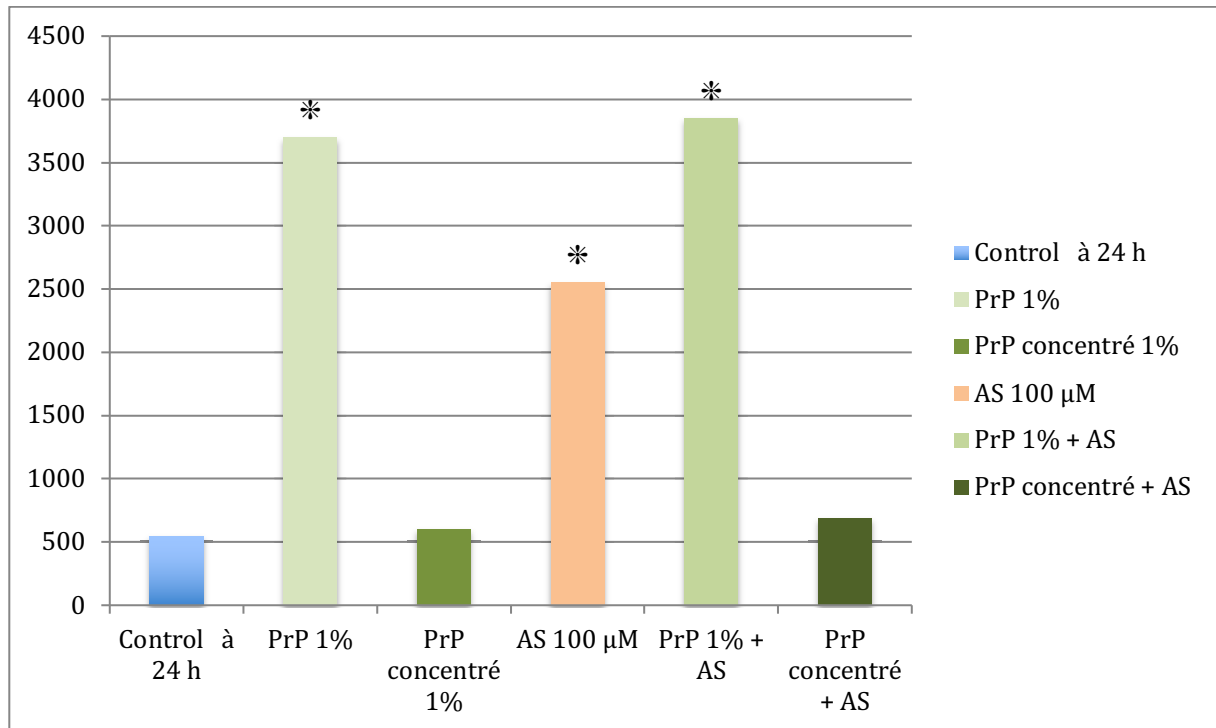


Figure 17 : Quantité de pro collagène type I à 24 heures; Y= Concentration pg/ml

Dans les images la petite étoile (*) indique que les différences observées ont été statistiquement significatives.

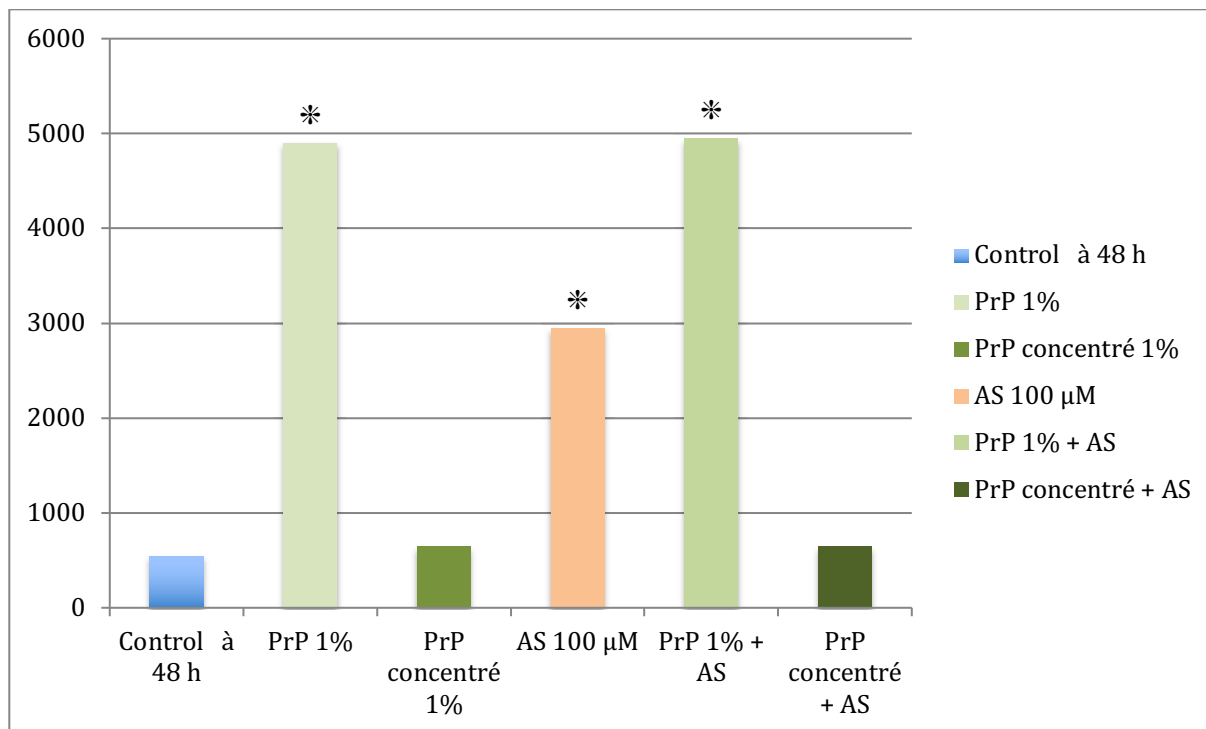


Figure 18 : Quantité de pro collagène type I à 48 heures; Y= Concentration pg/ml

Dans les images la petite étoile (*) indique que les différences observées ont été statistiquement significatives. Après 48 heures les résultats sont presque superposables.

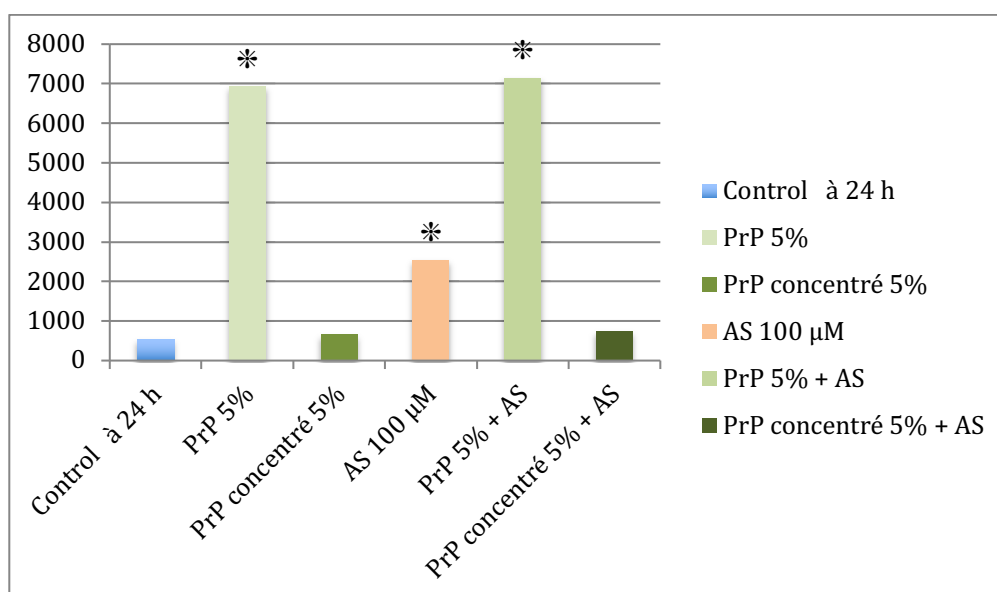


Figure 19 : Quantité de pro collagène type I à 24 heures (PrP 5%); Y= Concentration pg/ml

Dans les images la petite étoile (*) indique que les différences observées ont été

statistiquement significatives.

