

Protéger et vitaliser les

Très récemment il a été identifié au niveau du derme, une niche de cellules souches capables notamment de générer de nouveaux fibroblastes. Après avoir conçu une technique permettant d'évaluer l'activité de ces cellules souches dermiques, Mibelle Biochemistry a développé un actif d'origine végétale capable d'améliorer leur vitalité.

► Que sont les cellules souches?

Les cellules souches sont des cellules non spécialisées capables de s'auto-renouveler tout au long de la vie de l'organisme. Les tissus adultes contiennent des cellules souches dites multi- ou unipotentes, c'est-à-dire capables de se différencier en plusieurs ou un seul type cellulaire, respectivement. Grâce à leur aptitude à générer de nouvelles cellules, ces cellules

souches adultes assurent la réparation et la régénération du tissu auquel elles appartiennent.

► Le rôle essentiel des cellules souches dermiques

L'épiderme se renouvelle et se répare constamment tout au long de la vie. Et ce sont les cellules souches situées au niveau de la couche basale de l'épiderme qui assurent ce processus, essentiel au maintien

de la fonction barrière. La protection ou la stimulation des cellules souches de l'épiderme est devenu un sujet d'actualité en cosmétique. Des tests *in vitro* réalisés sur des cellules souches de l'épiderme ont été établis et permettent de revendiquer l'effet de certains actifs sur les cellules souches de l'épiderme. Mais qu'en est-il pour les cellules souches du derme? Jusqu'à aujourd'hui, elles n'ont pas été la cible de produits cosmétiques bien qu'elles pourraient jouer un rôle décisif dans le vieillissement cutané. Les fibroblastes, qui représentent le principal type de cellules dans le derme, assurent la production en continu de collagène et d'élastine qui forment la matrice extracellulaire et confèrent élasticité et fermeté à la peau. Or, le vieillissement cutané se caractérise par un nombre croissant de fibroblastes sénescents. Ces cellules n'ont pas seulement arrêté de produire du collagène et de l'élas-

Protecting and vitalizing dermal

Very recently, a niche of stem cells able to generate, notably, new fibroblast cells, was identified in the dermis. After designing a technique to evaluate the activity of these dermal stem cells, Mibelle Biochemistry developed a plant origin active ingredient able to improve their vitality.

► What are stem cells?

Stem cells are unspecialized cells able to self-renew over the whole life period of the organism. Adult tissues contain multi- or unipotent stem cells, indicating that they can differentiate into more than one cell type or only one cell type, respectively. These

adult stem cells are responsible for a continuous supply of new cells essential for repair and regeneration.

► The essential role of dermal stem cells

The epidermis is constantly renewed and repaired throughout life. This

process which is essential for the maintenance of the normal barrier function, is mediated by stem cells located in the basal layer of the epidermis. Protection or stimulation of stem cells in the epidermis has become a hot topic in cosmetics. In vitro test systems using epidermal stem cells have been established which allow

cellules souches dermiques

tine, elles ont également commencé à détruire la matrice existante ⁽¹⁾. Or, le remplacement de ces cellules sénescents par de nouveaux fibroblastes ne peut être orchestré que par des cellules souches du derme. Un pool de cellules souches dermiques se divisant lentement doit donc exister. Mais, compte-tenu du nombre limité de division que les cellules souches adultes peuvent subir (« Hayflick limit »), l'épuisement de ce pool de cellules limite la durée de vie du tissu auquel il appartient. Ainsi, les traitements qui renforcent la capacité fonctionnelle des cellules souches adultes ont un réel potentiel anti-âge.

► **La papille dermique, une niche de cellules souches**

La recherche sur les cellules souches du derme est relativement nouvelle par rapport à celle

concernant les cellules souches de l'épiderme. Les premiers rapports concernant les cellules multipotentes du derme datent de 2001 ⁽²⁾. Ils ont montré la capacité de ces cellules souches à se différencier en adipocytes, en cellules musculaires et même en neurones. La recherche s'est donc intensifiée car

la peau pourrait fournir une source accessible de cellules souches pour la transplantation. Les expérimentations concernant la localisation exacte de ces cellules souches multipotentes ont montré qu'elles sont toujours situées près du follicule pileux, au niveau de la papille et de la zone périfolliculaire.

