



HAL
open science

Évolution de modèles tridimensionnels de peau reconstruite pour approfondir la connaissance des mécanismes du vieillissement cutané et validation de l'efficacité “ anti-âge ” du sélénium

Lara Jobeili

► **To cite this version:**

Lara Jobeili. Évolution de modèles tridimensionnels de peau reconstruite pour approfondir la connaissance des mécanismes du vieillissement cutané et validation de l'efficacité “ anti-âge ” du sélénium. Biotechnologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1044 . tel-02076186

HAL Id: tel-02076186

<https://theses.hal.science/tel-02076186v1>

Submitted on 22 Mar 2019

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.



N°d'ordre NNT : **2018LYSE1044**

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale 205
Ecole doctorale interdisciplinaire sciences et santé

**Spécialité de doctorat : Ingénierie biologique et médicale,
Biotechnologie**

Soutenue publiquement le 21/03/2018, par :
Lara JOBEILI

Evolution de modèles tridimensionnels de peau reconstruite pour approfondir la connaissance des mécanismes du vieillissement cutané et validation de l'efficacité « anti-âge » du sélénium.

Devant le jury composé de :

Pr HOC Thierry, EC Lyon
Pr LECCIA Marie Thérèse, UGA
Pr MAGNALDO Thierry, CNRS/Université de Nice
Dr LEMAITRE Gilles, INSERM/UEVE
Dr MASSE Ingrid, CRCL/UCBL

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinatrice

Dr DAMOUR Odile, HCL/UCBL
Pr NATAF Serge, HCL/UCBL

Co-Directrice de thèse
Co-Directeur de thèse

Dr RACHIDI Walid, UGA/CEA

Membre Invité

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUICHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Aux membres au jury :

Au Professeur Marie-Thérèse Leccia, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci pour votre bienveillance et votre expertise qui m'ont permis d'améliorer mon manuscrit.

Au Professeur Thierry Magnaldo, merci pour votre disponibilité et l'enthousiasme quant à la lecture et à l'évaluation de mon travail de thèse. Vos conseils m'ont été d'une aide précieuse.

Au Docteur Ingrid Masse, Au professeur Thierry Hoc et Gilles Lemaitre, d'avoir sans hésiter accepté de faire partie de mon jury.

Au Docteur Odile Damour

Je n'ai pas de mot pour vous exprimer ma gratitude. Il y a 4 ans vous m'avez ouvert la porte de votre laboratoire. J'ai pu y découvrir toutes les activités de la banque de tissus et cellules avec grand plaisir. Vous m'avez fait confiance et donner l'opportunité d'effectuer une thèse de sciences. Je suis extrêmement fière d'avoir effectué cette thèse dans votre laboratoire, d'avoir pu bénéficier de votre savoir-faire, de votre expertise et de vos conseils. Je vous remercie pour tout ce que vous avez pu faire pour moi d'un point de vue professionnel et humain. La route fut longue et pleine de cailloux mais vous avez su me guider, me porter et me supporter. Votre disponibilité et votre bienveillance ont été sans faille. Merci de m'avoir fait grandir, personnellement et professionnellement. Soyez assurée de mon respect et de ma reconnaissance.

Au Professeur Serge Nataf

Je vous remercie pour votre disponibilité et pour le temps accordé à la gestion administrative de ma thèse et pour le regard critique apporté sur mon manuscrit.

Au Professeur Walid Rachidi

Je vous remercie infiniment car sans avoir aucune « obligation » administrative, vous avez toujours su vous rendre disponible pour moi, que ce soit pour les protocoles du projet, les résultats, les nouvelles idées, mon CST, le poster du CARD, et l'article. Et ce malgré votre emploi

du temps plus que chargé. Je suis vraiment ravie que nous ayons pu mener à bien ce projet et j'espère à l'avenir pouvoir de nouveau profiter de votre expertise, votre générosité et votre sympathie.

Parce que cette thèse est le fruit de collaborations, je tiens à remercier tous contributeurs

A Labcatal et à Eric Blouin

Je remercie Labcatal pour avoir financé en partie cette thèse.

Je remercie Eric Blouin, mon interlocuteur chez Labcatal, pour la confiance aveugle qui nous a été accordée pour ce projet. Cela a été un réel plaisir de travailler avec vous et je suis vraiment ravie du résultat.

Au Professeur émérite Anne Marie rousel

Je vous remercie pour votre expertise sur le sélénium, pour votre confiance au cours de ce projet et pour vos précieux conseils au moment de la rédaction de ma thèse.

Au Docteur Patricia Rousselle

Ça a été une nouvelle fois un immense bonheur de travailler avec vous, et grâce à votre expertise nous avons pu mettre le doigt sur quelque chose que je l'espère continuera à être étudié. Depuis 2013 mon stage de master 2, j'ai pu apprécier vos qualités scientifiques, d'encadrement et surtout votre humanité. Je vous remercie pour les discussions enrichissantes que nous avons eues et qui ont participé à ma construction scientifique et personnelle. Je n'ai pas les mots suffisants pour vous exprimer ma gratitude pour tout ce que vous avez pu m'apporter et j'espère vraiment que nous pourrions à nouveau travailler ensemble.

Au Professeur Jérôme Lamartine.

Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler à nouveau avec vous sur le projet de Charlotte mais aussi pour votre encadrement sur le projet KOSE. J'ai énormément apprécié votre disponibilité, vos conseils et votre expertise, ainsi que les nombreux échanges que nous avons eus pour faire avancer les projets.

Charlotte Muther, j'ai été ravie de pouvoir faire ta connaissance au cours de cette collaboration. Je te remercie pour m'avoir formé aux techniques de biologie moléculaire, pour tous les précieux conseils que tu m'as donnés tant pour l'analyse des résultats de qPCR que pour mon manuscrit de thèse et mon oral. Je te souhaite de t'épanouir dans ta future carrière, et on se recroisera peu être dans nos vies professionnelles futures !

Au docteur Romain Debret

Je vous remercie pour votre enthousiasme à participer au projet KOSE et je suis ravie d'avoir un expert du tissu élastique dans ce projet. Un grand merci pour votre aide à l'exploitation de mes résultats et votre disponibilité pour la rédaction de l'article.

KOSE et Takashi Teramura

Je remercie KOSE corporation pour avoir financé une partie de cette thèse.

Je remercie Takashi Teramura pour cette collaboration. C'est une chance incroyable que de pouvoir travailler sur ce projet. Merci de me faire confiance pour le mener à bien.

I would like to thank KOSE Corporation for funding this thesis, and Takashi Teramura for our collaboration on this project. It's an incredible opportunity to work on this project and I'm grateful for the trust I have.

[A l'équipe de la BTC](#)

A Céline Auxenfans, merci de m'avoir accueilli à la banque. Je suis arrivée durant la période de transition et j'ai énormément apprécié ta disponibilité. Je te remercie de m'avoir permis d'apprendre à travailler en salle blanche, malgré les conditions de travail pas toujours faciles je suis fière d'avoir cette corde à mon arc. Merci aussi pour ta confiance et pour avoir toujours été là quand j'avais des questions techniques ou administratives.

A Pascale Pascal, merci pour tout, votre soutien, votre écoute, vos anecdotes le midi au self, pour vos procédures à signer... Si je ne devais garder qu'un souvenir : le déménagement du laboratoire. Quelle aventure !!

Adeline Desanlis, quel bonheur d'avoir quelqu'un comme toi dans une équipe. Merci pour ton soutien, ta bonne humeur constante et tous les conseils que tu as pu me donner. J'ai énormément apprécié les échanges que l'on a pu avoir et je te souhaite une très belle réussite de ta thèse.

Ma petite Sophie, arrivée quelques semaines après moi à la banque, on en a vécu des choses ensemble ! J'ai juste envie de résumer notre amitié à ceci : Les inséparables.

Marie rose, merci de m'avoir pris sous ton aile à mon arrivée. Ta polyvalence au sein du labo est assez incroyable et je te remercie de m'avoir transmis ton savoir faire. A tout ces moments passés en production ensemble, à l'inspection de l'ANSM, aux heures en culture ou en histologie à papoter tout en travaillant. Maintenant c'est à ton tour d'achever ta thèse, et je suis persuadée que tu y arriveras sans encombre.

Olivia, ma petite perle. J'ai appris à te découvrir cette année 2017 durant ton stage de Master 2 et que dire si ce n'est que tu as été d'un soutien énorme pour cette fin de thèse. Sans toi, je n'aurais pas eu d'oreille attentive à qui me plaindre, à qui râler sur à peu près tout et n'importe quoi, mais avant tout pour éviter que le stress ne me ronge trop. Une fois partie, une chose est sûre c'est que ton rire extraordinaire associé à ta bonne humeur vont énormément me manquer. Je n'ai aucun doute quand à ta réussite pour ta thèse.

Un très grand MERCI à toute l'équipe de la banque de tissus et cellules (Eric, Françoise, Fabienne, Dominique, les internes (Nacira, Thomas, Lucille) & Lydia), ainsi que la R&D (Laurent, Marine...) pour m'avoir accueilli durant ces 4 ans.

A Virginie Pernot & Sabine Benosmane, les deux 5AHU avec qui j'ai eu la chance de travailler et qui m'ont sacrément fait avancer sur mes projets.

A Pierre- emmanuel Imbert, notre homme du bâtiment 5, un personnage incontournable et au grand cœur. Toujours une petite attention et un petit mot gentil. J'espère que l'on gardera longtemps cette amitié et je te souhaite de trouver la voie de ton épanouissement professionnel.

A Amélie Thépot & à Labskin Créations (Sandrine, Anais, Marion les plus anciennes, Isabelle la dernière arrivée et les nombreux stagiaires....), le bâtiment 5 serait bien triste sans vous toutes/tous.

Particulièrement, Sandrine je tiens à te remercier pour tout le temps que tu as pris à me conseiller pour ma thèse, d'un point de vue scientifique et humain. Tu m'as été d'une grande aide.

Anais, petit rayon de soleil, mes longues journées n'auraient pas été les mêmes sans nos pauses café/thé superposables. Tu as toujours eu un petit mot gentil pour moi et crois moi, en période de stress ça m'a beaucoup aidé.

Un grand merci à Sabah, responsable de l'entretien de nos locaux, sans qui tout notre travail ne serait évidemment impossible.

Un mot aussi pour Mesdames Daisey et Tardif, nos interlocutrices au service achats des Hospices Civiles de Lyon, qui sont d'une efficacité à toute épreuve pour nous passer nos commandes de matériel et réactifs !

A Aurélie Boher, qui m'as transmis le virus de l'analyse d'image en 2013 lors d'un stage. Grâce à toi j'ai eu la chance d'être initiée à l'imagerie et depuis, je n'ai pas arrêté. Durant ces années que tu as passé chez Labskin Création qui nous ont permis de nous retrouver, merci pour avoir toujours été présente pour répondre à mes questions j'ai énormément appris à tes côtés, merci d'avoir gérer avec moi l'intendance du laboratoire d'histologie.

A mes proches :

A ma famille : mes parents, qui par l'éducation que j'ai reçu m'ont donné la force de ne jamais baisser les bras, mes frangins et mes belles sœurs ;

A mes amis (Laure, Aline, Axel, Capucine, Chloé, Mymy, Léo, Charlotte, Chris,) qui font partie de ma vie et qui m'ont suivi, subit et soutenu durant cette thèse.

Mais particulièrement, Anne-sophie Boisgard car du début jusqu'à la fin, sans toi je n'y serais pas arrivée !! Et dieu sais à quel point tu as du mérite de m'avoir supporté avec mon sale caractère !!

RESUME

La peau et son vieillissement sont un enjeu de santé publique. Les modèles expérimentaux disponibles pour l'étude du vieillissement cutané restent perfectibles. Dans ce contexte, nos objectifs étaient simultanément d'utiliser les modèles de peaux reconstruites (PR) développés dans notre laboratoire afin i) de mieux comprendre les mécanismes du vieillissement cutané, ii) de démontrer l'efficacité et le mécanisme d'action du sélénium comme « anti âge » et enfin iii) de les faire évoluer en utilisant le support poreux ou auto-assemblé avec des fibroblastes du même donneur prélevés à des âges différents. Ainsi, le modèle de PR cultivé sur une longue période a montré une surexpression du microARN miR30-a par RT qPCR dans les PR « âgées » avec une altération de la fonction barrière mesurée par la perte insensible en eau et une perturbation de la différenciation terminale (baisse d'expression de la loricrine et de l'involucrine). Avec le même modèle de sénescence *in vitro*, nos résultats démontrent que la supplémentation en sélénium retarde la sénescence des kératinocytes souches. Cette efficacité passe non pas par un effet antioxydant comme attendu mais par l'activation de leur adhésion à la lame basale, qui participe à les conserver souche et donc à préserver le renouvellement épidermique. Enfin, nous avons eu la chance exceptionnelle de préparer des PR avec des fibroblastes provenant d'un donneur unique prélevé à 36 et 72 ans. Les résultats immunohistologiques montrent une augmentation de dépôt de l'élastine et de la fibrilline dans un derme plus fin avec l'âge ainsi qu'une diminution de l'activité des MMP de type élastase. Une hypothèse probable est une réponse compensatoire des fibroblastes liée à la diminution de l'épaisseur du derme. En conclusion l'utilisation de différents modèles de PR a permis d'explorer les mécanismes conduisant au vieillissement cutané et de démontrer l'efficacité du sélénium comme anti âge.

ABSTRACT

Skin and its aging is a public health issue. *In vitro* skin models available for the study aging remain perfectible. In this context, our objectives were simultaneously to use skin equivalent (SE) developed in our laboratory i) to better understand mechanisms of skin aging, ii) to demonstrate the effectiveness of selenium as “anti-aging” and finally iii) to improve SE using the porous or scaffold free model with fibroblasts from the same donor at different ages. Thus, the model of SE mimicking senescence showed an overexpression of microRNA miR30-a by RT qPCR in old SE with an alteration of the barrier function measured by the transepidermal water loss and a deficiency of epidermal terminal differentiation (decreased expression of loricrin and involucrin). With the same SE model of senescence, our results demonstrate that selenium supplementation delays the senescence of keratinocytes stem cells. This effectiveness does not involve antioxidant effect as expected but the activation of their adhesion to the basement membrane, which participates in preserving stemness and epidermal renewal. Finally, we had the opportunity to prepare SE with fibroblasts from a single donor at 36 and 72 years old. The histological results show that age induces an increase in the expression of elastin and fibrillin in a thinner dermis associated to a decrease of elastases MMP activity. One hypothesis is that fibroblasts are able to compensate the decrease of dermal thickness. In conclusion, the use of different models of SE helps us to explore some mechanisms leading to skin aging and to demonstrate the efficacy of selenium as “anti-aging”.