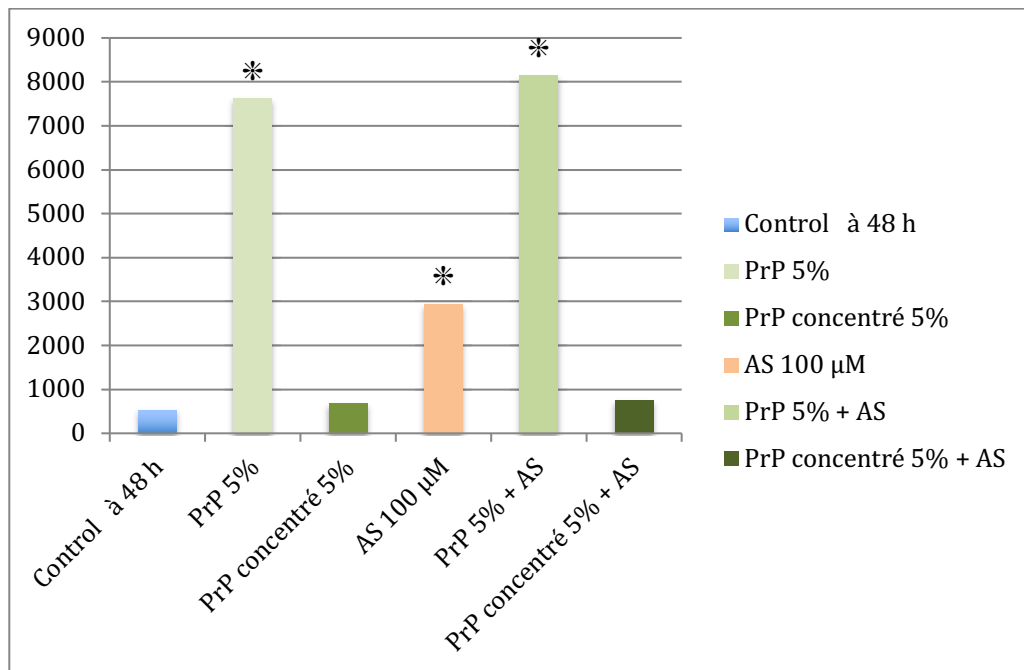


Figure 20 : Quantité de pro collagène type I à 48 heures (PrP 5%); Y= Concentration pg/ml

Dans les images la petite étoile (*) indique que les différences observées ont été statistiquement significatives.

RT-PCR

Des résultats superposables ont été observés avec la RT-PCR. L'expression de l'ARNm du collagène de type I était augmentée de façon significative pour les cultures de fibroblastes issus des SA traitées avec 1% et 5% de PrP pendant 24 et 48 heures. L'association PrP/Ascorbate de sodium a montrée une augmentation d'expression de l'ARNm du collagène de type I de 2,3 fois plus importante par rapport au control après 24 et 48 heures d'incubation. Le PrP concentré a montré avoir un effet non significatif sur l'expression de l'ARNm du collagène type I.

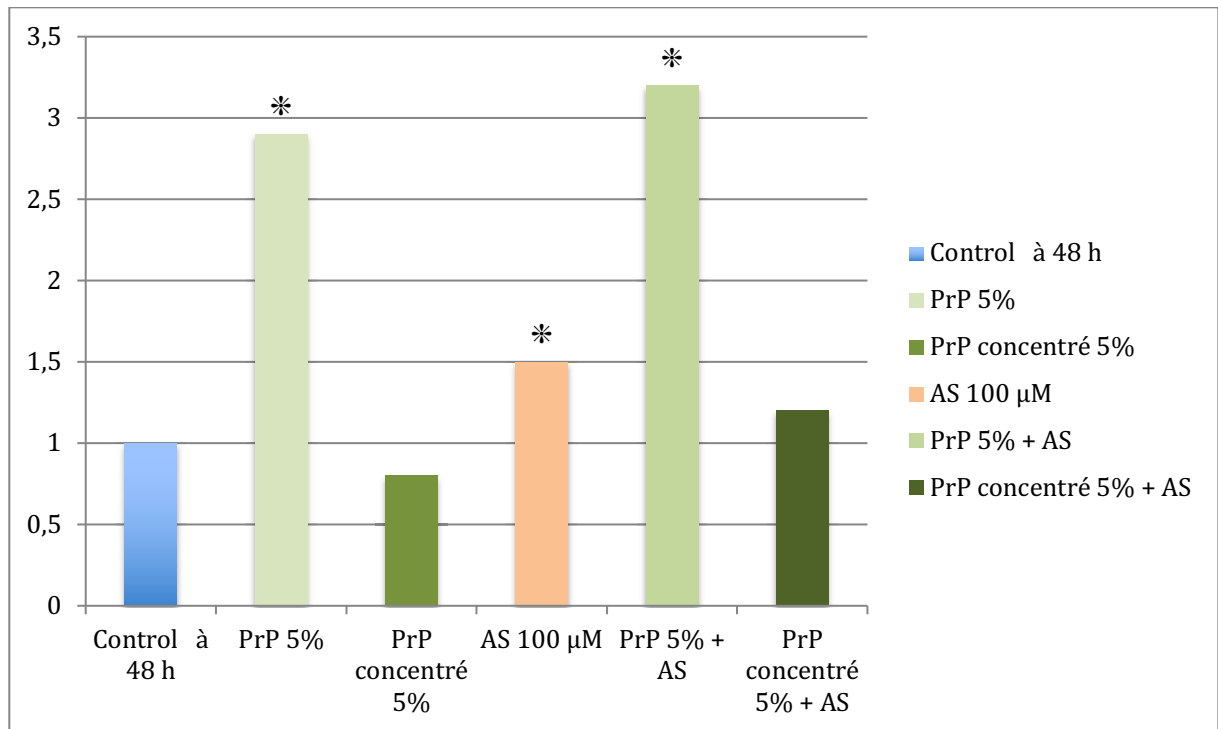


Figure 21 : Analyse RT-PCR

Expression de l'ARNm du collagène de type I à 48 heures (PrP 5%). Dans les images la petite étoile (*) indique que les différences observées ont été statistiquement significatives.

PROLIFERATION CELLULAIRE

Après 24 heures d'incubation avec du PrP 1% et PrP5% + Ascorbate de sodium la viabilité cellulaire était augmenté du 140% et 151% et de 156 et 178% après 48 heures respectivement par rapport au control. Ces résultats ont été statistiquement significatifs ($p < 0.05$).

De façon surprenant le PrP concentré a eu dans toutes les expérimentations un effet peu important ou même négatif sur la viabilité cellulaire.