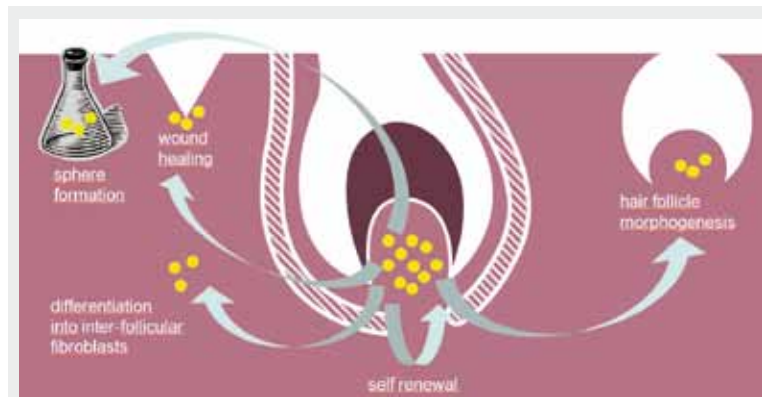


FIGURE 1 :
LA PAPILLE DERMIQUE,
UNE NICHE DE CELLULES SOUCHES / PROGÉNITRICES DERMQUES
THE DERMAL PAPILLA AS A NICHE FOR DERMAL STEM/PROGENITOR CELLS

stem cells

claims for epidermal stem cell activities. But what about the stem cells in the dermis? Until now, they have not been addressed by cosmetic treatments although they might play a decisive role in skin aging. Fibroblasts, the prominent cell type in the dermis, are responsible for the continuous production of collagen and elastin which form the extracellular matrix and confer elasticity and firmness to the skin. Aging skin is characterized by an increasing number of senescent fibroblasts. These cells have not only stopped to produce collagen and elastin but even start to break down the existing matrix ⁽¹⁾. The replacement of these senescent cells by new fibroblast cells can only be

provided by dermal stem cells. There must be a pool of slowly dividing dermal stem cells. But the number of divisions stem cells of adult tissues can undergo is limited (Hayflick limit), thus, exhaustion of this pool of cells limits the lifespan of the tissue. Treatments that reinforce the functional ability of tissue stem cells, have a real anti-aging potential.

► **The dermal papilla is a niche for stem cells**

Compared to epidermal stem cells, research on stem cells of the dermis is relatively new. In 2001, the first reports about multipotent cells of the dermis appeared ⁽²⁾. These stem

cells were found to be able to differentiate into adipocytes, muscle cells and even neurons. Research was then intensified because the skin may provide an accessible source of stem cells for transplantation. Experiments about the exact localization of these multipotent stem cells showed that they are always located near the hair follicle, in the papilla and the perifollicular area. But at that time, it was not clear whether these multipotent stem cells could also differentiate into fibroblasts, i.e. acting as dermal stem cells, responsible for maintaining and repairing the dermis. Also nothing was known about the specific markers of these multipotent stem cells. At the end of

Mais à ce stade, des incertitudes subsistaient quant à la capacité de ces cellules souches multipotentes à se différencier également en fibroblastes, et donc à agir comme des cellules souches dermiques responsables du maintien et de la réparation du derme. D'autre part, aucun marqueur spécifique de ces cellules souches multipotentes n'avait été identifié. Fin 2009, Biernaskie et al. montrèrent que les cellules de la papille dermique exprimaient le gène marqueur de cellules souches Sox2, et avaient tendance à croître en colonies sous la forme de sphères⁽³⁾. Sox2 est un facteur de transcription qui s'est avéré essentiel pour maintenir le phénotype pluripotent des cellules souches⁽⁴⁾. Il a été montré que les cellules positives à Sox2