REMERCIEMENTS	3
RESUME	10
ABSTRACT	11
TABLE DES FIGURES	16
TABLE DES TABLEUX	20
LISTE DES ABBREVIATIONS	21
PREAMBULE	22
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	26
CHAPITRE N°1 - LA PEAU HUMAINE ET SON VIEILLISSEMENT	27
1. Structure épidermique et différenciation kératinocytaire	31
a) Couche basale	32
b) Couches suprabasales	33
Stratum spinosum ou couche épineuse.....	33
Stratum granulosum ou couche granuleuse.....	33
Zone de transition	34
Stratum corneum	34
2. Les cellules souches de l'épiderme inter-folliculaire	36
B. La jonction dermo-épidermique.....	46
1. Organisation de la JDE	46
a) Les hémidesmosomes	47
b) La lame basale épidermique	49
(1) La lamina lucida (40-50 nm) :	50
(2) La lamina densa (50 à 70 nm) :	51
c) Zone fibrillaire sous basale	52
2. Fonctions de la jonction dermo-épidermique	52
C. Le derme	53
1. Composition cellulaire	53
2. Composition de la matrice extra cellulaire	54
a) Les collagènes	55
b) Le tissu élastique & l'élastogénèse	58
II. Le vieillissement cutané	71
A. Les Mécanismes du vieillissement	71

1.	Le vieillissement intrinsèque	71
2.	Vieillessement extrinsèque, actinique ou photovieillessement	79
B.	Les manifestations du vieillissement de la peau.....	81
1.	Atteinte des kératinocytes et de l'épiderme	82
2.	Altération de la jonction dermo épidermique	83
3.	Atteintes des fibroblastes et du derme.....	84
a)	Fibroblastes	84
b)	Les Collagènes	85
c)	Fibres élastiques.....	85
(1)	Elastine & vieillissement chronologique.....	86
(2)	Fibres élastiques et photovieillessement.....	91

CHAPITRE N°2 - LES DIFFERENTS MODELES D'ETUDES DU VIEILLESSEMENT

CUTANE	94
I. Modèles de peaux reconstruites en 3D.....	95
A. Modèle de Bell dans un gel de collagène	96
B. Modèle sur treillis de Naughton	96
C. Modèle sur support poreux.....	97
A. Modèle sans support.....	102
II. les micro arNs	104

CHAPITRE N°3 - SELENIUM, ELEMENT TRACE ESSENTIEL ET PREVENTION DU

VIEILLESSEMENT	107
I. Propriétés & métabolisme	108
II. les Sélénoenzymes	111
III. Sources de sélénium et couverture des besoins	117
IV. Sélénium et santé : un lien ambivalent	118
A. rôle physiologique	119
1. Rôle antioxydant.....	119
2. Rôle anti-inflammatoire et immuno-modulateur.....	119
B. Déficits en Se et conséquences cliniques.....	120
1. Sélénium et Cancers	121
2. Sélénium et maladies cardiovasculaires	122
3. Sélénium et autres pathologies	122
C. Surcharge en sélénium et conséquences cliniques	123
V. Sélénium et longévité - études d'observation.....	124

VI. Etat des lieux « peau et sélénium»	125
I. Culture cellulaire.....	135
A. Milieux de culture.....	135
B. Extraction des cellules.....	136
C. Culture en monocouches.....	137
D. Test de clonogénicité	137
E. MODELES DE CULTURE EN 3D.....	138
1. Modèle sur éponge poreuse	138
2. Modèle sans substrat dermique ou Auto-assemblé	139
II. Analyses histologiques et immuno-histologiques.....	140
III. Analyse quantitative d'image	143
A. Composition d'une image numérique – préambule à l'analyse quantitative	143
B. Paramètres analysés et processus suivis.....	146
IV. Analyses statistiques.....	150
RESULTATS	151
CHAPITRE N°1 - ROLE DU MICRO ARN MIR-30A COMME REGULATEUR DANS LE VIEILLISSEMENT DE L'EPIDERME HUMAIN.....	152
CHAPITRE N°2 - ETUDE DE L'EFFICACITE « ANTI-AGE » DU SELENIUM	176
I. Détermination de la concentration non toxique et efficace.....	178
A. Etape n°1: cytotoxicité à court terme : test au MTT	178
B. Etape n°2: cytotoxicité à long terme : clonogénicité.....	179
II. Influence de la supplémentation à 30 nM de peaux reconstruites sénescents..	180
III. Influence de la supplémentation à 30nM de sélénium sur la senescence répliquative de kératinocytes primaires	181
IV. présentation des résultats.....	183
CHAPITRE N°3 - RESULTATS COMPLEMENTAIRES EN COURS DE FINALISATION	197
DISCUSSION.....	221
CONCLUSION.....	233
ANNEXES	237
I. Matériel et méthodes supplémentaires.....	238

A.	Techniques de biologie moléculaire.....	238
1.	Extraction des ARNs	238
2.	RT q PCR	238
a)	ARN messagers	239
b)	Micro ARN	240
B.	Fiches techniques analyse d'image	242
1.	Fiche technique n°1 : Mesure d'épaisseur du derme ou de l'épiderme	242
2.	Fiche technique n°2 : Comptage de cellules marquées positivement.....	243
3.	Fiche technique n°3 : quantification de la coloration à la DAB après marquage épidermique.....	244
4.	Fiche technique n°4 : Quantification de la fluorescence après marquage d'une protéine rapporté au nombre de noyau colorés par le Hoesch	246
5.	Fiche technique n°5 : quantification de la fluorescence exprimée après marquage d'une protéine de la jonction dermo-épidermique	248
V.	ENCADREMENT TECHNIQUE D'ETUDIANTS	250
A.	Thèse de pharmacie de Virginie Pernot.....	250
B.	Thèse de pharmacie de Sabrina Benosmane	254
VI.	Communications autres	257
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	258

TABLE DES FIGURES

Figure 1: structure simplifiée de la peau humaine normale (Aldag et al., 2016). La peau est l'organe le plus lourd et le plus étendu de l'organisme. Son poids moyen chez un adulte est de 3 à 3,5 kg, soit environ le seizième du poids corporel total. Sa surface d'environ 1,5 à 2 m ² chez un adulte jeune, augmente environ 7 fois entre la naissance et l'âge adulte. Son épaisseur est variable selon sa localisation: de 1 mm au niveau des paupières à 3 mm et plus au niveau des paumes des mains et de la voûte plantaire.	28
Figure 2 : l'épiderme et ses populations cellulaires (Abdallah et al., 2017)	30
Figure 3 : Modifications structurales et biochimiques des kératinocytes au cours de la différenciation. Au cours de la différenciation épidermique, les kératinocytes sont également le siège de nombreuses modifications biochimiques qui concernent principalement la synthèse des kératines, la formation de l'enveloppe cornée et le métabolisme lipidique. L'architecture cellulaire de chacune des quatre couches est spécifique grâce à des éléments du cytosquelette tel que les jonctions cellulaires ainsi qu'une distribution graduelle des kératines ou des protéines de différenciation. Adapté de (Simpson et al., 2011)	32
Figure 4 : aspect macroscopique et classification des colonies de kératinocytes après coloration à la rhodamine (Adapté d'après (Barrandon and Green, 1987))	38
Figure 5 : Localisation des cellules souches épidermiques (KSC pour « kératinocytes stem cells ») – les différentes niches : le bulge du follicule pileux, l'épiderme inter folliculaire, enfin la glande sébacée (SB). Modifiée de (Box et al., 2010).	42
Figure 6 : Illustration du concept de division asymétrique : une cellule souche génère une cellule TA qui s'engage dans le processus de différenciation terminale et une cellule qui conserve le phénotype souche (d'après (Alonso and Fuchs, 2003))	45
Figure 7 : Représentation de la structure de la JDE, traduit de (Hertl, 2006)	46
Figure 8: organisation moléculaire d'un hémidesmosome (Simpson et al., 2011)	47
Figure 9 : structure générale de l'intégrine (source: biologie moléculaire de la cellule)	49
Figure 10 : structure générale d'une laminine	51
Figure 11 : Principaux composants de la matrice extra cellulaire du derme	55
Figure 12 : observation d'une peau native par microscopie électronique à balayage montrant la répartition des principaux types de collagènes du derme et de la jonction dermo épidermique. Le collagène de type I est le plus abondant dans le derme, alors que les collagènes XII, XVI, XIV sont minoritaires. (D'après (Ruggiero et al., 2005))	57
Figure 13 : Organisation schématique des fibres élastiques en réseau : 1) fibres oxytalanes, 2) fibres d'élaunine, 3) fibres élastiques matures (Prost-Squarcioni et al., 2008)	59

Figure 14 : schéma simplifié des étapes de formation des fibres élastiques (adapté de (Mithieux and Weiss, 2005; Wise and Weiss, 2009))	60
Figure 15 : représentation schématique de la structure des membres de la famille des lysyl oxidase.	63
Figure 16 : modèle d'organisation des microfibrilles, structure et interactions PANEL DU HAUT : Microfibrilles vues en microscopie électronique, il est possible de voir une périodicité de 50-60nm. PANEL DU BAS : L'organisation moléculaire précise reste à déterminer, cependant elles possèdent des sites de fixation pour certaines protéines de la MEC comme les fibulines ou les MAGP. C'est aussi un lieu de stockage du TGF β via la formation de ponts disulfure entre la protéine LAP et la protéine LTBP (Jensen et al., 2012).	65
Figure 17 : Représentation d'une fibre élastique mature composée d'un cœur d'élastine insoluble réticulé entoure des microfibrilles (Leslie P.Gartner, James L.Hiatt, Chapter 4 Color Text Book Of Histology 3rd Ed 2007)	66
Figure 18 : voie de signalisation du TGF β conduisant à l'induction de la transcription du gène codant pour la tropoélastine (Kucich et al., 2002)	69
Figure 19 : représentation des causes du vieillissement cellulaire (traduit de (López-Otín et al., 2013))	72
Figure 20 : réactions chimiques produisant les radicaux libres : 1. Formation de l'anion super oxyde ; 2. Formation du peroxyde d'hydrogène ; 3. Réaction de fenton qui donner de radical hydroxyle	74
Figure 21 : Les différentes origines du stress oxydatif et des radicaux libres	75
Figure 22 : mécanismes moléculaires conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007)	77
Figure 23 : degré de pénétration des UV dans les différentes couches de la peau (D'Orazio et al., 2013)	79
Figure 24 : différences histologiques observées au cours du vieillissement cutané (Illustration : thèse de doctorat de Morgan Dos Santos – LSC)	82
Figure 25 : Visualisation de l'élastine dermique par microscopie électronique à balayage et à transmission chez un individu jeune photoprotégé (<10 ans – A/B/C) ; adulte photoprotégé (45 ans – D/E/F) et âge photoexposé (>80 ans – G/H/I). (Mora Huertas et al., 2016; Suwabe et al., 1999)	87
Figure 26 : épissage alternatif de la tropoélastine en présence ou absence de radiation UV – traduit de (Weihermann et al., 2017)	92
Figure 27 : protocole simplifié de la production des peaux reconstruites selon le modèle sur éponge de GAG-Collagène I-chitosan (panel de haut). Images représentatives de l'histologie de l'épiderme, du derme et de la jonction dermo épidermique (panel du bas)	99
Figure 28 : Caractérisation histologique des peaux reconstruites sénescentes entre j42 et j120, suivie par la morphologie de la peau, la prolifération des cellules de l'épiderme, l'expression de protéine d'adhésion, de différenciation et de sénescence (Dos Santos et al., 2015).	101
Figure 29 : protocole simplifié de la production des peaux reconstruites selon le modèle auto-assemblé sans support (panel de haut). Images représentatives de l'histologie des peaux reconstruites	

<i>sans support au cours du temps (panel du bas). Il est possible d'observer une grande stabilité de l'épiderme et du derme au cours du temps.</i>	103
Figure 30: <i>biogénèse des micro ARN (Daugaard and Hansen, 2017). Les microARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II en longs pri-miRNA, clivé par Drosha RNase III pour donner le pré-miRNA. Ce dernier sera exporté vers le cytoplasme, où ils sont ensuite traités par une autre enzyme RNase III, Dicer, qui débarrasse le double brin d'ARN de la boucle et fend la terminaison. Le microARN simple brin sera incorporé au miRISC pour induire sur l'ARNm cible une induction ou une répression de la traduction.</i>	105
Figure 31: <i>différentes formes chimiques du sélénium, ici les levures séléniées ne sont pas représentées.</i>	109
Figure 32 : <i>schéma simplifié du mécanisme de l'absorption du sélénium (adapte de (Myriam et al., 2006))</i>	111
Figure 33: <i>diagramme des chaînes de réactions de détoxification via les enzymes de la famille des glutathion peroxydases. Les GPx obtiennent des électrons du NADPH, via la glutathion réductase (GR) et le glutathion (GSH forme réduite, GSSG forme oxydé), pour catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques, protégeant ainsi les cellules contre les dommages oxydatifs.</i>	112
Figure 34 : <i>transfert d'électrons du NADPH par des thiorédoxine réductases (TrxR) sur différents substrats. Les substrats peuvent être des macromolécules dans lesquelles les liaisons disulfures jouent des rôles critiques dans la régulation de leurs fonctions, mais également des composés de bas poids moléculaire.</i>	113
Figure 35: <i>modélisation de la réponse organique à la concentration en sélénium (traduit de Combs and Gray, 1998)</i>	118
Figure 36: <i>représentation simplifiée des implications physiopathologiques du sélénium</i>	121
Figure 37: <i>représentation simplifiée de la cinétique de préparation des peaux reconstruites</i>	138
Figure 38 : <i>illustration des niveaux de gris en fonction des codages de 1bit à 8bits</i>	143
Figure 39: <i>illustration d'une image en niveau de gris en 32, 16 et 8bits</i>	144
Figure 40: <i>exemple d'une image en format RVB et des valeurs d'un point selon les 3 composantes colorimétriques</i>	144
Figure 41: <i>exemple de LUT appliquées à une image 8bit (Fire – Green Fire Blue – Ice) et les histogrammes associés</i>	145
Figure 42: <i>Capture d'écran des différents menus d'image J. Les encadrés en rose montrent les fonctions utilisées pour les diverses quantifications réalisées au cours de ce travail.</i>	147
Figure 44: <i>schéma récapitulatif des étapes nécessaires à l'analyse de l'impact du sélénium sur les cellules souches cutanées</i>	178
Figure 45: <i>cinétique de culture des peaux reconstruites supplémentées à 30nM de sélénium et suivi des temps de récolte des échantillons</i>	180