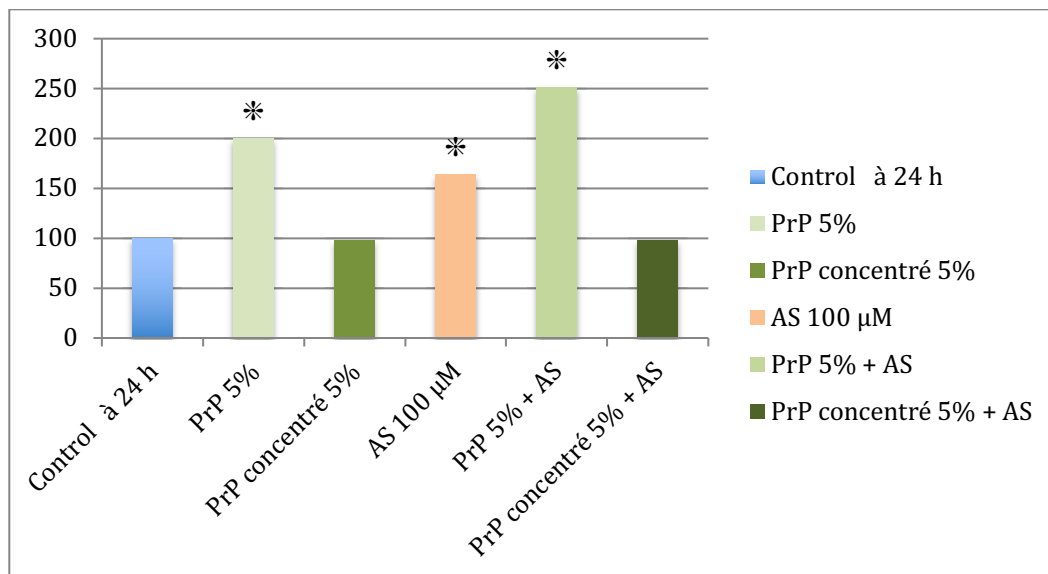


Figure 22 : Prolifération des fibroblastes des SA à 24 heures (PrP 5%). Dans les images la petite étoile (*) indique que les différences observées ont été statistiquement significatives.

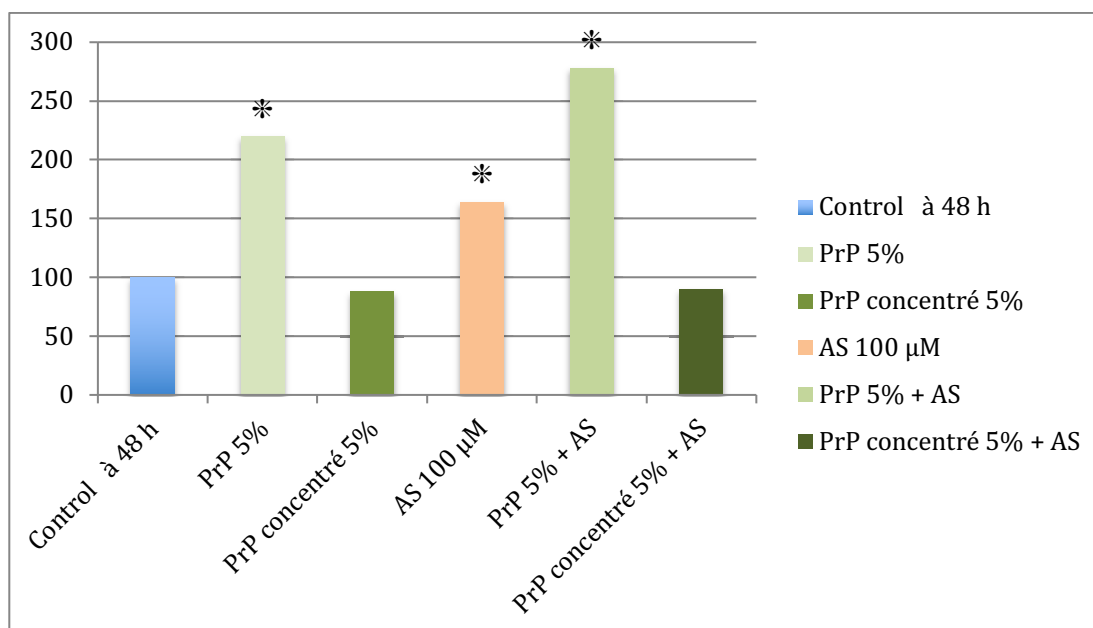


Figure 23 : Prolifération des fibroblastes des SA à 48 heures (PrP 5%). Dans les images la petite étoile (*) indique que les différences observées ont été statistiquement significatives.

IMMUNOCYTOLOGIE

Les analyses immuno-cytologiques ont confirmé nos observations précédentes.

Les fibroblastes des SD produisent une quantité inférieure de collagène de type I par rapport aux fibroblastes de la peau saine chez le même patient. L'association PrP + Ascorbate de sodium a montré être la plus efficace dans la stimulation à la production de collagène.

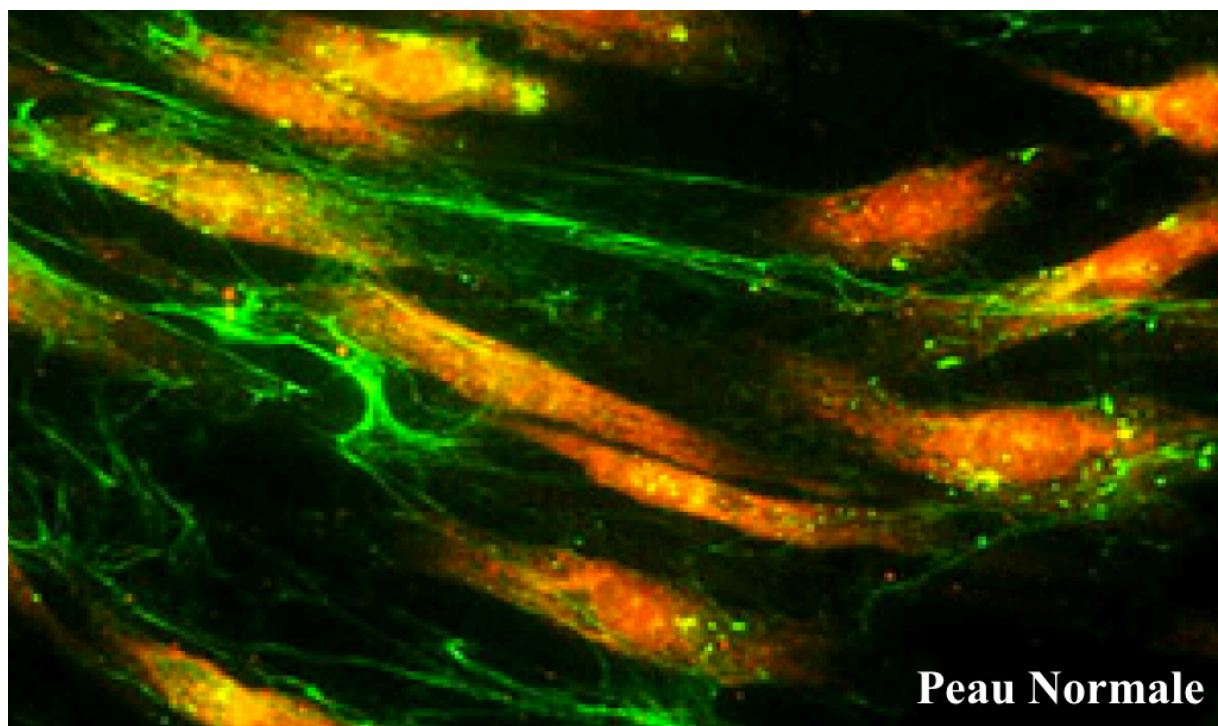


Figure 24 : Fibroblaste issus de la Peau Normale, immunomarquage pour le Collagène type I (vert) et les fibroblastes (rouges).