s'auto-renouelaient, induisaient la formation de follicules pileux et migraient dans le derme inter-folliculaire où elles proliféraient et se différenciaient en fibroblastes capables de régénérer la matrice extracellulaire (Fig. 1). Pour la première fois, la papille dermique a été identifiée comme une niche de cellules souches / progénitrices du derme. Les cellules exprimant Sox2 et formant des sphères sont très probablement identiques aux cellules souches multipotentes précédemment identifiées. L'identification de cellules souches dermiques ouvre maintenant la porte à une nouvelle génération de produits cosmétiques revendiquant une action sur les cellules souches de la peau : protection et vitalisation des cellules souches der-

miques humaines pour restaurer la fermeté cutanée et réduire la profondeur des rides.

► Mesurer l'activité des cellules souches dermiques

Les cellules souches dermiques ont été isolées de la papille dermique de follicules pileux humains excisés. Ces cellules ont été maintenues en culture monocouche pendant au moins 11 passages. Aux passages 3 et 11, les cellules transférées dans des gouttes suspendues ont formé des sphères 3D⁽⁵⁾, montrant ainsi que les cellules progénitrices conservaient cette caractéristique importante même après une longue culture. De plus, le marquage immunofluorescent des sphères entières a montré un marquage positif pour Sox2, proposé comme marqueur des cellules souches dermiques. Enfin, les cellules dissociées des sphères primaires, lorsqu'elles sont remises en culture dans des boîtes de Pétri classiques utilisées pour la culture monocouche de routine, forment

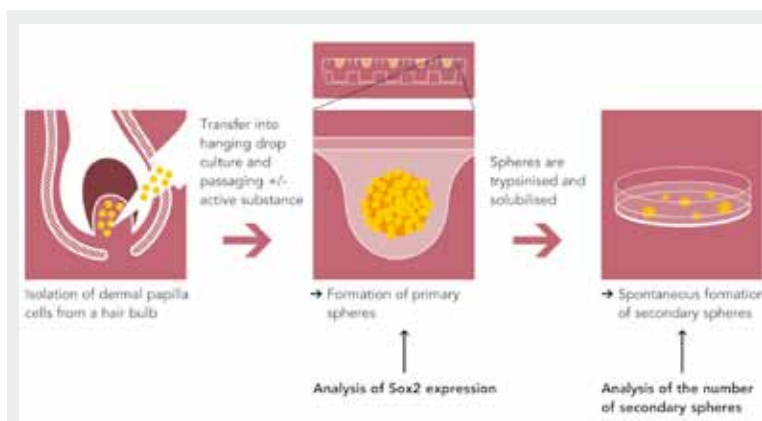


FIGURE 2 :
DÉVELOPPEMENT D'UN TEST POUR ÉVALUER L'EFFET D'ACTIFS SUR LA VITALISATION DES CELLULES SOUCHES DERMIFIQUES
DESIGN OF A TEST TO SCREEN ACTIVE INGREDIENTS FOR DERMAL STEM CELL VITALIZATION

2009, Biernaskie et al. showed that dermal papilla cells express the stem cell marker gene Sox2 and have a tendency to grow in colonies in the form of spheres⁽³⁾. Sox2 is a transcription factor, shown to be essential to maintain the pluripotent phenotype of stem cells⁽⁴⁾. The Sox2-positive cells were found to self-renew, to induce the formation of hair follicles and to migrate into the inter-follicular dermis where they proliferated and differentiated to fibroblast cells able to regenerate the extracellular matrix (Fig. 1). For the first time, the dermal papilla was identified as a niche for dermal stem/progenitor cells. The sphere-forming, Sox2-expressing

cells are most probably identical to the previously identified multipotent stem cells. The identification of dermal stem cells now opens the door to the next generation of stem cell cosmetics: protection and vitalization of human dermal stem cells for restoration of skin firmness and wrinkle reduction.