Figure 46: schéma expérimental des étapes pour l'analyse de la senescence répllicative des kératinocytes primaires supplémentés ou non à 30 nM de sélénium	182
Figure 47: expression des sélénoenzymes dans les peaux reconstruites supplémentées ou non avec 30nM de sélénium	231
Figure 48: Evolution de modèles tridimensionnels de peau reconstruite pour approfondir la connaissance des mécanismes du vieillissement cutané et validation de l'efficacité « anti-âge » du sélénium.	234
Figure 49: illustration du processus de quantification d'épaisseur de tissu	242
Figure 50: illustration du procédé de comptage des noyaux de cellules exprimant Ki67	243
Figure 51: illustration des étapes pour l'analyse d'un marquage en révélation DAB dans le visible	245
Figure 52 : illustration des étapes pour l'analyse d'un marquage en révélation fluorescent	247
Figure 53: Illustration des étapes du procédé d'analyse d'un marquage de la jonction dermo-épidermique	249

TABLE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : caractérisation de la différenciation épidermique et des marqueurs spécifiques des couches de l'épiderme. D'après Augustin et al. 1997.....</i>	<i>35</i>
<i>Tableau 2 : Principales caractéristiques et marqueurs identifiés des cellules souches cutanées : KSC, TA et cellule différenciée post mitotique.....</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 3 : résumé des principales caractéristiques des lysyl oxidases.....</i>	<i>64</i>
<i>Tableau 4: Liste non exhaustive des pathologies liée à une mutation sur une protéine des fibres élastiques (Kielty, 2006; Milewicz et al., 2000; Uitto, 1979).....</i>	<i>70</i>
<i>Tableau 5: liste non exhaustive des techniques utilisées pour analyser l'élastine dans la peau et son évolution au cours du vieillissement chronologique et photo-induit.....</i>	<i>89</i>
<i>Tableau 6 : synthèse des principales sélénoenzymes humaines et leurs fonctions (Labunskyy et al., 2014).....</i>	<i>114</i>
<i>Tableau 7: Concentration en sélénium de catégorie alimentaire selon l'INRA (Leblanc et al., 2004)...</i>	<i>117</i>
<i>Tableau 8 : données sur la teneur en sélénium cutané en µg/g de poids sec de peau (Mirastschijski et al., 2013; MOLOKHIA et al., 1979).....</i>	<i>125</i>
<i>Tableau 9 : Bilan des gammes de concentrations et formes chimiques de sélénium ainsi que les modèles cellulaires utilisés.....</i>	<i>128</i>
<i>Tableau 10 : synthèse des anticorps utilisés et principales caractéristiques (fabricant, clone et réactivité, type de fixation et dilution utilisée).....</i>	<i>142</i>
<i>Tableau 11 : récapitulatif des anticorps et des paramètres analysés pour la quantification des expressions protéiques (Surface exprimée en pixel ou µm²).....</i>	<i>149</i>

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : acide desoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

bFGF : Fibroblast growth factor

CFE : Colony forming efficiency

CFU : colony forming unit

**CPD : doublement de population
cumulé**

DE : derme équivalent

DMSO : diméthyle sulfoxyde

DO : densité optique

EBP : élastine binding protein

EGF : epidermal growth factor

EPU : epidermal proliferation unit

ERO : espèce réactive oxygénée

GPX : glutathione peroxidase

HPS : hématoxyline phloxine safran

JDE : Jonction dermo épidermique

KSC : keratinocyte stem cell

LOX : lysyl oxidase

LOXL : lysyle oxidase like

LRC : Label retaining cell

LUT : Look Up table

LTBP : Latent TGFb binding protein

MEC : matrice extra cellulaire

MMP : Metalloproteinase matricielle

MFAP : microfibrille associated protein

**MAGP : microfibrille associated
glycoprotein**

miRNA : micro ARN

MCF : milieu de culture de fibroblaste

**MCK : milieu de culture de
kératinocyte**

**MCDE : milieu de culture de derme
équivalent**

**MCPR : milieu de culture de peau
reconstruite**

**MAL : milieu de culture à l'interface
air/liquide**

OCT: optimal cutting temperatur

PR: Peau reconstruite

SC : stratum corneum

TA : cellule d'amplification transitoire

TE : tissu élastique

UR : unité relative

UV : radiation ultra violet

PREAMBULE

En raison de l'augmentation de l'espérance de vie, la prévention du vieillissement et de ses pathologies est devenue une préoccupation majeure de santé publique. Le processus de vieillissement de l'organisme est lent, continu et irréversible. Il induit des modifications structurelles de tous les organes et tissus, affectant leur fonctionnement et augmentant leur vulnérabilité.

La peau, enveloppe corporelle, en présente les premiers signes visibles tels que la formation de rides, des changements d'épaisseur (mettant en relief le système veineux), de couleur, de texture, et de transparence (Naylor *et al.*, 2011). L'intensité et la chronologie de l'apparition de ces altérations cutanées sont variables selon les sites anatomiques considérés et sont déterminés par des facteurs génétiques et environnementaux (Augustin *et al.*, 1998 ; El-Domyati *et al.*, 2002).

Au-delà des aspects esthétiques et psychologiques d'estime de soi, la prévention du vieillissement cutané fait partie des objectifs de Santé publique car la peau, reflet global du fonctionnement cellulaire, est avec l'âge, la cible de nombreuses pathologies avec au premier rang, les cancers.

Le vieillissement cutané dépend de facteurs intrinsèques propres à chaque individu et de facteurs environnementaux tels que l'exposition aux rayonnements ultraviolets, la pollution, le stress psychologique, le tabagisme et la malnutrition associée au déficit en micronutriments antioxydants. Les mécanismes qui favorisent le vieillissement cutané ne sont pas totalement élucidés et les modèles expérimentaux pour les explorer restent perfectibles.

Deux approches expérimentales ont été développées au sein du laboratoire des substituts cutanés : la première utilise des cellules jeunes pour préparer les peaux reconstruites (PR) avec un temps de culture long ; la deuxième utilise des cellules d'âges différents (jeunes ou âgées) pour préparer les PR. Aussi deux modèles organotypique sont utilisables: i) un modèle dermo-épidermique basé sur la culture des kératinocytes à la surface d'un derme équivalent obtenu par la colonisation des fibroblastes dans une éponge poreuse de collagène/glycosaminoglycan/chitosan (Black *et al.*, 2005) et ii) un modèle sans support, unicouche inspiré du modèle auto-assemblé (L'Heureux *et al.*, 1999). Ces PR modulables et

versatiles peuvent être préparés avec des cellules cutanées (fibroblastes et kératinocytes) d'un donneur jeune pour étudier la sénescence *in vitro* en prolongeant le temps de culture. La sénescence cellulaire et tissulaire ainsi induite mime fidèlement certains aspects du vieillissement cutané tel qu'observé *in vivo* (Dos Santos *et al.*, 2015). En effet, la relevance de ce modèle a été mise en évidence par l'analyse des modifications d'organisation tissulaire et des marqueurs moléculaires de la sénescence par comparaison aux modifications observées sur des coupes de peau issues de donneurs d'âge différents.

Dans une étude collaborative avec le Professeur Jérôme Lamartine à l'IBCP, nous avons utilisé le modèle de peau reconstruite sénescence déjà validé pour suivre l'évolution des microARN (miR), ARN non codant mais connus pour être impliqués dans la régulation de très nombreux processus cellulaires impliqués ou non dans l'homéostasie épidermique (Horsburgh *et al.*, 2017).

Simultanément, avec le même modèle, nous avons testé l'effet du sélénium comme potentiel oligo-élément « anti-âge », avec pour hypothèse initiale son rôle indispensable à l'activité des sélénoenzymes antioxydantes. Quel que soit le type de vieillissement considéré, intrinsèque ou extrinsèque, l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène couplée à une baisse des défenses antioxydantes sont impliquées, en particulier via le fonctionnement mitochondrial qui s'altère avec l'âge ou l'exposition aux UV et polluants. Un excès de radicaux libres dans la cellule entraîne une altération de son équilibre redox avec une baisse de l'efficacité des systèmes de détoxification et conduisant à un état dit de stress oxydatif et à un vieillissement accéléré (Afanas'ev, 2010). La cellule se protège des dégradations oxydatives par différents systèmes antioxydants au premier rang desquels figurent les systèmes de défenses enzymatiques de détoxification dont les sélénoenzymes. Les apports en sélénium et son métabolisme auront ainsi un rôle majeur dans la détoxification des espèces radicalaires et dans la prévention des dommages oxydatifs responsables du vieillissement cellulaire et donc, hypothétiquement, du vieillissement cutané.

Une autre approche consiste à comparer des PR préparées avec des fibroblastes et kératinocytes, issues de donneurs d'âges différents. Cependant, les variations interindividuelles du patrimoine génétique peuvent masquer les réponses obtenues (Lacroix *et al.*, 2007). C'est

pourquoi la mise à disposition par le Pr Kaji de fibroblastes issus du même donneur à différents âges (Kaji *et al.*, 2009), apporte un atout réel pour le développement d'un nouveau modèle d'étude du vieillissement *in vitro*. Le principal avantage de ce modèle est d'étudier la reconstruction et la fonctionnalité du derme en fonction de l'âge du donneur. Nous avons porté l'accent sur l'évolution du tissu élastique, composant de la matrice extra cellulaire du derme synthétisée par les fibroblastes. Une partie de la synthèse bibliographique sera donc consacrée à l'élastogénèse et aux altérations du tissu élastique caractérisant le vieillissement cutané.

Afin de faciliter la lecture de cette thèse, la partie bibliographique sera divisée en trois chapitres aux thèmes spécifiques:

- ❖ La peau sa structure et son vieillissement avec pour focus les cellules souches épidermiques; le tissu collagénique et l'élastogénèse ; la sénescence répllicative et le stress oxydant
- ❖ Les différents modèles *in vitro* d'étude du vieillissement et les microARN
- ❖ Le Sélénium : sa structure et ses fonctions

La partie expérimentale et les résultats, sous forme d'articles, sont introduits par un chapitre commun matériel et méthode, chaque article étant précédé par la description du ou des protocoles expérimentaux spécifiques qui y sont développés.

Enfin, la discussion générale puis la conclusion synthétisent les résultats et les confrontent aux données de la littérature pour dégager l'apport de notre travail dans le contexte des connaissances actuelles.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE N°1

LA PEAU HUMAINE ET SON VIEILLISSEMENT

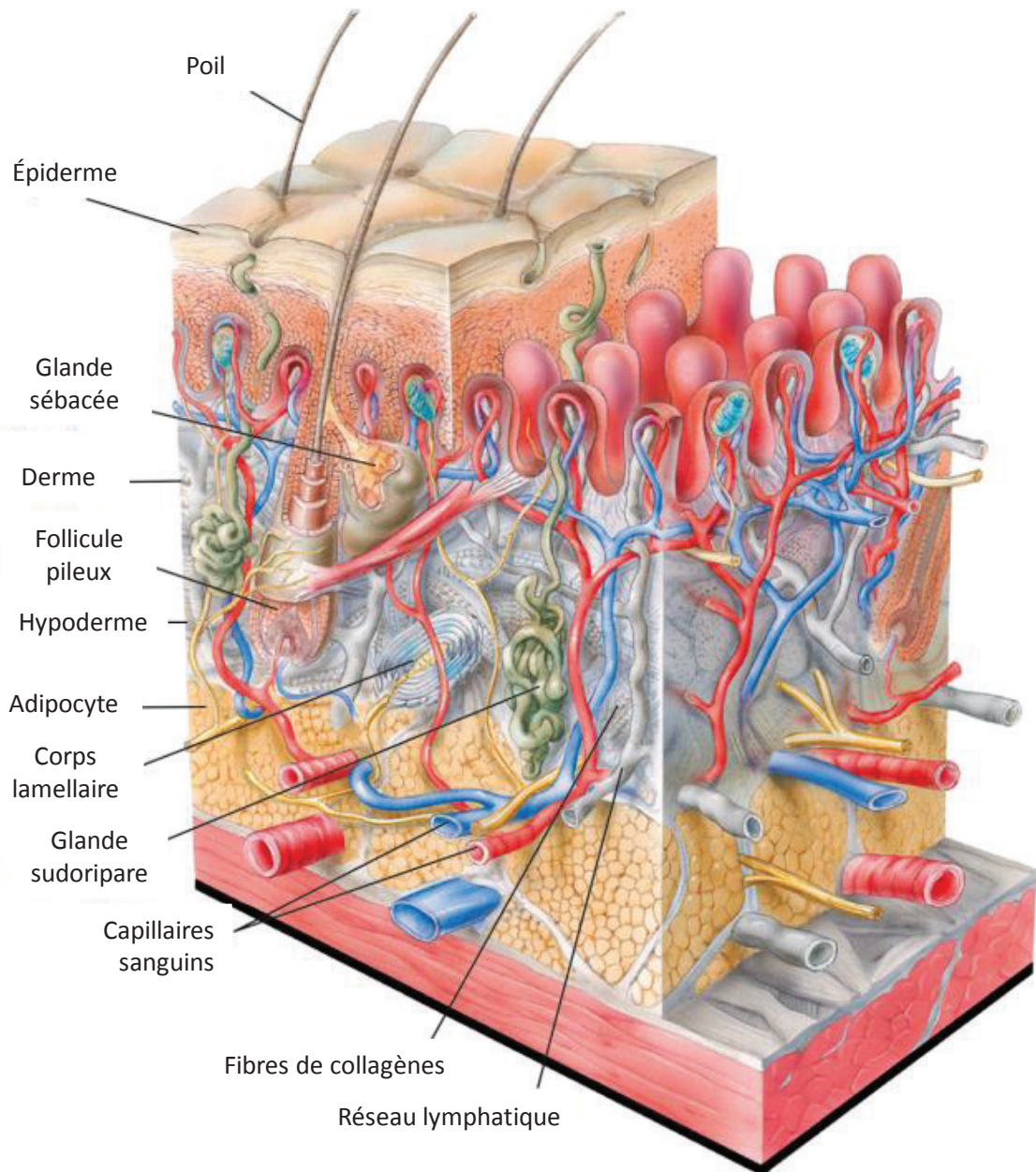


Figure 1: structure simplifiée de la peau humaine normale (Aldag *et al.*, 2016). La peau est l'organe le plus lourd et le plus étendu de l'organisme. Son poids moyen chez un adulte est de 3 à 3,5 kg, soit environ le seizième du poids corporel total. Sa surface d'environ 1,5 à 2 m² chez un adulte jeune, augmente environ 7 fois entre la naissance et l'âge adulte. Son épaisseur est variable selon sa localisation: de 1 mm au niveau des paupières à 3 mm et plus au niveau des paumes des mains et de la voûte plantaire.