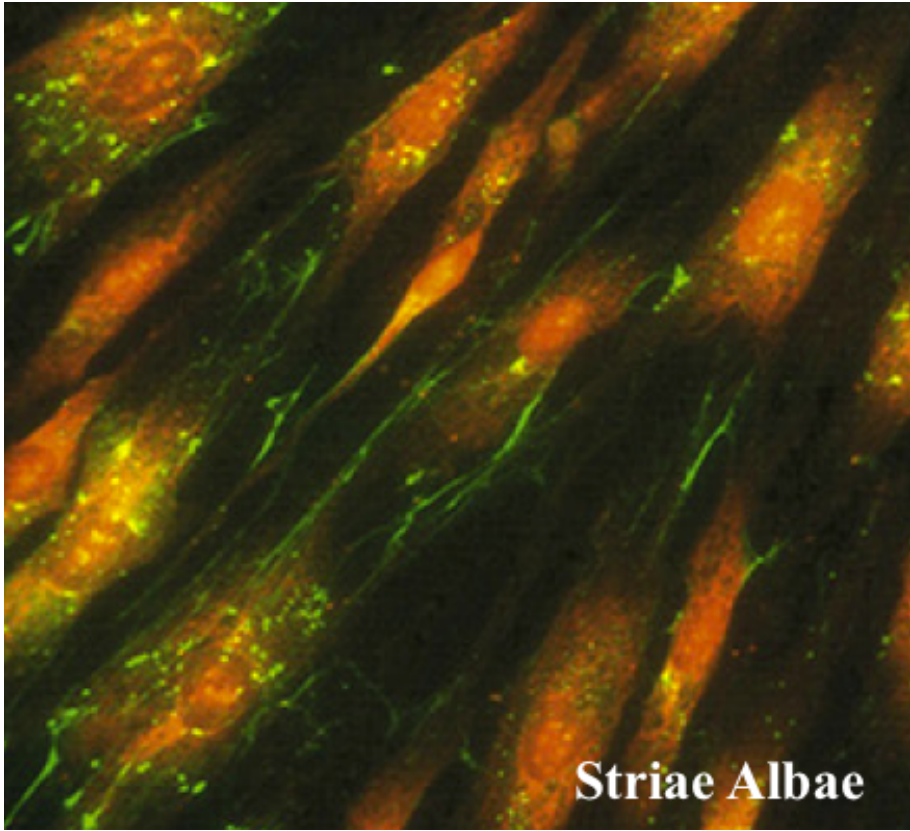


Figure 25: Fibroblaste issus des SA, immunomarquage pou le Collagène type I (vert) et les fibroblastes (rouges).

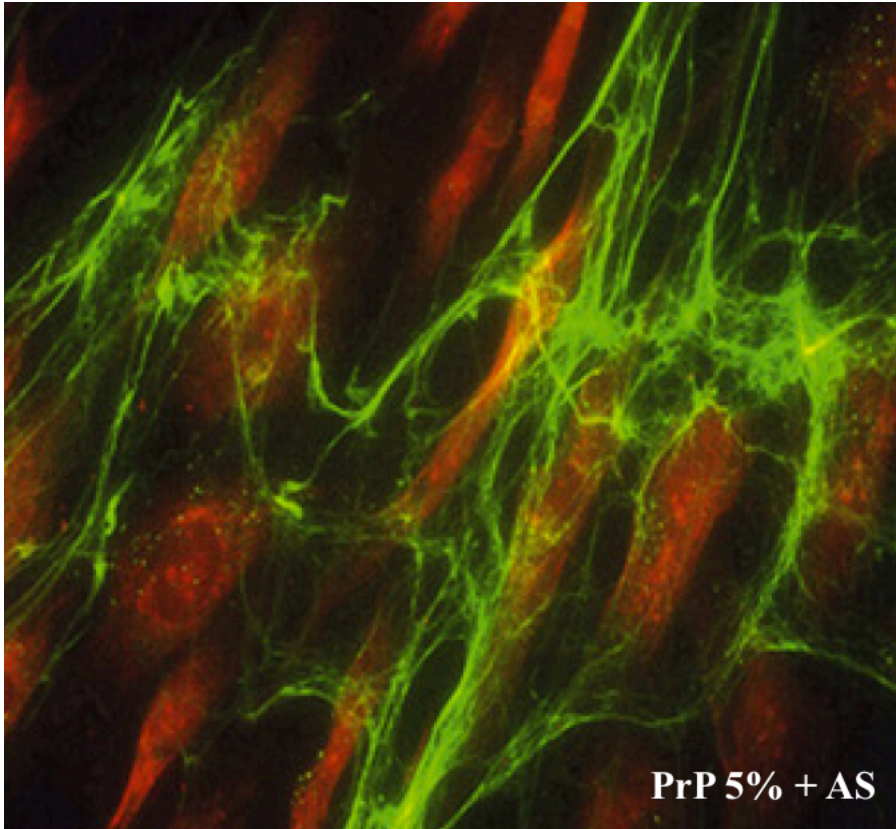


Figure 26 : Fibroblaste issus des SA après traitement par PrP 5% et ascorbate de sodium; immunomarquage pour le Collagène type I (vert) et les fibroblastes (rouges).

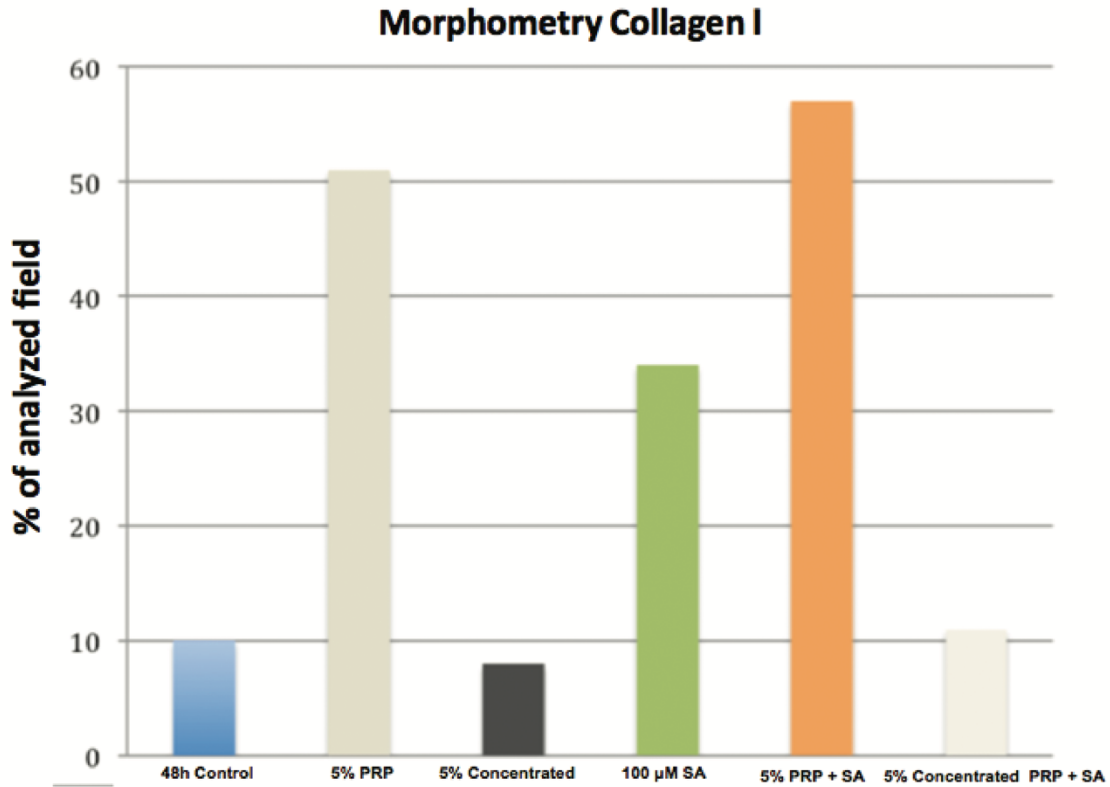
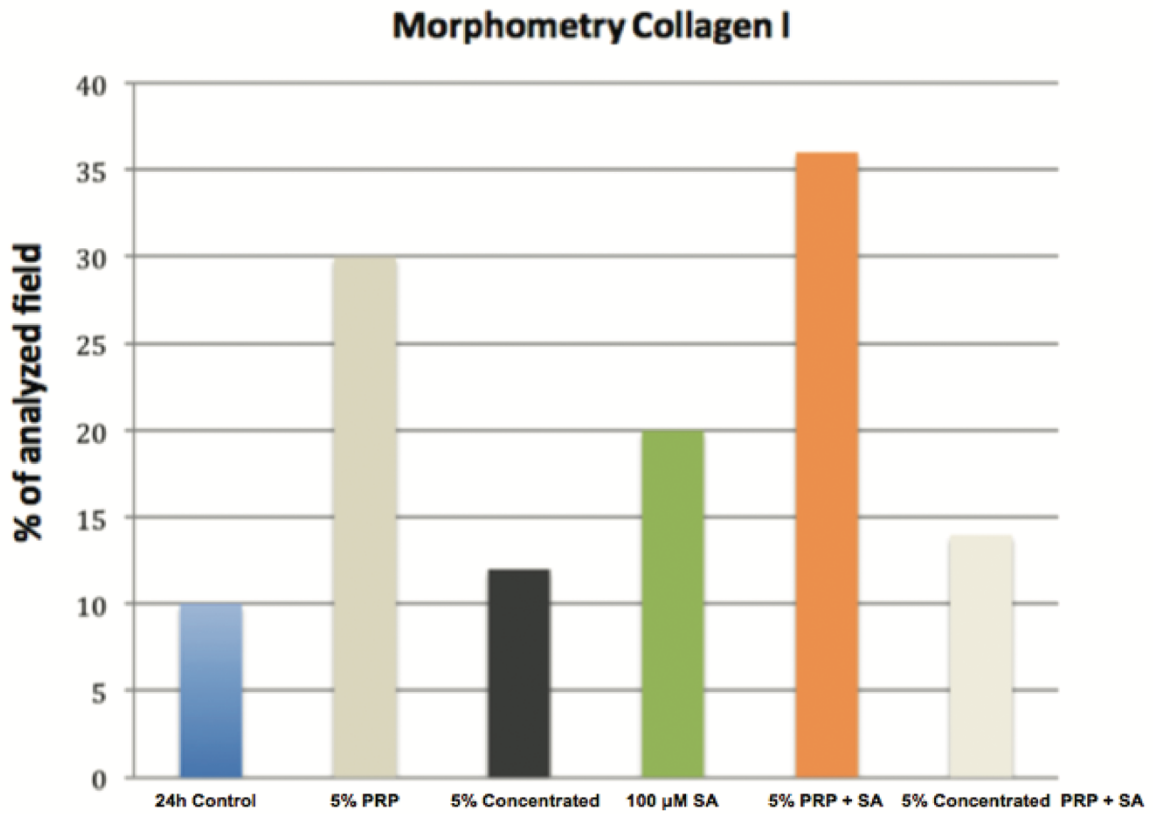