► Measuring dermal stem cell activity

Dermal stem cells were isolated from the dermal papilla of excised human hair follicles. These cells were maintained as a monolayer culture for at least 11 passages.

At both passage 3 and passage 11 cells transferred into hanging drops formed 3D spheres⁽⁵⁾, demonstrating that this important characteristic of progenitor cells was retained even after longer-term cultivation. In addition, immunofluorescent labeling of whole mount spheres showed positive staining for the Sox2, a proposed dermal stem cell marker. When cells dissociated from primary spheres were seeded back into classical cell culture dishes used for routine monolayer culture, numerous secondary spheres were spontaneously formed (Fig. 2). In order to evaluate ingredients for a dermal stem cell vitalization potential, the intensity and uniformity of Sox2-labelling in primary spheres and the number of secondary spheres formed were used as parameters.

spontanément de nombreuses sphères secondaires. (Fig. 2). Afin d'évaluer la capacité d'ingrédients à vitaliser les cellules souches dermiques, l'intensité et l'uniformité du marquage Sox2 dans les sphères primaires et le nombre de sphère secondaires formées ont été sélectionnés comme paramètres.

► **Obtention de cellules souches d'argan**

L'arganier (*Argania spinosa*), originaire du sud ouest du Maroc, s'est parfaitement adapté à son environnement aride. Cet arbre joue un rôle écologique important puisqu'il fournit du bois et de l'huile. L'arganier faisant partie des espèces en voie de disparition, il ne peut être utilisé en tant qu'ingrédient dans des produits cosmétiques, d'où l'utilisation de la technique de culture cellulaire qui requiert une seule fois une toute petite partie de végétal. Cette technique, qui repose sur la propagation de cellules souches végétales permet de produire une matière végétale dans des conditions standardisées et stériles indépendamment des saisons

► **Obtention of argan stem cells**

The argan tree (*Argania spinosa*) is native in the southwestern regions of Morocco. The tree, perfectly adapted to the arid climate, has an important ecological role as a provider of wood and oil. Argan trees are an endangered species and as such they cannot be used as a raw material for a cosmetic ingredient. Instead, the plant tissue culture technique, which only requires once, a small tissue sample, was used to produce raw material from argan. The technique, based on the propagation of plant stem cells allows the production of plant material under sterile and standardized conditions independent of season and other environmental restraints. After wounding of the

et autres facteurs environnementaux. Après blessure du tissu végétal, la cicatrisation au niveau des surfaces incisées commence et une masse cellulaire appelée cal se forme. Les cellules du cal sont en fait des cellules qui se sont dédifférenciées et ont donc perdu les caractéristiques distinctives des cellules végétales normales. Les cellules du cal sont des cellules souches comparables à celles des régions du méristème. En partant de jeunes pousses d'argan, l'induction du cal et sa culture ont été réalisées selon des pratiques standardisées. La production de métabolites secondaires a été contrôlée par HPLC et spectrophotométrie UV/Visible. L'extrait de cellules souches d'argan a été obtenu après rupture de la paroi des cellules végétales, réalisée par homogénéisation sous haute-pression.

► **Vitaliser les cellules souches dermiques**

Les cellules de la papille dermique, isolées de follicules pileux humains excisés, ont été cultivées pendant 6 passages en présence de 0.1% de

plant tissue, healing at the cut surfaces begins with the formation of a cell mass known as a callus. These cells have dedifferentiated into cells that lack the distinctive features of normal plant cells. Callus cells are stem cells comparable to those in the meristem regions. Starting from argan shoots, callus induction and sub-cultivation was carried out according to standard practice. Production of secondary metabolites was followed by HPLC and UV/VIS analysis. The extract of argan stem cells was obtained after lysis of the plant cells using high pressure homogenization.