La peau humaine, notre enveloppe corporelle est aussi un organe multifonctionnel. Elle joue un rôle primordial dans la thermorégulation, elle assure la fonction vitale de barrière en évitant la déperdition en fluides et la pénétration d'agents exogènes, elle exerce la première ligne de défense immunitaire contre les agressions microbiennes et enfin constitue un lieu de synthèse métabolique important notamment de vitamine D et de mélanines.

Deux tissus embryonnaires, le mésoderme et l'ectoderme interviennent dans la morphogenèse des trois couches de la peau respectivement l'hypoderme, le derme et l'épiderme.

L'épiderme et le derme sont reliés entre eux par la jonction dermo-épidermique (JDE) qui permet un ancrage moléculaire. Sont associées à ces différentes couches des annexes cutanées représentées par les cheveux, poils, ongles, glandes sudoripares et glandes sébacées (*FIGURE 1*)

I. ORGANISATION ET STRUCTURE DE LA PEAU

A. L'ÉPIDERME

1. COMPOSITION CELLULAIRE

D'origine ectodermique, l'épiderme est un épithélium pavimenteux, kératinisé, avasculaire et pluristratifié constitué majoritairement de plusieurs assises de kératinocytes (*FIGURE 2*). Son épaisseur moyenne varie de 60 à 100 µm pouvant atteindre, selon sa localisation, jusqu'à 600 à 700 µm (au niveau palmo-plantaire).

Les **kératinocytes**, détaillés ci-dessous représentent 80 à 90 % de la population épidermique totale et sont répartis en 4 assises selon leur stade de différenciation (*FIGURE 2*). Parmi les 10% de cellules non kératinocytaires entrant dans la composition de l'épiderme, on trouve les **mélanocytes** (2-4%) cellules responsables de la mélanogénèse, les **cellules de Langerhans** (2-4%), cellules immunitaires de l'épiderme ainsi que les **cellules de Merkel** (1%), cellules sensorielles. Toutes ces cellules ne seront pas développées ici.

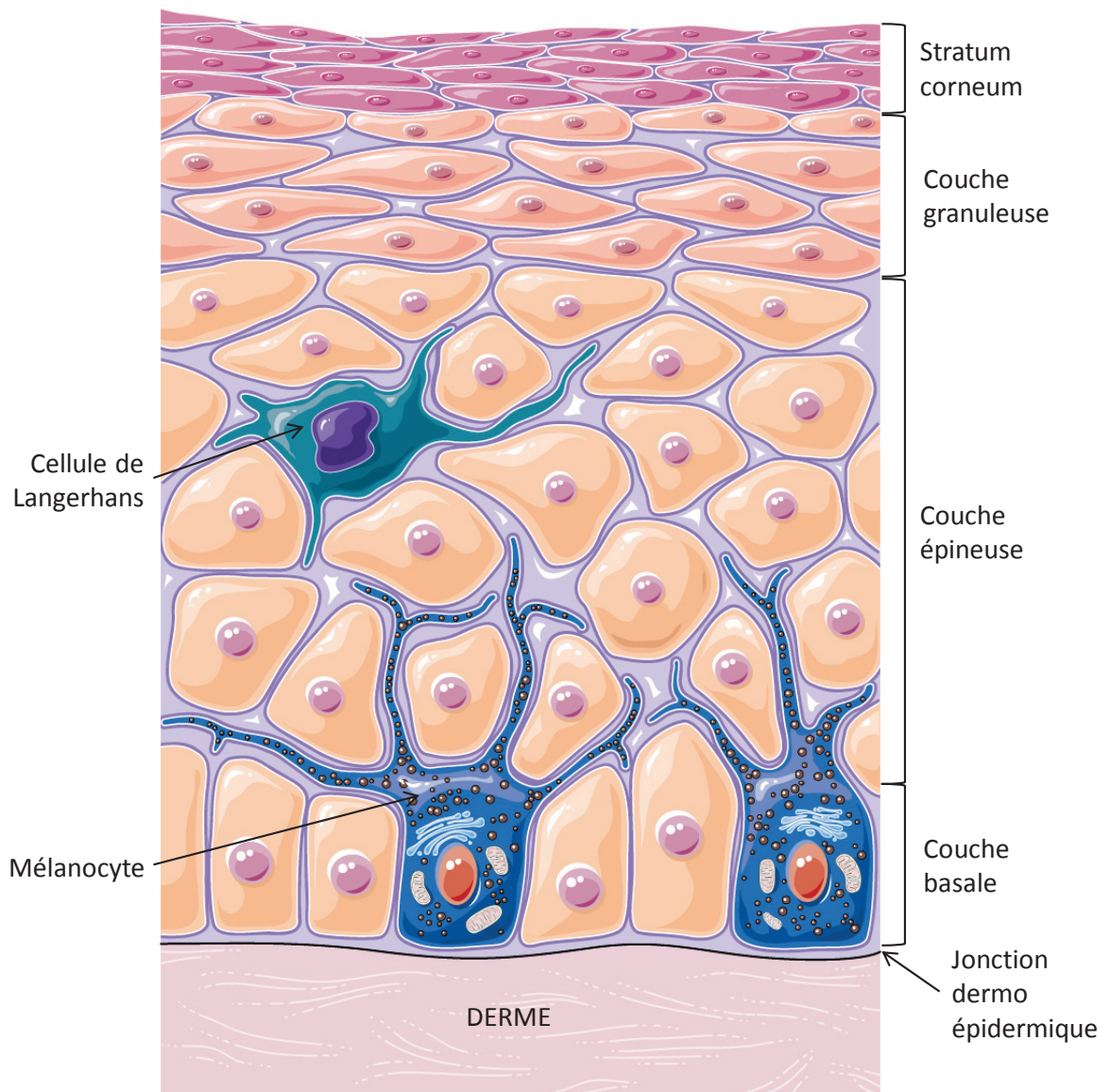


Figure 2 : l'épiderme et ses populations cellulaires (Abdallah *et al.*, 2017)

1. STRUCTURE EPIDERMIQUE ET DIFFERENCIATION KERATINOCYTAIRE

L'épiderme est composé de 4 couches de kératinocytes à différents stades de différenciation caractérisés par des modifications morphologiques et structurales (*FIGURE 3*). De la couche la plus profonde vers la surface, on retrouve le *stratum germinativum* ou couche basale, le *stratum spinosum* ou couche épineuse, le *stratum granulosum* ou couche granuleuse et le *stratum corneum* ou couche cornée. On estime que le temps nécessaire à la migration/différenciation des kératinocytes de la couche basale vers la couche cornée est d'environ 30 jours.

Au cours de la différenciation épidermique, les kératinocytes sont le siège de modifications biochimiques concernant notamment les kératines (filaments intermédiaires du cytosquelette), les lipides et la membrane plasmique (*TABLEAU 1*).

On distingue 2 groupes de kératines :

- Kératines de type I : kératines acides, K9 à K10
- Kératines de type II : kératines basiques et neutres de K1 à K8.

Dans les kératinocytes, une kératine de type I s'associe à une kératine de type II pour former un hétérodimère spécifique du stade de différenciation (Bragulla and Homberger, 2009; Gu and Coulombe, 2007; Uitto *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2016).

D'autre part, la composition des lipides se modifie, avec une réduction importante des phospholipides associée à une augmentation en lipides neutres, en stérols et en sphingolipides.

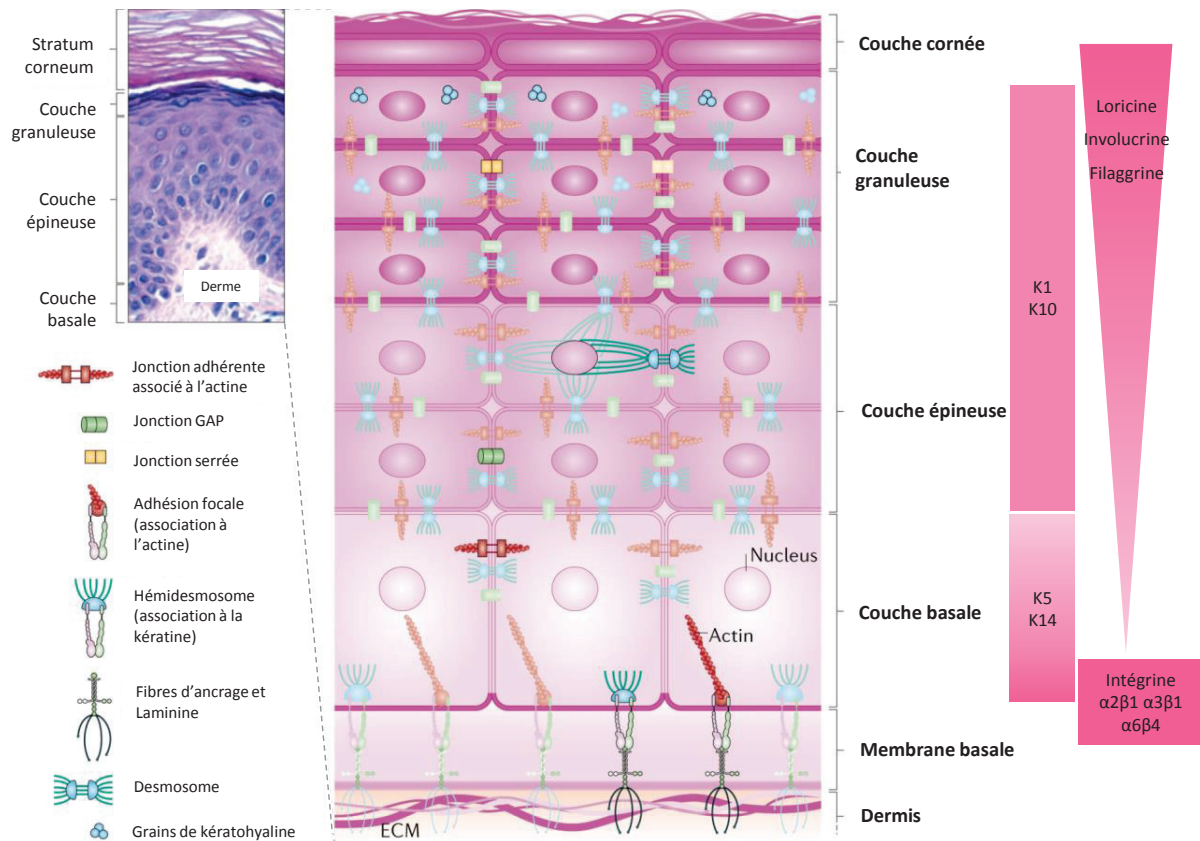


Figure 3 : Modifications structurales et biochimiques des kératinocytes au cours de la différenciation. Au cours de la différenciation épidermique, les kératinocytes sont également le siège de nombreuses modifications biochimiques qui concernent principalement la synthèse des kératines, la formation de l'enveloppe cornée et le métabolisme lipidique. L'architecture cellulaire de chacune des quatre couches est spécifique grâce à des éléments du cytosquelette tel que les jonctions cellulaires ainsi qu'une distribution graduelle des kératines ou des protéines de différenciation. Adapté de (Simpson *et al.*, 2011)

a) Couche basale

La couche basale, couche la plus profonde de l'épiderme, est formée d'une rangée unique de kératinocytes cubiques (6 μm de largeur) indifférenciés, ancrés solidement d'une part à la JDE par les hémidesmosomes et d'autre part aux kératinocytes voisins par les desmosomes eux même reliés aux kératines par les cadhérines et caténines. C'est le seul compartiment

prolifératif de l'épiderme, qui permet le renouvellement cellulaire constant nécessaire pour compenser la desquamation. On y trouve les cellules souches kératinocytaires (KSC pour kératinocytes stem cells), responsables du renouvellement de l'épiderme au cours de la vie. Les caractéristiques des KSC seront détaillées plus loin.

A chaque division cellulaire, les kératinocytes se détachent de la JDE, migrent verticalement et entrent en différenciation. Dès cette migration, la taille et la forme du kératinocyte évolue ; de cuboïde, il devient polygonal et enfin complètement aplati comme les tuiles d'un toit dans la couche cornée. Simultanément, la taille du noyau diminue jusqu'à disparaître.

Les kératinocytes de la couche basale expriment spécifiquement les kératines K5 et K14, et, dans une moindre mesure K15 et K19. (Moll *et al.* 1982)

b) Couches suprabasales

Ce compartiment comprend 3 couches nommées respectivement le *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum corneum*. Les kératines K5/K14 présentes dans les premières couches encore prolifératives sont remplacées progressivement par les kératines K1/K10 (Fuchs, 1995).

Stratum spinosum ou couche épineuse

La couche épineuse est constituée de 5 à 6 assises de kératinocytes polygonaux entrés irréversiblement en phase de différenciation. Cette partie de l'épiderme est responsable de la très forte cohésion de l'épiderme et de sa résistance mécanique, par la présence de nombreux desmosomes reliés entre eux aux filaments de kératines organisées sous forme de tonofilaments.