Figure 27 (a et b) : Résultats de l'évaluation morphométrique et quantification du collagène de type I à 24h (a) et 48h (b) après ajout des traitements aux cultures cellulaires.

ÉTUDE *IN VIVO*

Une étude prospective, randomisée en simple aveugle a été menée chez cinquante femmes âgées entre 37 et 50 ans ($43 \pm 6,8$) sans comorbidités et un IMC <30 ($29 \pm 1,3$), présentant des SA en région abdominale. Ces patients étaient volontairement demandeuses à la fois d'un traitement de leur SA et d'une procédure d'abdominoplastie conventionnelle, planifiée au moins 3 mois avant le début de l'étude.

Les critères d'exclusion étaient : un traitement en cours par corticostéroïdes et le syndrome de Cushing (les deux conditions peuvent altérer le métabolisme normal du derme).

Les patients avaient été informés du sujet et des caractéristiques de l'étude entre Octobre 2017 et Octobre 2019. Le projet a été approuvé par le comité éthique.

Aux fins de la randomisation, cent enveloppes cachetées ont été préparées par notre secrétaire médicale. À l'intérieur des enveloppes, il y avait un papier indiquant si la patiente allait participer à l'étude (50 enveloppes) ou pas (50 enveloppes). Les patients ont été invités à choisir une enveloppe cachetée, par le même chirurgien aveugle, qui ne savait pas ce qui était écrit sur le papier à l'intérieur des enveloppes (si le patient allait être inclus dans l'étude ou non). À la fin du processus de randomisation, 25 patients ont été sélectionnés pour être inclus dans l'étude.

Toutes ces patients avaient accepté de tester un nouveau traitement pour les SAs situés au niveau de la zone à exciser pendant la procédure d'abdominoplastie, et de faire don de l'excès de peau excisée (qui comprenait les zones traitées), qui autrement allait être jetée après la chirurgie. Le respect de leur vie privée a été strictement garanti et un consentement éclairé écrit avait été signé par toutes les patients. Chaque opération a été réalisée au CHU Henri Mondor par le même chirurgien.

Après discussion avec une équipe multidisciplinaire composé par 7 chirurgiens plasticiens et 5 dermatologues, nous avons décidé d'utiliser le **nanofat** (produit autologue) et non l'ascorbate de sodium (AS) pour l'étude *in vivo*, afin d'éviter tout type de réaction allergique qui pourrait être provoquée par certains excipients, contenus dans les formulations de AS, dont le métabisulfite de sodium (33).

Étant donné que l'étude *in vitro* a montré une augmentation statistiquement significative de la production de collagène lorsque les fibroblastes issues des SA (SAF) étaient traités par le PrP, il a été décidé pour la phase *in vivo* de traiter les SA avec:

PrP 10 ml

PrP 2ml (20%) + nanofat 8ml (80%)

Nanofat 10ml.

Pour éviter toute variation interindividuelle pouvant interférer avec les résultats, quatre SA de grade 4 (selon notre échelle: The Objective Stretch Marks photo-numerical Assessment Scale-OSMAS) ont été sélectionnés pour chaque patient, dont trois ont été traités et l'autre a été utilisée comme contrôle.

Plastic and Reconstructive Surgery
The Objective Stretch Marks photo-numerical Assessment Scale (OSMAS): a new and complete method to assess Striae Distensae.

Table 1. Development of the OSMAS

SEVERITY of SD for area	No SD	Slight intensity	Mild intensity	Moderate intensity	Severe intensity
Abdomen	0	1	2	3	4
Breasts	0	1	2	3	4
Hips	0	1	2	3	4
Gluteal area	0	1	2	3	4
Back area	0	1	2	3	4
Thighs	0	1	2	3	4
Calves	0	1	2	3	4
Arms	0	1	2	3	4

Le **Nanofat** est un dérivé filtré et émulsifié (liquéfiée) de la graisse, contenant une concentration élevée de cellules souches de dérivation adipeuse. Des recherches cliniques récentes (2013) du Dr Tonnard (34) ont montré des améliorations remarquables de la qualité de la peau après l'injection du nanofat, superficiellement, dans le derme et le sous-derme. Il a été démontré que le nanofat est riche en cellules souches mésenchymateuses (CSM), qui ont été appelées cellules souches dérivées du nanofat (NFSCs) (35). Les NFSCs appartiennent à une sous-catégorie de cellules souches de dérivation adipeuses (ASC), connues pour participer à la réparation tissulaire (36). Une étude récente a démontré une augmentation du dépôt de fibres de collagène de type I par les fibroblastes dermiques après injection intradermique de nanofat (36). Les cellules souches du nanofat contribuent à la différenciation cellulaire et agissent avec un mécanisme paracrine dans le procès de réparation et régénération tissulaire. Ces procès sont améliorées par la stimulation simultanée avec le plasma riche en plaquettes (37-39).

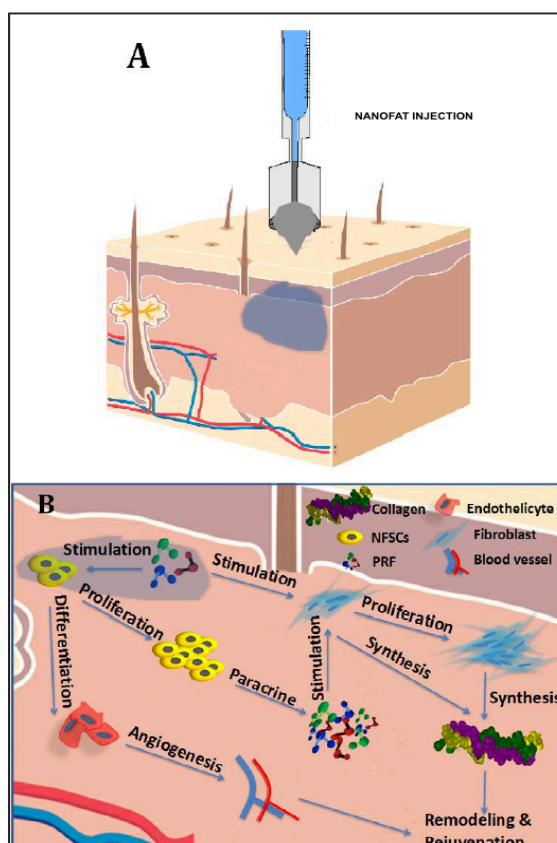


Figure 28 : Mécanisme d'action du nanofat

Ces observations ont été le rationnel qui nous a convaincus de tester un nouveau traitement combiné (nanofat + PRP) pour le traitement des SA.