► **Vitalizing dermal stem cells**

Dermal papilla cells, isolated from excised human hair follicles, were cultured over 6 passages in pres-

ence of 0.1% of the argan stem cell extract. Cells of passage 9 were used for primary sphere formation in hanging drops. 16 days after injection of 3000 cells into 10 µl drops, the primary spheres were prepared for immunohistochemical analysis of expression of the stem cell marker Sox2. The cell nuclei were shown by DAPI staining. Compared to control cultures, the immunofluorescence pictures showed clearly an enhanced expression of Sox2 in spheres formed by dermal papilla cells cultured with the argan stem cell extract (Fig. 3). For the formation of secondary spheres, primary spheres in hanging drops

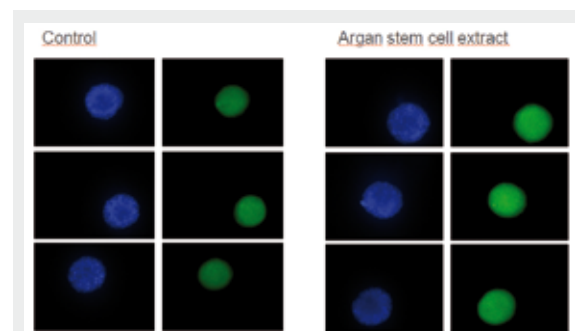


FIGURE 3 :
MARQUAGES IMMUNOFLUORESCENTS DES SPHÈRES :
DAPI POUR L'ADN (BLEU) ET SOX2 (VERT)
IMMUNOFLUORESCENCE PICTURES OF SPHERES WITH DAPI STAINING
FOR DNA (BLUE) UND SOX2-STAINING (GREEN)

ence of 0.1% of the argan stem cell extract. Cells of passage 9 were used for primary sphere formation in hanging drops. 16 days after injection of 3000 cells into 10 µl drops, the primary spheres were prepared for immunohistochemical analysis of expression of the stem cell marker Sox2. The cell nuclei were shown by DAPI staining. Compared to control cultures, the immunofluorescence pictures showed clearly an enhanced expression of Sox2 in spheres formed by dermal papilla cells cultured with the argan stem cell extract (Fig. 3). For the formation of secondary spheres, primary spheres in hanging drops

References

- (1) Campisi J. The role of cellular senescence in skin aging. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 3 (1), 1-5 (1998).
- (2) Toma J.G., Akhavan M., Fernandes K.J., Barnab-Heider F., Sadikot A., Kaplan D.R., Miller F.D. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*, 3 (9), 778-784 (2001).
- (3) Biernaskie J., Paris M., Morozova O., Fagan B.M., Marra M., Pevny L., Miller F.D. SKPs derive from hair follicle precursors and exhibit properties of adult dermal stem cells. *Cell Stem Cell*, 5 (6), 610-623 (2009).
- (4) Rodda D.J., Chew J.L., Lim L.H., Loh Y.H., Wang B., Ng H.H., Robson P. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*, 280 (26), 24731-24737 (2005).
- (5) Higgins C.A., Richardson G.D., Ferdinando D., Westgate G.E., Jahoda C.A. Modelling the hair follicle dermal papilla using spheroid cell cultures. *Exp Dermatol*, 19 (6), 546-548 (2010).

primaires dans les gouttes suspendues ont été digérées avec TrypLE pendant 30 minutes à 35°C. Les cellules ont été comptées et ensemencées à 10 000 cellules par puits sur des plaques à 24 puits. Après 3 semaines, le nombre de sphères secondaires formées a été déterminé. L'extrait de cellules souches d'argan s'est avéré avoir un effet stimulant sur la formation de sphères secondaires (Fig. 4); par rapport à la culture contrôle, leur nombre a été augmenté de 89%. Ainsi, ces résultats prouvent l'effet bénéfique de l'extrait de cellules souches d'argan sur les caractéristiques de cellules souches des cellules de la papille dermique.