Stratum granulosum ou couche granuleuse

La couche granuleuse est composée de 2 à 5 assises de cellules aplaties, fusiformes (25 µm de largeur), disposées parallèlement à la surface cutanée. Cette couche délimite l'épiderme vivant et métaboliquement actif de la couche cornée, constituée de cellules mortes. La couche

granuleuse contient des structures intracellulaires spécifiques qui participent activement à la formation du ciment intercellulaire de la couche cornée.

- Les granules de kératoyaline : d'un diamètre de 0.5 à 2 μ m, ils contiennent des agrégats de protéines insolubles telles que la profilaggrine (granules de type F) ou la loricrine (granules de type L). La profilaggrine est déphosphorylée puis clivée pour donner la filaggrine.
- Les kératinosomes ou corps d'Odland : d'un diamètre de 0.1 à 0.5 μ m, ils présentent un aspect lamellaire et contiennent des lipides.

Zone de transition

La différenciation des cellules de la couche granuleuse, conduit à une zone de transition séparant la couche granuleuse, dernière couche de cellules nucléées, et de la couche cornée composée de cellules mortes.

Stratum corneum

Le stratum corneum (SC) est formé de cornéocytes, cellules aplaties et anucléées représentant le stade terminal de différenciation des kératinocytes. Le SC est divisé en deux parties, la partie la plus profonde appelée *stratum compactum*, et la plus superficielle le *stratum disjunctum*. Dès le *stratum compactum*, les cornéocytes sont attachés entre eux par les cornéodesmosomes, plus fragiles que les desmosomes. Au niveau du *stratum disjunctum*, l'absence de cornéodesmosomes aboutit à la desquamation, l'ultime étape de différenciation épidermique. Entre les couches profondes et superficielles du SC, les cornéocytes voient leur membrane plasmique s'épaissir devenir rigide et résistante pour finalement constituer une « enveloppe cornée » constituée des faisceaux de kératine associés à des molécules de filaggrine agglutinées dans le cytoplasme des cornéocytes.

Tableau 1 : caractérisation de la différenciation épidermique et des marqueurs spécifiques des couches de l'épiderme. D'après Augustin et al. 1997.

Couche de l'épiderme	Marqueurs protéiques	Marqueurs lipidiques
Couche cornée	Filaggrine Transglutaminase Involucrine	Céramides Cholesterol Acide gras libres
Couche granuleuse	Kératine K1/K10 Grain de kératohyaline Profilaggrine Loricrine	Corps d'Odland Phospholipides
Couche épineuse	Kératine K1/K10 Involucrine Transglutaminase	Phospholipides
Couche Basale	Kératine K5/K14/K15 Hémidesmosomes	Phospholipides

2. LES CELLULES SOUCHES DE L'ÉPIDERME INTER-FOLLICULAIRE

Les cellules souches de l'épiderme sont dites unipotentes car elles ne génèrent que des kératinocytes, en comparaison avec les cellules souches embryonnaires pluripotentes qui sont capable de générer tous types de cellules et tissus. Elles ont été initialement identifiées dans la fin des années 70 (Green et al., 1977).

Comme les autres types de cellules souches, elles ont une capacité d'auto-renouvellement associé à un haut potentiel prolifératif, mais se multiplient très peu *in vivo*. Elles forment une réserve en cellules progénitrices dites d'amplification transitoire (TA) qui elles sont très prolifératives.

Avec l'âge, il n'a pas été montré que le nombre des cellules souches ainsi que leur capacité d'auto-renouvellement étaient impactés, cependant leur capacité à produire des cellules progénitrices et différenciées diminue avec l'âge, notamment via une diminution de la sensibilité des KSC aux stimuli de l'environnement. (Giangreco et al., 2008)

Les KSC sont *in vivo* en état de quiescence. *In vitro*, elles donnent des clones nommés holoclones. Elles n'ont pas de marqueurs spécifiques, mais l'expression de plusieurs marqueurs permet de les approcher. C'est pourquoi, leur identification passe par la détermination de plusieurs caractéristiques :

- ❖ Leur état de quiescence : *in vivo*, ces KSC ont un cycle cellulaire particulièrement lent. L'incorporation d'un analogue nucléotidique, la thymidine radio marquée à l'ADN, de la cellule permet de différencier les cellules quiescentes, KSC qui se sont moins divisées et qui ont donc conservé une quantité de marquage supérieur, par rapport aux cellules qui ont un cycle de division rapide (TA). On parle alors de LRCs pour Label-Retaining cells (Tumbar et al., 2004; Sada et al., 2016). Ce cycle long des KSC permet de maintenir un pool constant toute la vie de l'individu et de minimiser le risque d'erreurs pouvant se produire lors de la réplication de l'ADN. Cette propriété illustre le maintien du *pool* de cellule souche sur le long-terme et ainsi leur persistance avec l'âge (Giangreco et al., 2008)

- ❖ leur potentiel clonogénique et prolifératif : c'est le test de référence pour mettre en évidence les KSC dans une suspension cellulaire. Elle consiste à compter le nombre de clones [Colony Forming Unit (CFU)] et le pourcentage de cellules formant des clones [Colony Forming Efficiency (CFE)] après ensemencement d'une suspension de kératinocytes à faible densité (10 à 20 cellules/cm²) (Barrandon and Green, 1987).

3 types de colonies sont observés (*FIGURE 4*):

- l'Holoclone : généré par un KSC à fort potentiel prolifératif (> à 100 cycles de division), est composé d'un grand nombre de cellules identiques et de petite taille ayant un ratio noyau/cytoplasme proche de 1. C'est une grosse colonie homogène aux bords réguliers.
- Le paraclone : tout petit clone composé de cellules différenciées à faible potentiel de division (<5) d'où sa taille.
- Le Méroclone : colonie de taille intermédiaire à contour irrégulier car constitué de cellules de taille hétérogène et supérieure aux KSC. Il est issu de cellules tout juste entrées en différenciation avec encore une forte capacité de prolifération de 50 à 100 divisions. Ce clone est composé de cellules TA, qui assurent le renouvellement de l'épiderme

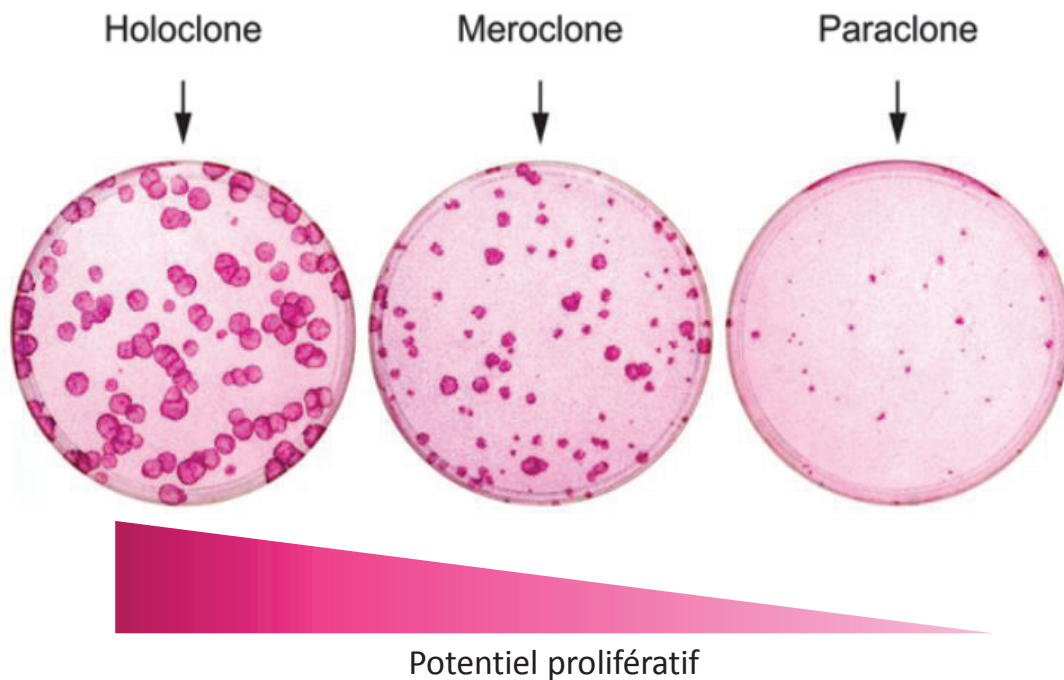


Figure 4 : aspect macroscopique et classification des colonies de kératinocytes après coloration à la rhodamine (Adapté d'après (Barrandon and Green, 1987))

- ❖ l'expression de marqueurs protéiques : Il n'existe pas de marqueur protéique spécifique de KSC. L'engagement de la cellule souche dans le processus de différenciation est graduel, et de ce fait l'acquisition des caractéristiques d'une cellule différenciée, accompagnée de la perte de celles des KSC se fait progressivement. Les protéines le plus souvent recherchées pour identifier les KSC sont répertoriées dans le *TABLEAU 2*. On retrouve les intégrines $\beta 1$ et $\alpha 6$, indispensables à l'adhésion de la cellule à la lame basale et donc au maintien du phénotype « stemness ». Ces deux isoformes sont plus fortement exprimées dans les KSC que dans les TA. Au niveau des cytokératines, les kératines K5/K14 associées à K19/K15 sont exprimées dans la couche basale de l'épiderme. L'expression de K15 n'est pas homogène dans la couche basale ce qui peut correspondre au marquage d'une sous population spécifique : KSC en grappes (« clusters ») (Jensen et al., 1999; Webb et al., 2004). Il a été montré que son expression était associée à une diminution de l'expression de l'intégrine $\beta 1$, ce qui ne corrèle pas

avec les caractéristiques de cellules souches (Bose et al., 2012). Parmi les autres marqueurs de KSC on retrouve l'isoforme $\Delta Np63$, facteur de transcription trouvé dans les KSC (Blanpain and Fuchs, 2007; Koster et al., 2007; Li et al., 2007; Pellegrini et al., 2001; Webb et al., 2004). L'isoforme $\Delta Np63$ est exprimé chez l'adulte dans les kératinocytes de la couche basale, puis réprimé lors de l'entrée différenciation (Senoo et al., 2007; Truong et al., 2006).

Tableau 2 : Principales caractéristiques et marqueurs identifiés des cellules souches cutanées : KSC, TA et cellule différenciée post mitotique

Caractéristiques et marqueurs phénotypiques	Fonction	KSC	TA	Cellule différenciée	Référence
Potentiel clonogénique	Auto-renouvellement	+++	+	-	(Barrandon and Green, 1987)
Adhésion rapide	Expression des complexes d'adhérence	+++	++	-	(Fortunel, 2003; Kaur and Li, 2000; Watt and Jones, 1993)
Capacité organotypique <i>in vitro</i>	Régénération tissulaire	+++	++	-	(Fortunel, 2003; Li et al., 2004)
Intégrine sous-unité $\alpha 6$	<i>Adhésion</i> - Composants transmembranaires des hémidesmosomes présents à la base de l'épiderme	++	+	-	(Kaur and Li, 2000; Li et al., 1998)
Intégrine sous-unité $\beta 1$	<i>Adhésion</i> - Récepteurs de cellules épithéliales exprimées dans les kératinocytes basaux.	++	+	-	(Jones and Watt, 1993; Kaur and Li, 2000)
CD71	Récepteur à la transferrine	-/+	+++	+++	(Kaur and Li, 2000; Li et al., 1998)
Kératine 15 / 19	Composant des filaments intermédiaires	++	+	-	(Pontiggia et al., 2009)
$\Delta Np63$	Marqueur de cellule proliférative	+	+	-	(Senoo et al., 2007; Truong et al., 2006)
Kératine 5/14	Exprimée par les cellules de la couche basale	+	+	-	
Ki67 / PCNA	Marqueur de prolifération des kératinocytes		++	-	

Les KSC sont localisés dans un environnement extracellulaire qui leur est propre, une « niche » où elles sont fortement ancrées. Celle-ci assure le maintien de leur phénotype et les protège des signaux inducteurs de la différenciation, de l'apoptose ou de tout autre évènement qui pourrait leur nuire (Lowell et al., 2000). La niche est ainsi définie comme un microenvironnement où tout un ensemble de signaux moléculaires maintiennent l'état de « stemness » et contrôlent l'entrée en cycle cellulaire des cellules souches. Parmi les signaux spécifiques de la niche des KSC, les molécules d'adhérence jouent un rôle important (via les intégrines $\beta 1$ principalement).

Les niches de cellules souches épidermiques sont situées au niveau du follicule pileux, des glandes annexes et de la couche basale de l'épiderme inter-folliculaire (*FIGURE 5*). (Watt and Jensen, 2009; Owens and Watt, 2003). En conditions normales, seules les cellules de l'épiderme interfolliculaire de la couche basale sont mobilisées et le renouvellement de l'épiderme ne fait pas appel aux cellules souches du follicule pileux ou des glandes annexes (Ghazizadeh and Taichman, 2001, 2005; Levy et al., 2005).

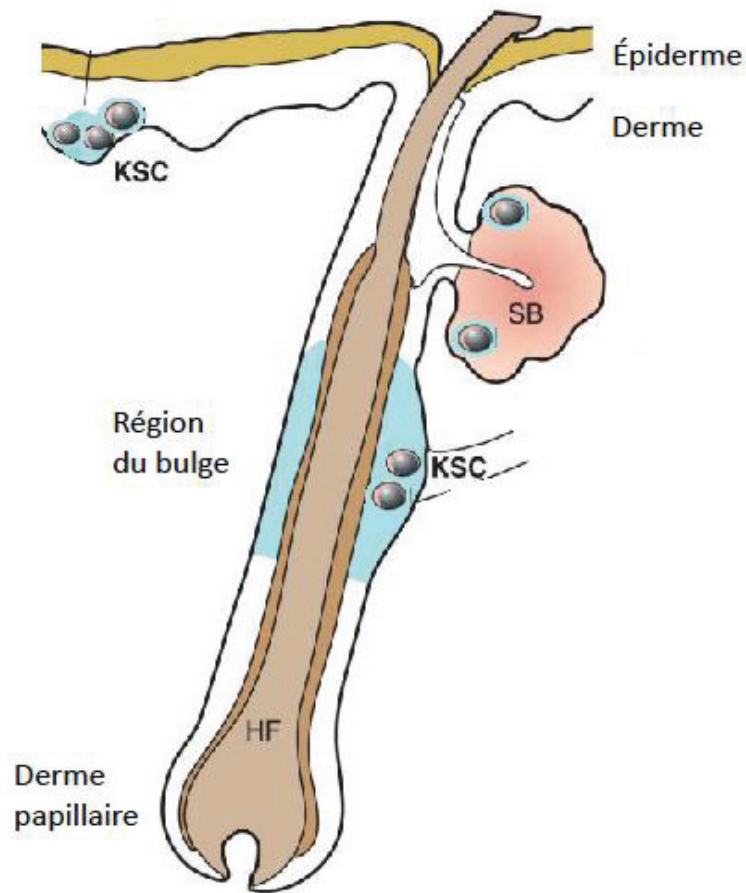


Figure 5 : Localisation des cellules souches épidermiques (KSC pour « kératinocytes stem cells ») – les différentes niches : le bulge du follicule pileux, l'épiderme inter folliculaire, enfin la glande sébacée (SB). Modifiée de (Box et al., 2010).