Trois mois avant la chirurgie (abdominoplastie), les patients ont été traités en consultation. La procédure a été réalisée sous anesthésie locale. Après infiltration d'une solution contenant XYLOCAÏNE 10 mg/ml plus ADRENALINE 0,005 mg/ml, une lipoaspiration a été réalisée à l'aide d'une seringue luer lock de 10cc et une canule « tulipe » avec des orifices de 1mm, afin d'obtenir 10 cc environ de graisse à partir de la région abdominale de chaque patient. La graisse a ensuite été filtrée à l'aide d'un kit Tulip en passant les greffons adipeux à travers 3 réducteurs (2,4 mm, 1,4 mm, 1,2 mm) et un nano filtre pour obtenir une émulsion. Pour les SA à traiter avec Nanofat + PrP, le Nanofat 80% a été mélangé au PrP 20% (40). Les SAs étaient situés dans la zone de peau à retirer par dermolipectomie abdominale, qui a été réalisée trois mois après le traitement. Le PrP a été obtenu avec la même méthode décrite pour l'étude *in vitro*.



Figure 29 : Préparation du nanofat 80% + PRP 20%

Les produits ont été injectés en intradermique à l'aide d'une seringue de 10 cc avec un aiguille de 30 gauges.



Figure 30 : Exemple de deux SAs dont une a été traité par nanofat 80% + PRP 20% et l'autre n'a reçu aucun traitement.

Suite à l'excision de la peau abdominale et du pannicule adipeux, 2 biopsies (avec un punch de 2 mm) des zones traitées (nanofat, PrP, PrP et nanofat), de celles non traitées et de la peau saine ont été réalisées. Les biopsies ont été placées dans du formol et analysées à l'aide du kit Biotechne Elisa Human Pro-Collagen I $\alpha 1$ / COLIA1 pour la quantification du collagène de type I.

QUANTIFICATION DU COLLAGÈNE DE TYPE I PAR ELISA

Des coupes congelées en série de 7, 200 et 7 μm ont été préparées à partir des échantillons de biopsie cutanée. Des coupes dermiques de 7 μm ont été mesurés à l'aide du logiciel ProPlus Image (Media Cybernetics, Bethesda, Maryland) et utilisés pour calculer le volume de l'échantillon de 200 μm . Les protéines solubles ont été extraites de l'échantillon de 200 μm dans un tampon d'extraction glacé (50 mM de chlorhydrate de Tris, pH 7,4; 0,15 M de chlorure de sodium; 1% de Triton X-100; inhibiteurs de protéase [Complete Mini; Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana]). Après 5 minutes de centrifugation à 10 000 g à 4 ° C, les surnageants ont été dosés pour le collagène de type I à l'aide d'un kit ELISA (Human Pro-

Collagen I $\alpha 1$ / COLIA1 Biotechne - France). Les concentrations de collagène de type I ont été normalisées au volume de tissu utilisé pour chaque échantillon.

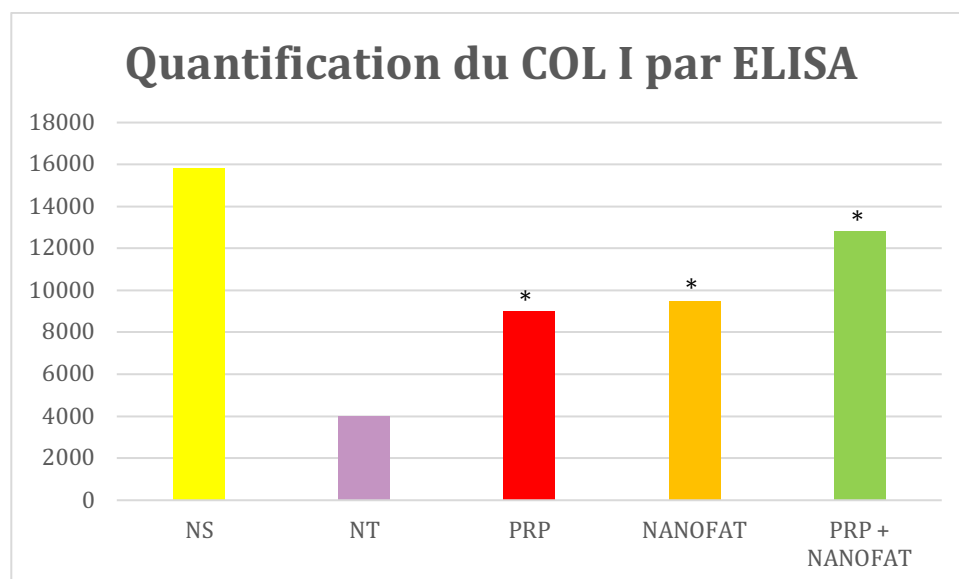
L'analyse statistique des données a été réalisée avec le logiciel PRISM (Graph Pad, USA).

La différence entre les résultats obtenus a été analysée avec le test T. (Signification statistique $p < 0,05$).

Quantification du collagène I par ELISA

La concentration moyenne de collagène de type I obtenue par dosage de la COLIA1 des biopsies dérivées de la peau saine (normal skin-NS) était en moyenne de 15850 ± 390 pg/mL, et de 3950 ± 239 pg/mL pour les biopsies de la peau avec Striae Albae (SA non traitées : SA-NT).

Comme on peut le voir (figure 31), le PrP et le nanofat ont contribué à augmenter la biosynthèse du collagène de façon significative par rapport au contrôle (SA-NT). Un effet plus important a été observé pour le SA traitées par le traitement combiné PrP-Nanofat ($p < 0.0001$).



NS : peau saine; NT : contrôle-SA non traitées (SA-NT)