► Conclusion

La papille dermique contient un pool de cellules souches multipotentes. Au cours de la dernière décennie, il a été montré que ces cellules souches pouvaient se différencier en cellules dérivées du mésenchyme telles que les adipocytes,

were digested with TrypLE for 30 minutes at 35°C. The cells were counted and seeded at 10'000 cells per well into 24well plates. After 3 weeks, the number of secondary spheres formed was determined. Incubation with the argan stem cell extract was found to stimulate the formation of secondary spheres (Fig. 4). Compared to the control culture, the number was increased by 89%. Overall, the results prove the beneficial effect of the argan stem cell extract on the stem cell characteristics of the dermal papilla cells.

► Conclusion

The dermal papilla contains a pool of multipotent stem cells. In the last decade, it was shown that these stem cells could differentiate into mesenchyme-derived cells

les cellules musculaires, les ostéocytes et chondrocytes. La recherche sur ces cellules s'est beaucoup intensifiée car la peau représente une source accessible de cellules souches pour la transplantation. Très récemment, il a été montré que la papille dermique et la gaine peri-folliculaire contenaient des cellules positives à Sox2 qui pouvaient reconstituer le derme et induire la morphogénèse du follicule pileux, autrement dit, qui avaient les caractéristiques de cellules souches / progénitrices dermiques. Ces découvertes ne sont pas totalement surprenantes puisque le derme est également un tissu dérivant du mésenchyme. Mais pour la première fois, une niche de cellules souches / progénitrices dermiques a été identifiée. Ces cellules sont très précieuses pour les thérapies de cicatrisation et représentent également une cible intéressante pour les actifs

cosmétiques, compte tenu notamment du fait que la zone de la papille dermique est accessible par la voie pilo-sébacée, pour les actifs cosmétiques. La protection et même la stimulation des caractéristiques « cellules souches » de ces cellules souches / progénitrices dermiques permettraient donc de prévenir le vieillissement à sa source.

Suite à l'analyse de l'expression de Sox2 et du potentiel de formation des sphères, deux caractéristiques de cellules souches, typiques des cellules souches / progénitrices dermiques, un extrait de cellules souches d'argan a été identifié comme un nouvel actif cosmétique ayant des effets bénéfiques sur les cellules souches du derme. ■

Daniel Schmid, Esther Belser, Fred Zuelli, Elodie Mauger – Mibelle Biochemistry, Suisse / Switzerland

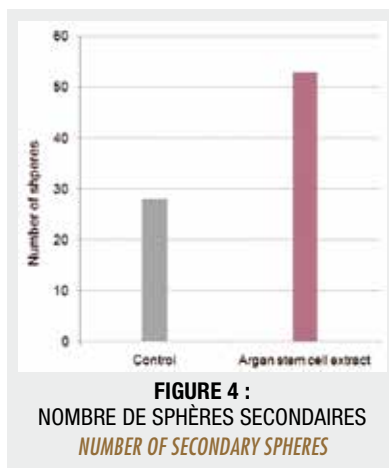


FIGURE 4 :
NOMBRE DE SPHÈRES SECONDAIRES
NUMBER OF SECONDARY SPHERES

such as adipocytes, muscle cells, osteocytes and chondrocytes. Of course, research on these cells was very intense because they are an easily accessible source for stem cell transplantation. Only recently it was shown that the perifollicular sheath and the papilla contain Sox2-positive cells that can reconstitute the dermis and induce hair follicle morphogenesis. These are characteristics of dermal stem/progenitor cells. These findings are not completely surprising because the dermis also represents a mesenchyme-derived tissue. But for the first time a niche

for dermal stem/progenitor cells was identified. These cells are very precious for wound healing therapies and represent also an interesting target for cosmetic ingredients. Especially, because over the hair follicle absorption route the dermal papilla zone is accessible for cosmetic active compounds. Protection or even stimulation of the stem cell characteristics of these dermal stem/progenitor cells represents a fundamental anti-aging approach. Analyzing Sox2-expression and sphere-formation potential, two very typical stem cell characteristics of dermal stem/progenitor cells, an extract of *Argania spinosa* stem cells was identified as a new cosmetic ingredient with beneficial effects on dermal stem cells. ■