Les cellules souches sont aussi soumises aux facteurs solubles sécrétés par les cellules du derme et de l'hypoderme constituant le macro-environnement. Brièvement, le macro-environnement est composé des tissus sous-jacents, des autres cellules ainsi que des facteurs solubles auto ou paracrines. Dans le derme, ce sont les fibroblastes qui sont les principales cellules sécrétrices et au niveau de l'hypoderme ce sont les adipocytes et les cellules souches mésenchymateuses, les facteurs de croissance retrouvés sont l'EGF, le β -FGF, l'IGF et le TGF- β (Laverdet et al., 2014; Ozpur et al., 2016)

Ces facteurs de croissance liés à des voies de signalisation influencent le maintien du pool de KSC en inhibant la différenciation cellulaire et en maintenant leur quiescence.

Le microenvironnement est principalement composé par la lame basale : le maintien du phénotype souche est réalisé via les molécules d'adhérence. *In vivo*, la différenciation du kératinocyte est directement liée à la perte de ces capacités d'adhésion, il doit se détacher de la lame basale pour migrer verticalement dans les couches suprabasales. (Green et al., 1977; Lechler and Fuchs, 2005). Parmi les molécules impliquées on retrouve les intégrines, mais aussi leurs ligands comme le collagène ou la fibronectine. Les différentes intégrines retrouvées ne sont pas exprimées au même niveau de la membrane des kératinocytes. Les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ sont surtout au niveau des surfaces latérales et basales alors que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est localisée au niveau de la partie basale du kératinocyte de la couche basale. Les intégrines $\beta 1$, qui fixent le collagène de type IV, ont un rôle très important dans la régulation de la différenciation des kératinocytes, tout comme l'intégrine $\alpha 6$, qui fixe la laminine 3.3.2 (Jones and Watt, 1993; Levy et al., 2000; Rodius et al., 2007; Watt and Jones, 1993).

Maintien du pool de KSC

Au sein de la couche basale, les KSC sont organisés en unité épidermique de prolifération ou EPU formé d'une ou plusieurs cellules souches isolées entourées par un « cluster » de cellules TA (Ghazizadeh and Taichman, 2005; Potten, 1974; Strachan and Ghadially, 2008). Deux modes de divisions ont été proposés afin de maintenir le pool de KSC. Le premier repose sur le concept de division asymétrique où un KSC quiescent se divise en un KSC et une cellule progénitrice TA (*FIGURE 6*). Cette dernière voit son potentiel de division augmenter très rapidement pour amplifier le nombre de cellules filles issues d'un même KSC. Puis ces cellules filles entrent dans le processus de migration verticale et de différenciation. Dans ce modèle, les KSC ne se divisent que rarement mais continuellement afin de maintenir la population de TA et donc l'homéostasie épidermique.

Le deuxième modèle combine division symétrique et asymétrique (*FIGURE 6*), ou une cellule en division donnerait deux cellules filles aux destinées variées en fonction des signaux. Selon ce modèle, les cellules peuvent avoir les destinées suivantes:

- i) les deux cellules filles restent prolifératives
- ii) sortent du cycle cellulaire et se différencient
- iii) une des deux reste proliférative et l'autre se différencie (Clayton et al., 2007; Klein et al., 2007)

Ces deux modalités de division sont sollicitées spécifiquement selon les besoins cellulaires : division asymétrique en situation d'homéostasie, division symétrique en situation de cicatrisation/réparation épidermique. Ce modèle permet d'expliquer pourquoi les KSC sont physiologiquement quiescentes.

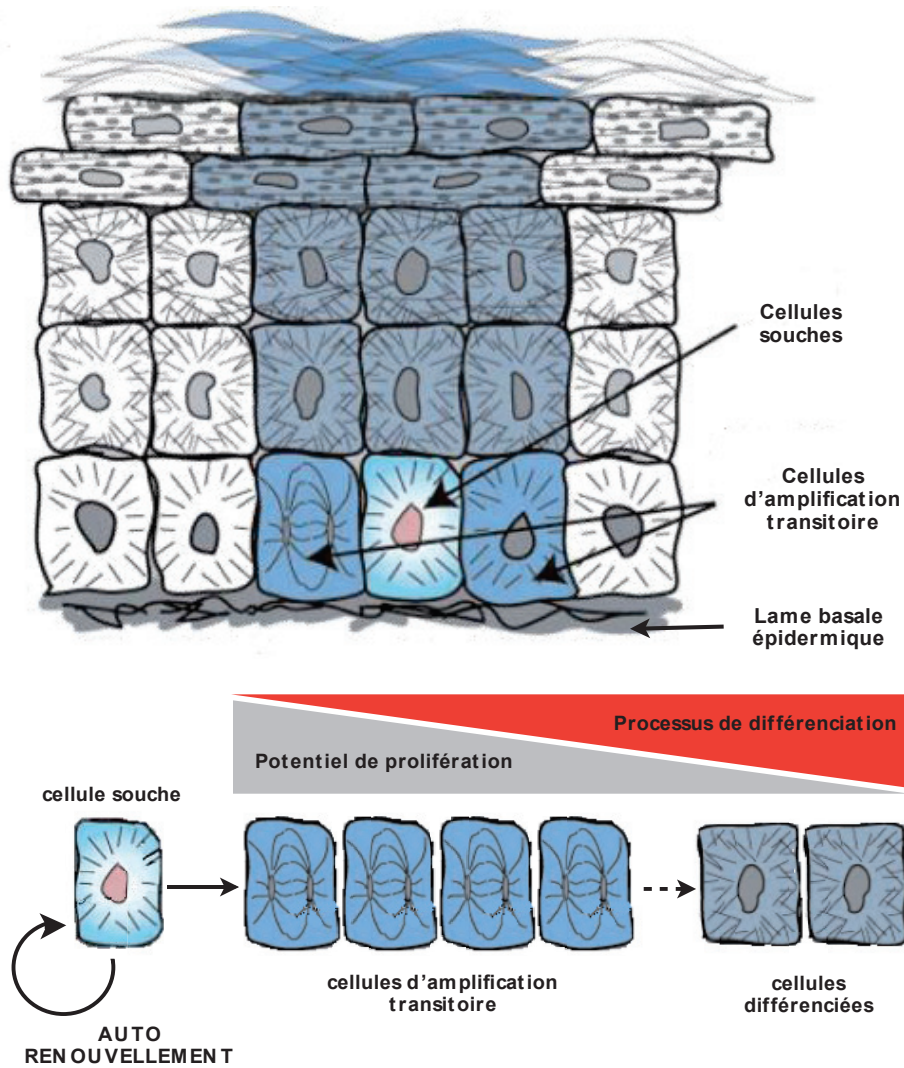


Figure 6 : Illustration du concept de division asymétrique : une cellule souche génère une cellule TA qui s'engage dans le processus de différenciation terminale et une cellule qui conserve le phénotype souche (d'après (Alonso and Fuchs, 2003))

B. LA JONCTION DERMO-EPIDERMIQUE

L'épiderme est fortement ancré au derme grâce à une structure unique et complexe, la jonction dermo-épidermique (JDE). C'est une zone acellulaire synthétisée conjointement par les kératinocytes de la couche basale et par les fibroblastes du derme superficiel ou derme papillaire (Marinkovich, 1993). Cette structure hautement organisée, à l'agencement de molécules exclusives, intervient dans de nombreux processus biologiques tels que le renouvellement et la différenciation de l'épiderme. Pour résumer, la JDE est formée d'une lame basale sur laquelle les cellules de l'épiderme s'ancrent fortement.

1. ORGANISATION DE LA JDE

D'un point de vue ultra-structural il est possible de différencier plusieurs zones, les hémidesmosomes, la lame basale composée de la *lamina lucida* et de *lamina densa* et enfin la zone fibrillaire (FIGURE 7). Elles seront décrites depuis la couche basale de l'épiderme vers le derme. (Briggaman and Wheeler, 1975; Ray and Gately)

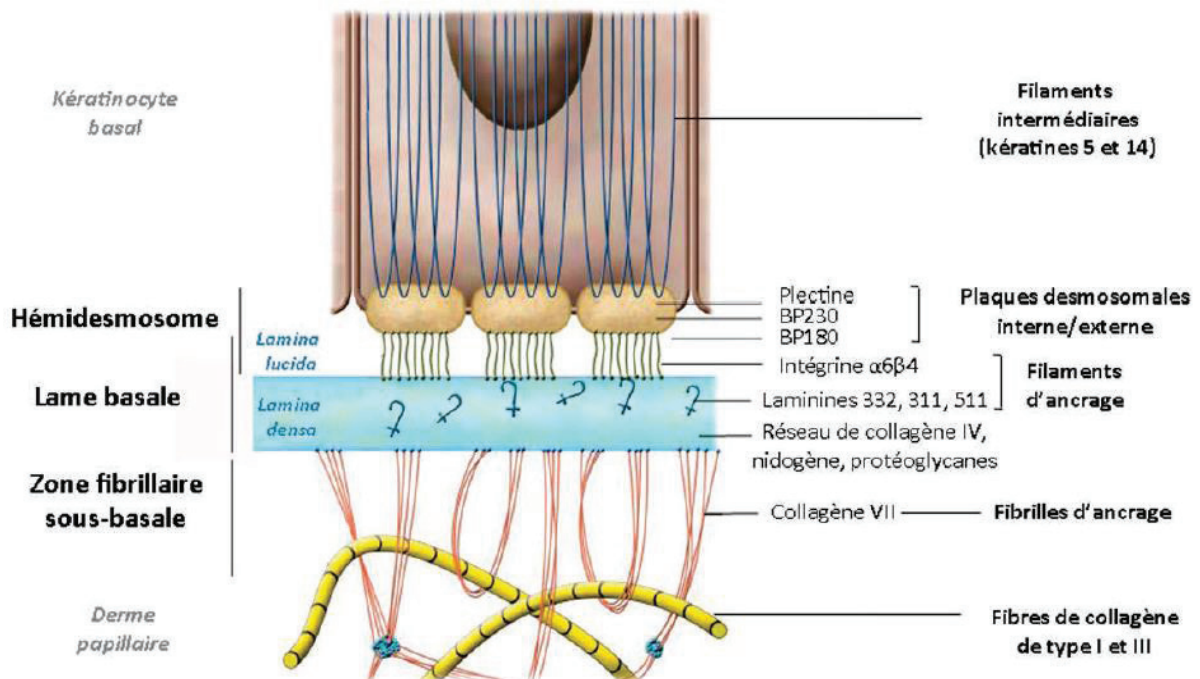


Figure 7 : Représentation de la structure de la JDE, traduit de (Hertl, 2006)

a) Les hémidesmosomes

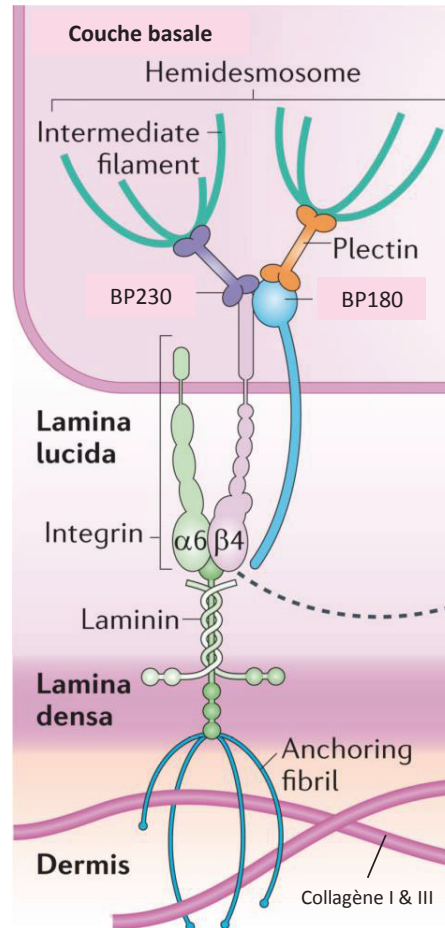


Figure 8: organisation moléculaire d'un hémidesmosome (Simpson et al., 2011)

Les hémidesmosomes sont des complexes multi-protéiques de 0.1 à 0.5 μ m de diamètre. Ils assurent le lien physique entre les cellules de la couche basale et la matrice extracellulaire (MEC) sous-jacente en ancrant le cytosquelette de kératine à la lame basale. La structure spécifique des hémidesmosomes est déterminée par l'interaction des protéines de la plaque dense et des protéines transmembranaires (FIGURE8).

Les protéines de la plaque dense: situées juste sous la membrane cytoplasmique, elles forment un site d'attachement pour les kératines K5 et K14. Elles sont responsables du maintien de la forme et de l'intégrité structurale des cellules. On retrouve aussi dans cette plaque la plectine et

l'antigène 1 de la pemphigoïde bulleuse (BP230). Les protéines transmembranaires comportent essentiellement le collagène de type XVII (ou l'antigène 2 de la pemphigoïde bulleuse BP180) et les intégrines. Ces deux catégories de molécules sont détaillées ci-dessous.

Le collagène XVII est un composant majeur des filaments d'ancrage. Il possède un long domaine extracellulaire contenant des séquences collagéniques interrompues permettant l'interaction avec l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ (Ghohestani et al., 2001). Il semblerait que ce collagène soit impliqué dans la régulation de la différenciation kératinocytaire.