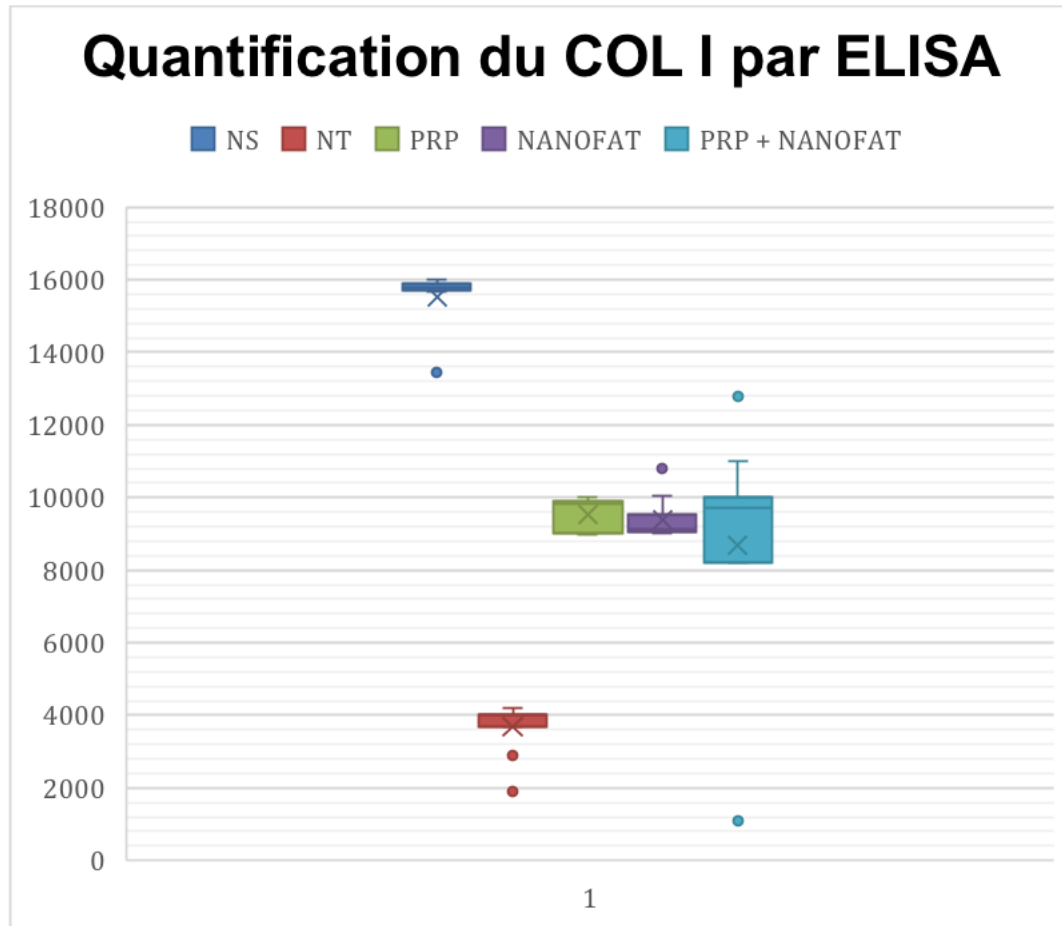


Figure 31 : Quantité de pro collagène type I; Y= Concentration pg/ml

Dans les images la petite étoile (*) indique que les différences observées ont été statistiquement significatives.

DISCUSSION

Plusieurs mécanismes semblent être à la base de l'apparition et de la chronicisation des Striae Distensae (15). Une altération du phénotype des fibroblastes qui se présente différemment dans les lésions initiales et anciennes semble être l'événement nécessaire et fondamental. Ces cellules semblent réagir au stress mécanique qui survient au niveau de la peau, se transformant dans un premier temps en myofibroblastes (alpha SMA+) puis en fibroblastes en quiescence (alpha SMA-).

Les forces mécaniques générées par les cellules ont un rôle biologique très important au niveau cellulaire (comme pour la mécano transduction, la vasorégulation etc.) et tissulaire (maintient de la tonicité). Ces forces peuvent être dérégulées et être à la base de certaines anomalies, avec parfois une perte de fonctions (41-42). Des anomalies et surtout des différences de forces générées par les fibroblastes issus des SD ont été observées à travers nos expérimentations. Nos résultats mettent en évidence un comportement mécanique des fibroblastes *in vitro* différent selon l'origine des cellules. Par leurs propriétés mécaniques, les fibroblastes des vergetures apparaissent comme une population différente des fibroblastes sains. Ceci est en conformité avec l'idée d'hétérogénéité fibroblastique (43).

Dans une matrice stressée, dans le cas des lattices de collagène tendus, la force des fibroblastes de vergetures récentes est significativement supérieure à celle développée par les fibroblastes sains et les fibroblastes des vergetures anciennes. Cette observation expliquerait donc un des moments clés dans l'apparitions des SD c'est à dire le stress mécanique auquel la peau est soumise lors de la grossesse ou de chaque changement pondéral de l'individu. La contraction des fibroblastes dans les lattices tendus résulte de l'activité contractile du cytosquelette de filaments d'actine qui se développe en fibres de stress caractéristiques des myofibroblastes. Le phénotype alpha SMA positif qui caractérise les fibroblastes des SR est fortement réduit dans les fibroblastes issus des vergetures anciennes. Nos résultats confirment

et donnent des informations supplémentaires à celles publiées par Viennet et al. (44). La stimulation combinée par PrP standard et ascorbate de sodium des fibroblastes issus des SA a montré une reprise de l'activité métabolique de ces cellules par une augmentation de production de collagène de type I et de la prolifération cellulaire.

Guszczyn et al. (45) a récemment publié ses résultats sur la stimulation des fibroblastes normaux par le PrP (46). Son étude aussi a démontré une augmentation de la synthèse du collagène de type I par les fibroblastes en cultures qui avaient été incubés avec différentes concentrations de PrP. Il nous semble que jusqu'à présent aucune étude n'a testé le PrP sur des cultures de fibroblastes issus des Striae Distensae.

Dans notre étude la stimulation par thérapie combinée PrP/Ascorbate de sodium s'est avérée être supérieure par rapport aux autres traitements, ces traitements n'avaient jamais été testés en combinaison.

Également les résultats de l'étude *in vivo* ont démontré que le PrP et le nanofat contribuent à augmenter la biosynthèse du collagène de façon significative par rapport au contrôle (SA non traitées). Un effet plus important a été observé pour les SAs traitées par le traitement combiné PrP-Nanofat. C'est la première fois que ce type de traitement a été utilisé pour les SD.

L'importance de la recherche d'une stratégie efficace pour le traitement des SD et surtout des SA, est dû au fait que la survenue des vergetures est un événement marquant, voire traumatisant surtout pour les femmes et qu'actuellement, il n'y a pas de traitement résolutif pour le SD. Nos résultats même si encourageants, nécessitent d'ultérieurs essais pour pouvoir confirmer la reproductibilité.

Notre étude montre des résultats encourageants et ouvre les portes aussi à d'autres domaines d'applications de cette thérapie comme par exemple la stimulation de la régénération cutanée chez les patients brûlés, les plaies chroniques ou tous types de conditions où une stimulation des fibroblastes se rend nécessaire.

PROSPECTIVES FUTURES :

L'intérêt d'un traitement combiné capable de stimuler les fibroblastes pathologique à produire une quantité efficace de collagène pourrait utile non seulement dans le cadre des SD, mais aussi dans la stimulation et la prolifération des fibroblastes induite par ces méthodes par exemple dans la prolifération de keratinocytes et la restauration du tissu cutané chez le grand brulé.

D'autres applications sont envisageables comme par exemple dans le traitement des plaies chroniques. Ou encore il a été récemment démontré que les fibroblastes dermiques des patients atteints par la Syndrome de Ehlers-Danlos peuvent retrouver un phénotype normal si exposé à des concentrations physiologiques de collagène (47).

Des essais de nos traitements pourraient être fait sur les fibroblastes dermiques de ces patients etc.

REFERENCES

1. Paus R. Exploring the “brain-skin connection”: Leads and lessons from the hair follicle. *Curr Res Transl Med* 2016;64:207-14.
2. Rinkevich Y, Walmsley GG, Hu MS, Maan ZN, Newman AM, Drukker M, et al. Skin fibrosis. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential. *Science* 2015;348:aaa2151.
3. Kwan P, Desmoulière A, Tredget EE. Molecular and cellular basis of hypertrophic scarring. In: Herndon DN (ed). *Total Burn Care*. (4th edition). Paris;Elsevier, 2012:497-505.
4. Hinz B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech* 2010;43:146-55.
5. Aarabi S, Bhatt KA, Shi Y, Paterno J, Chang EI, Loh SA, et al. Mechanical load initiates hypertrophic scar formation through decreased cellular apoptosis. *FASEB J* 2007;21:3250-61.
6. Yagmur C, Akaishi S, Ogawa R, Guneren E. Mechanical receptor-related mechanisms in scar management: a review and hypothesis. *Plast Reconstr Surg*. 2010;126:426-34.
7. Britt ter Horst, Gurpreet Chouhan, Naiem S. Moiemmen, Liam M. Grover. Advances in keratinocyte delivery in burn wound care.. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018; 123: 18–32.
8. Gilmore SJ1, Vaughan BL Jr, Madzvamuse A, Maini PK. A mechanochemical model of striae distensae. *Math Biosci*. 2012 Dec;240(2):141-7.
9. A.J. Arem, C.W. Kischer, Analysis of striae, *Plast. Reconstr. Surg.* 65 (1) (1980) 22-9.
10. Cohen-Letessier A., Cutaneous striae : a disorder of fibroblasts? Aetiologic theories. *Nouv Dermatol*, 1998, 17. 431-435.

11. Youssef SES1, El-Khateeb EA, Aly DG, Moussa MH. Striae distensae: Immunohistochemical assessment of hormone receptors in multigravida and nulligravida. *J Cosmet Dermatol.* 2017 Jun;16(2):279-286. doi: 10.1111/jocd.12337. Epub 2017 Apr 4.
12. H.M. Sheu, H.S. Yu, C.H. Chang, Mast cell degranulation and elastolysis in the early stage of striae distensae, *J. Cutan. Pathol.* 18 (6) (1991) 410.
13. G. Singh, L.P. Kumar, Striae distensae, *Indian J. Dermatol. Ve.* 71 (5) (2005) 370.
14. K.S. Lee, Y.J. Rho, S.I. Jang, M.H. Suh, J.Y. Song, Decreased expression of collagen and fibronectin genes in striae distensae tissue, *Clin. Exp. Dermatol.* 19 (4) (1994) 285.
15. Hersant B, Niddam J, Meningaud JP. Comparison between the efficacy and safety of platelet-rich plasma vs microdermabrasion in the treatment of striae distensae: clinical and histopathological study. *Cosmet Dermatol.* 2016; 15:565.
16. Guida S, Galimberti MG, Bencini M, Pellacani G, Bencini PL. Treatment of striae distensae with non-ablative fractional laser: clinical and in vivo microscopic documentation of treatment efficacy. *Lasers Med Sci.* 2018 Jan;33(1):75-78.
17. Antonopoulou I, Varriale S, Topakas E, Rova U, Christakopoulos P, Faraco V. Enzymatic synthesis of bioactive compounds with high potential for cosmeceutical application. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016 Aug;100(15):6519-6543.
18. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225–228.
19. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* 2009;23(4):177–189.

20. Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(3):67
21. Donjacour AA, Cunha GR. Stromal regulation of epithelial function. *Cancer Treat Res.* 1991;53:335–364.
22. Veronesi F, Pagani S, Torricelli P, Filardo G, Cavallo C, Grigolo B, Fini M. PRP and MSCs on tenocytes artificial wound healing: an in vitro study comparing fresh and frozen PRP. *Histol Histopathol.* 2018 (3):18018. doi: 10.14670/HH-18-018.
23. Jun Araki, Masahiro Jona, Hitomi Eto, Noriyuki Aoi, Harunosuke Kato, Hirotaka Suga, Kentaro Doi, Yutaka Yatomi, Kotaro Yoshimura. Optimized Preparation Method of Platelet-Concentrated Plasma and Noncoagulating Platelet-Derived Factor Concentrates: Maximization of Platelet Concentration and Removal of Fibrinogen. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012 Mar; 18(3): 176–185.
24. Carola Cavallo, Alice Roffi, Brunella Grigolo, Erminia Mariani, Loredana Pratelli, Giulia Merli, Elizaveta Kon, Maurilio Marcacci, Giuseppe Filardo. Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 6591717.
25. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2004 Apr;62(4):489–96.
26. Cervelli V, Gentile P, Scioli MG. Application of platelet-rich plasma in plastic surgery: clinical and in vitro evaluation. *Tissue Eng Part C Methods* 2009; 15(4): 625-634.
27. Cervelli V, De Angelis B, Lucarini L, Sapallone D, Balzani A, Palla L, Gentile P, Cerulli P. Tissue regeneration in loss of substance on the lower limbs through use of

- platelet-rich plasma, stem cells form adipose tissue, and hyaluronic acid. *Adv Skin Wound Care* 2010; 23(6):262-272.
28. Roubelakis MG, Trohatou O, Roubelakis A, Mili E, Kalaitzopoulos I, Papazoglou G, Pappa KI, Anagnou NP. Platelet-rich plasma (PRP) promotes fetal mesenchymal stem/stromal cell migration and wound healing process. *Stem Cell Rev* 2014Jun;10(3):417-28.
29. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2006;118(6):147–159.
30. Tajima S, Wachi H, Hayashi A. Accumulation of tropoelastin by a short-term ascorbic acid treatment in the culture medium of aortic smooth muscle cells in vitro. *Keio J Med* 1995;44:140–5.
31. Corti A, Casini AF, Pompella A. Cellular pathways for transport and efflux of ascorbate and dehydroascorbate. *Arch Biochem Biophys* 2010;500:107–15.
32. Godoy A, Ormazabal V, Moraga-Cid G, Zuniga FA, Sotomayor P, Barra V, et al. Mechanistic insights and functional determinants of the transport cycle of the ascorbic acid transporter SVCT2. Activation by sodium and absolute dependence on bivalent cations. *J Biol Chem* 2007;282:615–24.
33. Cussans, Amelia; McFadden, John; Ostlere, Lucy. Systemic sodium metabisulfite allergy. *Contact dermatitis*. 2015, Vol.73(5), p.316-317
34. Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, Hamdi M, Cornelissen M, Declercq H. Nanofat grafting: basic research and clinical applications. *Plast Reconstr Surg*. 2013;132(4):1017-26.
35. Liang ZJ et al. Precise Intradermal Injection of Nanofat-Derived Stromal Cells Combined with Platelet-Rich Fibrin Improves the Efficacy of Facial Skin Rejuvenation. *Cell Physiol Biochem* 2018;47:316–329

36. Charles-de-Sá L, Gontijo-de-Amorim NF, Maeda-Takiya C, Borojevic R, Benati D, Bernardi P, Sbarbati A, Rigotti G: Antiaging treatment of the facial skin by fat graft and adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2015;135:999–1009.
37. Xu FT, Liang ZJ, Li HM, Peng QL, Huang MH, Li de Q, Liang YD, Chi GY, Li DH, Yu BC, Huang JR: Ginsenoside Rg1 and platelet-rich fibrin enhance human breast adipose-derived stem cell function for soft tissue regeneration. *Oncotarget* 2016;7:35390–35403.
38. Keyhan SO, Hemmat S, Badri AA, Abdeshahzadeh A, Khiabani K: Use of platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in combination with fat graft: which is more effective during facial liposuction? *J Oral Maxillofac Surg* 2013;71:610–621.
39. Cameli N, Mariano M, Cordone I, Abril E, Masi S, Foddai ML: Autologous pure platelet-rich plasma dermal injections for facial skin rejuvenation: clinical, instrumental, and flow cytometry assessment. *Dermatol Surg.* 2017;43:826–835.
40. Picard F, Hersant B, La Padula S, Meningaud JP. Platelet-rich plasma-enriched autologous fat graft in regenerative and aesthetic facial surgery: Technical note. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2017 Sep;118(4):228-231.
41. Pushkarsky I, et al. (2018). Elastomeric sensor surfaces for high-throughput single-cell force cytometry. *Nature Biomedical Engineering* 2: 124-137.
42. Wang N., Butler J.-P., Ingber D.-E., Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 1993, 260, 1124-1127.
43. Sappino A.-P., Schürch W., Gabbiani G., Biology of disease : differentiation repertoire of fibroblastic cells : expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab. Invest.*, 1990, 63, 144-161.

44. Viennet C, Bride J, Armbruster V, Aubin F, Gabiot AC, Gharbi T, Humbert P. Contractile forces generated by striae distensae fibroblasts embedded in collagen lattices. *Arch Dermatol Res*. 2005 Jul;297(1):10-7.
45. Guszczyn T, Suraczyński A, Zaręba I, Rysiak E, Popko J, Pałka J. Differential effect of platelet-rich plasma fractions on β 1-integrin signaling, collagen biosynthesis, and prolidase activity in human skin fibroblasts. *Drug Des Devel Ther*. 2017 Jun 22;11:1849-1857.
46. Peng GL. Platelet-Rich Plasma for Skin Rejuvenation: Facts, Fiction, and Pearls for Practice. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2019. 27(3):405-411.
47. Viglio S, Zoppi N, Sangalli A, Gallanti A, Barlati S, Mottes M, Colombi M, Valli M. Rescue of migratory defects of Ehlers-Danlos fibroblasts in vitro by type V collagen but not insulin-like binding protein-1. 2008, *J Invest Dermatol* 128:1915-19.