Les intégrines sont une famille de protéines de liaison transmembranaire qui ont de nombreuses interactions avec la MEC. Elles permettent l'ancrage solide des cellules à la matrice, elles participent à la communication intra et intercellulaire ainsi qu'à la migration cellulaire lors de la différenciation. Les intégrines sont des hétérodimères composés d'une sous-unité α et β , dont la masse varie entre 100 et 140 kDa (*FIGURE 9*). La liaison des intégrines à leurs ligands est dépendante de cations bivalents extra cellulaires tels que le Ca^{2+} ou le Mg^{2+} , grâce à la présence de 3 ou 4 sites de liaison aux cations dans la partie extracellulaire de la chaîne α . Au niveau de la JDE, les intégrines les plus abondantes sont l' $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$. Elles sont pour la plupart connectées aux filaments d'actine. L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est exprimée au pôle basal des kératinocytes de la couche basale et fait partie intégrante de l'hémidesmosomes. C'est le récepteur préférentiel des glycoprotéines extracellulaires, les laminines 1.1.1 et 3.3.2 (Aumailley and Rousselle, 1999; Moll and Moll, 1998). L'intégrine $\alpha 2\beta 1$, localisée dans les plaques d'adhésion focale est le récepteur aux collagènes natifs de type I, III, IV et VI ainsi qu'aux laminines 1.1.1 ; 2.1.1 et 3.3.2, elle joue un rôle très important dans la migration cellulaire. La dernière intégrine, $\alpha 3\beta 1$ est le récepteur de la laminine 3.3.2, du nidogène et de la fibronectine. Elle fait partie des plaques d'adhésion focale. Ces trois intégrines permettent le maintien cohésif de la lame basale épidermique.

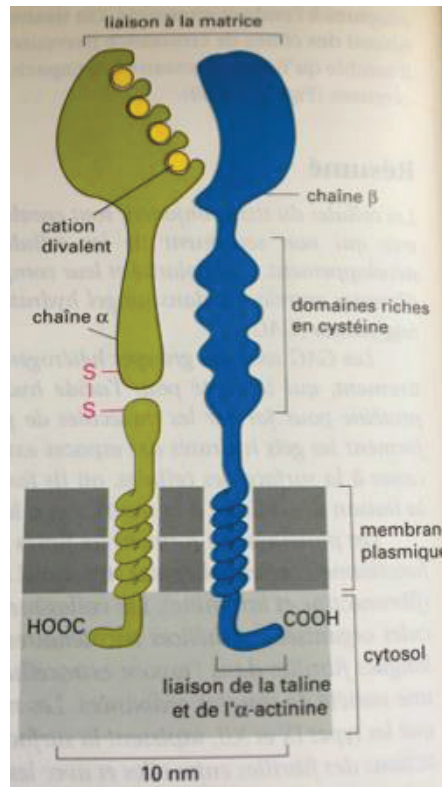


Figure 9 : structure générale de l'intégrine (source: biologie moléculaire de la cellule)

b) La lame basale épidermique

Feuillet de MEC hautement spécialisé constitué par auto-assemblage de deux réseaux protéiques, formés par les laminines et le collagène de type IV, reliés entre eux par diverses glycoprotéines telles que le nidogène ou le perlecan. Les constituants de la lame basale sont synthétisés à la fois par les kératinocytes et les fibroblastes, le collagène IV principalement par fibroblastes, alors que le nidogène exclusivement par les fibroblastes (Fleischmajer et al., 1995; Schafer et al., 1991; Wang et al., 2006).

Elle apparaît d'un point de vue ultrastructural sous la forme de deux couches distinctes et superposées qui n'ont pas la même densité aux électrons.

(1) *La lamina lucida (40-50 nm) :*

Organisée en fins filaments d'ancrage, elle se situe en contact direct avec la membrane plasmique des cellules de la couche basale de l'épiderme. Elle est composée principalement du domaine extracellulaire du collagène XVII et des laminines 3.3.2 et 3.1.1, qui se lient à la portion extra cellulaire de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ du kératinocyte de la couche basale. En dehors des hémidesmosomes, les filaments d'ancrages sont moins abondants et de composition différente. L'intégrine $\alpha 3\beta 1$ est majoritaire et associée au complexe laminine 3.3.2-3.1.1 ou 3.3.2-3.2.1.

Les laminines sont des glycoprotéines cruciformes, multifonctionnelles, spécifiques des lames basales et qui sont synthétisées de façon très précoce chez l'embryon. Elles sont constituées de l'assemblage de 3 chaînes polypeptidiques en forme de croix et unies par des ponts disulfures (*FIGURE 10*). Il existe environ 15 isoformes de laminines. Au niveau de la lame basale épidermique, on détecte les laminines 3.3.2 ; 3.1.1 et 5.1.1 (Aumailley and Rousselle, 1999). La plus abondante étant l'isoforme 3.3.2 (appelée aussi laminine 5). Les laminines ont un rôle primordial dans la structure de la lame basale épidermique. Exclusivement synthétisée par les kératinocytes, elles sont capables de se lier et d'interagir avec les collagènes de type IV, VII et XVII, les intégrines ainsi que des protéoglycannes. Elles jouent un rôle dans la migration, la différenciation et la prolifération des kératinocytes.

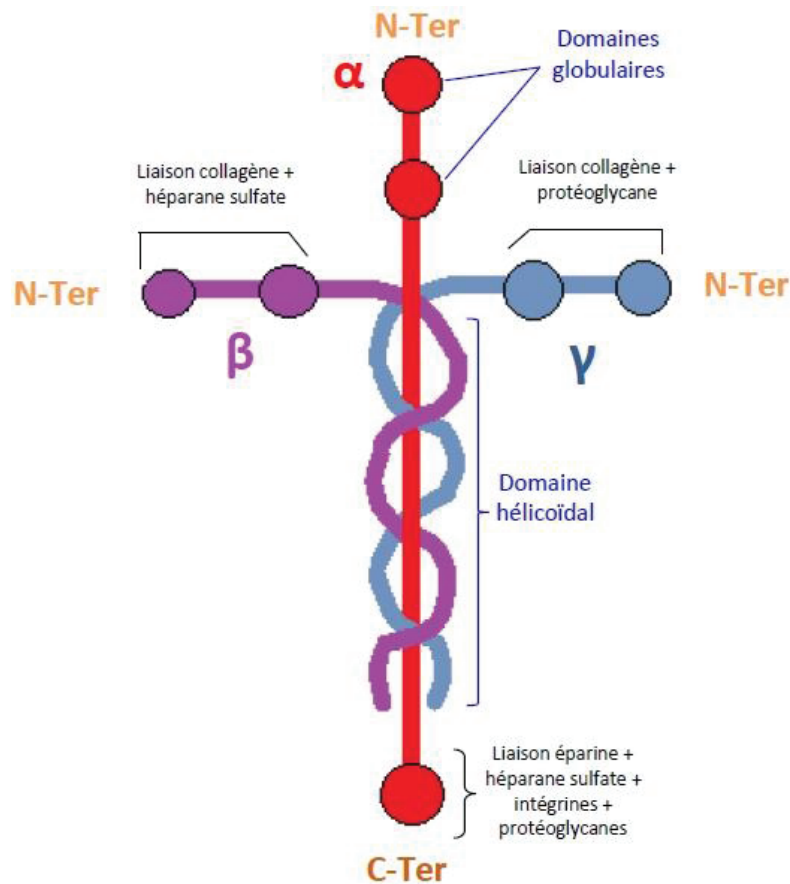


Figure 10 : structure générale d'une laminine

(2) La lamina densa (50 à 70 nm) :

C'est la deuxième couche de la lame basale, elle est parallèle à la *lamina lucida* et beaucoup plus dense aux électrons. Elle constitue une zone d'ancrage pour les filaments issus de l'épiderme ou du derme papillaire. Elle est principalement composée de collagène de type IV, de nidogène, de laminine 5.1.1 et 3.2.1 et de protéoglycannes a héparane sulfate et chondroïtine sulfate. L'assemblage du réseau de collagène de type IV est responsable des fonctions de support tissulaire et des propriétés de flexibilité de la lame basale. De plus, les liaisons établies entre collagène IV et intégrine $\beta 1$ participent au maintien de l'homéostasie cellulaire de la couche basale de l'épiderme.

c) Zone fibrillaire sous basale

Troisième compartiment de la JDE, il est en continuité avec le derme sous-jacent. Cette zone est essentiellement constituée de fibrilles d'ancrage d'une épaisseur de 20 à 60 nm, dont le composant principal est le collagène de type VII. Ces fibrilles permettent d'ancrer la *lamina densa* et les plaques d'ancrage au derme superficiel en formant des boucles semi circulaires autour des fibres de collagène de type I et III du derme papillaire.

2. FONCTIONS DE LA JONCTION DERMO-EPIDERMIQUE

De par sa structure histologique de barrière, la JDE permet de limiter et de contrôler les échanges entre le compartiment dermique et le compartiment épidermique.

Dans ce contexte d'interface, la JDE exerce un ensemble de fonctions biologiques cruciales telles que :

- Assurer une cohésion épithelio-mésenchymateuse grâce à la présence de structure d'ancrages spécifiques
- Fournir un support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme au derme
- Déterminer une polarité pour des kératinocytes de la couche basale
- Constituer un support migratoire aux kératinocytes lors de processus inflammatoires ou durant la ré-épidémisation lors de la cicatrisation,
- Réguler les d'échanges métaboliques
- Former un réservoir de facteurs de croissance ou d'autres facteurs solubles
- Réguler la migration, la prolifération, la différenciation et la survie des cellules dermiques et épidermiques.

C. LE DERME

Le derme est le tissu de soutien dense et fibro-élastique responsable de la souplesse, de l'élasticité et de l'hydratation de la peau. Il contient peu de cellules, dont les principales sont les fibroblastes entourés d'une abondante matrice extra cellulaire (MEC). Ce tissu est très richement vascularisé, ce qui en fait un élément essentiel dans la thermorégulation, la cicatrisation et de la nutrition de l'épiderme.

Histologiquement, il est possible de diviser le derme en deux régions distinctes :

- Derme superficiel ou papillaire, en contact direct avec l'épiderme. On y retrouve les papilles dermiques, structures formant des saillies fibreuses richement vascularisées et innervées qui apportent une surface d'échanges importante. Dans cette zone la plus riche en cellules, les fibres de collagène et les fibres élastiques de faible diamètre sont orientées perpendiculairement à la JDE (Sorrell and Caplan, 2004).
- Le derme profond ou réticulaire, représente à lui seul 80% de l'épaisseur totale du derme. Les fibres d'élastine et de collagène sont de grands diamètres et sont disposées de façon multidirectionnel, parallèlement à la surface cutanée. Plus le derme est profond et plus les fibres forment un réseau dense.

1. COMPOSITION CELLULAIRE

On retrouve au sein du derme de nombreuses cellules résidentes minoritaires associées aux structures dermiques telles que les cellules endothéliales des capillaires sanguins, les terminaisons nerveuses, les glandes sébacées et sudoripares, des cellules musculaires ainsi que des cellules immunes dites de passage mais qui, pour certaines d'entre elles (les mastocytes et les macrophages notamment) peuvent résider sur de relativement longues périodes dans le derme et sont renouvelées à l'échelle de mois (macrophages) ou possiblement sur de plus longues périodes (mastocytes). L'ensemble des cellules immunes observable dans le derme

regroupe des macrophages, mastocytes, cellules dendritiques et dans une moindre mesure, des plasmocytes, lymphocytes T ou B, neutrophiles et éosinophiles. La cellule prépondérante reste néanmoins le fibroblaste.

Les fibroblastes, principales cellules du derme, sont dites cellules résidentes et ont une morphologie allongée en fuseau, avec de nombreux prolongements cytoplasmiques et un noyau central. Il existe 2 sous populations en fonction de leur localisation :

- les fibroblastes du derme papillaire sont petits et en contact avec plusieurs faisceaux de collagènes
- les fibroblastes du derme réticulaire, plus profond, sont plus gros et en relation avec une seule fibre de collagène.

Quel que soit leur localisation, les fibroblastes sont le siège de la biosynthèse et de la dégradation des principales macromolécules de la MEC. Le remodelage de la MEC par les fibroblastes est possible car ils synthétisent des enzymes de dégradation de type metalloprotéinases (MMP). Ils synthétisent aussi des facteurs solubles responsables de régulation par voie paracrine de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes. (Coulomb et al., 1989).

2. COMPOSITION DE LA MATRICE EXTRA CELLULAIRE

La matrice extra cellulaire est composée de nombreuses macromolécules comprenant pour 90% des collagènes et pour 2-4% est l'élastine (*FIGURE 11*). Afin de permettre une meilleure compréhension des résultats que nous avons obtenus et décrits dans la partie « résultats » de cette thèse, les rappels bibliographiques qui suivent sont principalement focalisés sur l'élastine plus que sur les collagènes. Nous citerons seulement les autres composants : les glycosaminoglycanes (GAG) dont le principal est l'acide hyaluronique, les protéoglycannes tels

que le perlecan, syndecan ou la décorine, et les glycoprotéines de structure dont les laminines et la fibronectine.

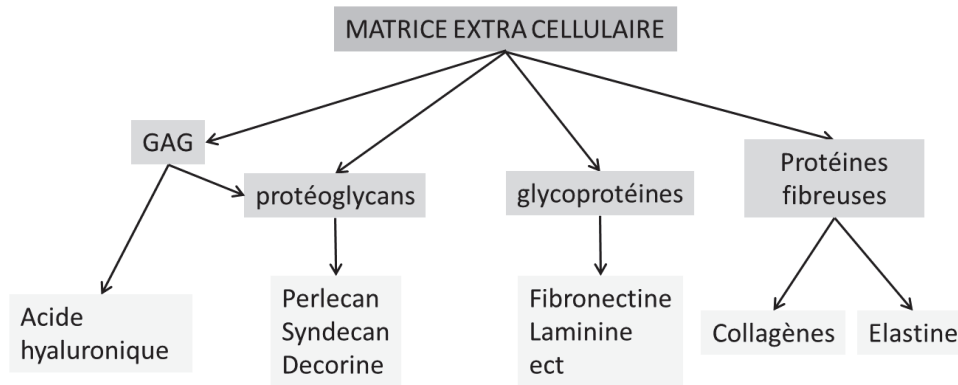


Figure 11 : Principaux composants de la matrice extra cellulaire du derme

a) Les collagènes

Brièvement, les collagènes représentent la composante structurale du derme la plus importante, soit 70% du poids sec de la peau humaine. Ils forment la trame fibreuse du derme et participent de manière importante à régir l'adhésion et la migration cellulaire.

La famille des collagènes est complexe et diversifiée, tant d'un point de vue du nombre de type de collagène, de leur structure moléculaire et supra moléculaire, de leur distribution tissulaire que de leurs fonctions. Sur les 29 collagènes humains décrits, 14 sont retrouvés dans la peau (Sherman et al., 2015) La structure hélicoïdale rigide à 3 brins caractéristique de la plupart des types de collagène résulte de l'enroulement de trois chaînes polypeptidiques constituées d'une répétition de triplet d'acide aminé Gly-X-Y avec X étant souvent un résidu proline et Y, hydroxyproline (Burgeson, 1987; Grant and Ayad, 1988).

Les collagènes sont classés en plusieurs sous-familles en fonction des similitudes qu'il est possible de retrouver au niveau de l'architecture modulaire des chaînes et de leur assemblage supramoléculaire (Ruggiero et al., 2005):

- les collagènes fibrillaires, capables de former des fibrilles (I, II, III, V et XI)
- les collagènes non fibrillaires formant des feuillets (IV, VIII et X)

- les collagènes non fibrillaires formant des structures spécifiques (VI et VII)
- les collagènes non fibrillaires associés aux membranes (XIII, XV et XVII)
- les collagènes FACITs (pour Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helix) (IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI).

Dans le derme (FIGURE 12)

- Le collagène de type I est le plus important (il représente 60-80% des collagènes du derme) puis les collagènes de type III et V représentent respectivement 15-25% et 2-5%. Assemblés de façon longitudinale, le collagène de type I s'agrège pour former des fibrilles, qui se stabilisent par des liaisons covalentes. La proportion de collagène de type I et III est très importante pour assurer la fonction mécanique du tissu. Ce ratio collagène type I/collagène type III est de 6 pour 1 (Lovell et al., 1987). Le collagène de type V associé aux fibrilles de collagène de type I et III assure un espacement régulier entre les fibres.
- Le collagène microfibrillaire de type VI est un collagène mineur qui forme un réseau de fibres perlées assemblées en tétramères. Il interagit avec les intégrines, suggérant un rôle dans l'adhérence cellulaire (Keene et al., 1988).
- On détecte aussi du collagène de type IV (membrane basale de la jonction dermo-épidermique et de la paroi des vaisseaux sanguins), et du collagène de type VII (fibrilles d'ancrage) (FIGURE 12)

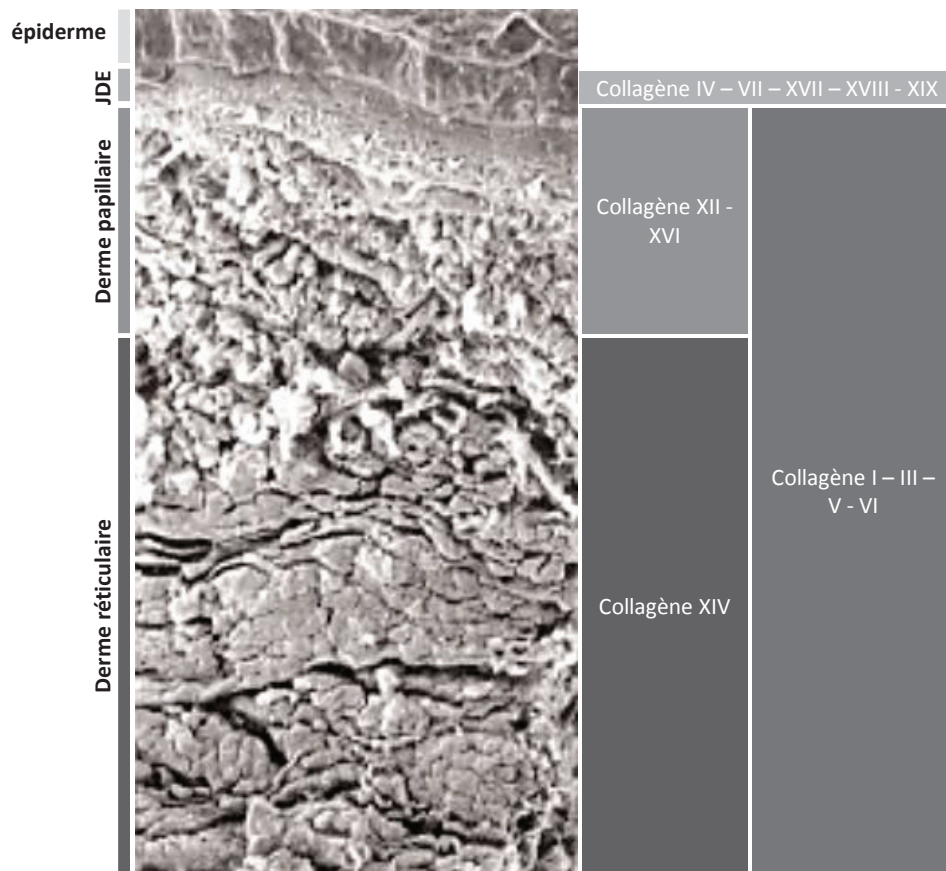


Figure 12 : observation d'une peau native par microscopie électronique à balayage montrant la répartition des principaux types de collagènes du derme et de la jonction dermo épidermique. Le collagène de type I est le plus abondant dans le derme, alors que les collagènes XII, XVI, XIV sont minoritaires. (D'après (Ruggiero et al., 2005))

b) Le tissu élastique & l'élastogénèse

Physiologiquement dans la peau humaine, les fibres élastiques révélées par observation de coupes de derme en microscopie électronique à transmission (TEM) adoptent une architecture hautement organisée, comprenant 3 sortes de fibres (*FIGURE 13*) (Cotta-Pereira et al., 1976):

- ✓ Dans le derme papillaire : les fibres oxytalanes riches en fibrilline juste sous la jonction dermo-épidermique apparaissent insérées perpendiculairement à la lamina densa et forment de fines arborisations « en candélabre ». Elles confèrent la résistance mécanique de la peau. Les fibres y sont plus fines que dans le derme réticulaire
- ✓ Dans le derme réticulaire superficiel : les fibres d'élaunine forment des « coups d'ongle » parallèles à la JDE au niveau de la transition entre le derme papillaire et réticulaire. Elles sont anastomosées avec les fibres oxytalanes du derme papillaire et les fibres élastiques matures du derme réticulaire. Ces fibres d'élaunines sont immatures, plus courtes et moins larges que les fibres élastiques matures.
- ✓ Dans le derme réticulaire profond : les fibres élastiques matures apparaissent parallèles à la jonction dermo épidermique. Elles forment un réseau dense et anastomosé riche en fibres élastiques.

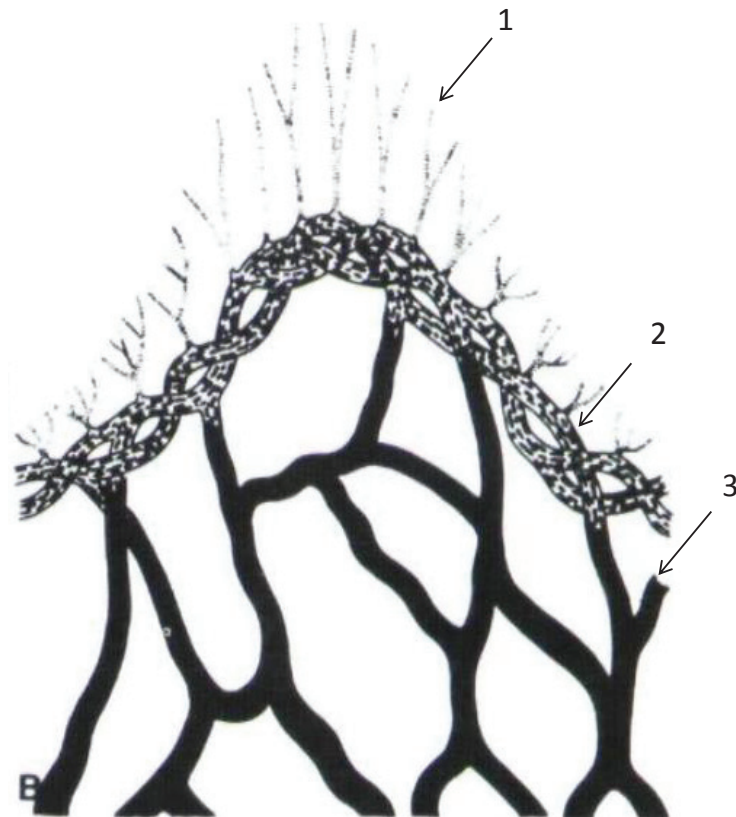


Figure 13 : Organisation schématique des fibres élastiques en réseau : 1) fibres oxytalanes, 2) fibres d'élaunine, 3) fibres élastiques matures (Prost-Squarcioni et al., 2008)

Ce réseau continu de fibres élastiques 3-D confère l'élasticité du derme ce qui signifie qu'il est déformable avec une capacité de récupération passive sans dépense énergétique.

La structure d'une fibre élastique est complexe et met en jeu de nombreux acteurs. Elle résulte de l'assemblage d'un cœur d'élastine (composé de l'assemblage et de la réticulation de son précurseur, la tropoélastine) sur des microfibrilles du tissu élastique (TE) riches en fibrilline. L'élastine est une protéine très singulière dont la demi-vie est de 74 ans (Frances and Robert, 1984; Sherratt, 2009).

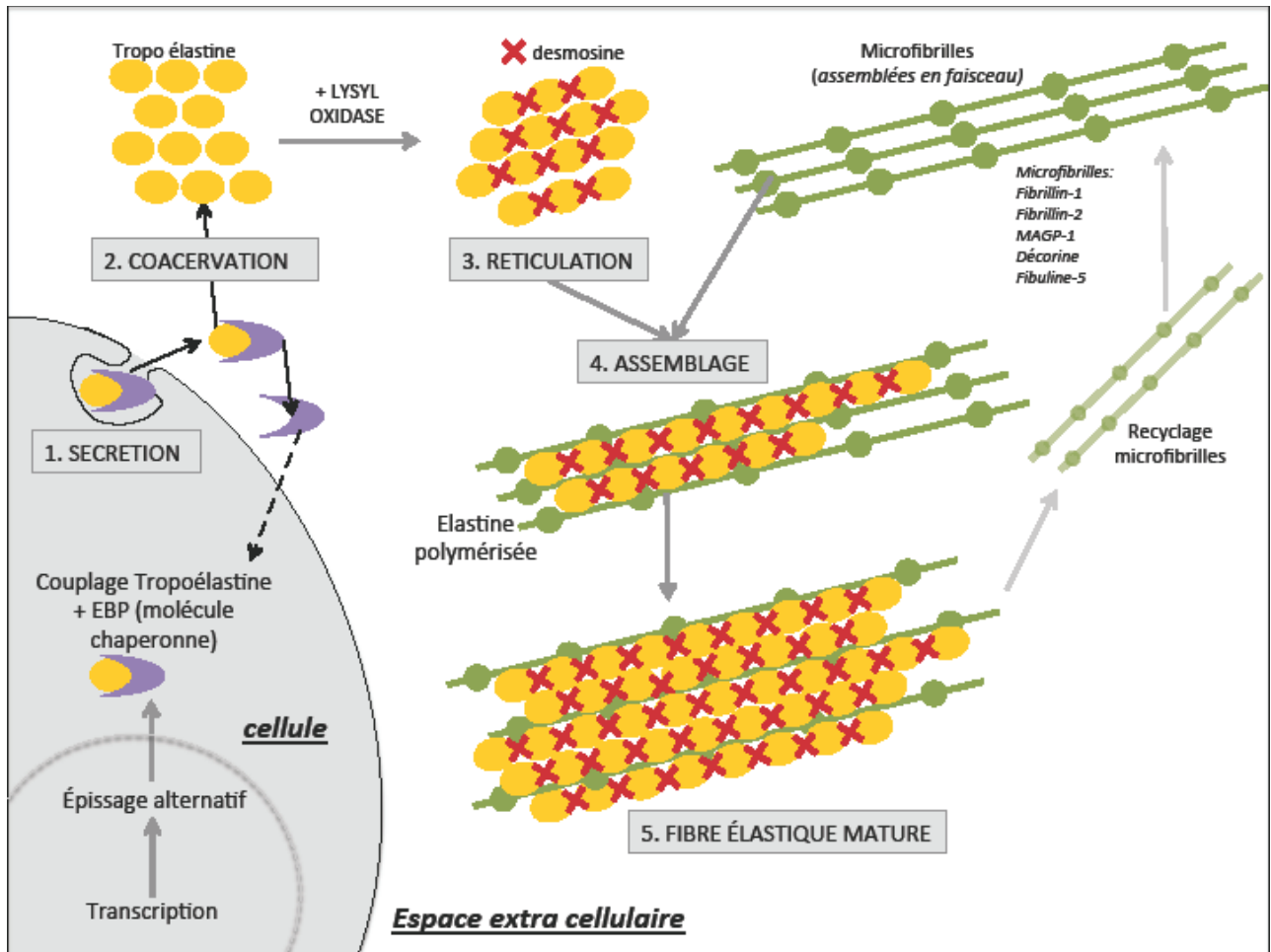


Figure 14 : schéma simplifié des étapes de formation des fibres élastiques (adapté de (Mithieux and Weiss, 2005; Wise and Weiss, 2009))

Cet assemblage suit des étapes hiérarchiques.

La première étape est l'expression du gène de la tropoélastine qui aboutit à 11 isoformes (Wise and Weiss, 2009). La tropoélastine, précurseur soluble de l'élastine possède deux domaines différents, un hydrophobe et l'autre hydrophile. Elle contient environ 30% de glycine, 35 % de proline, valine, leucine et isoleucine et 20 % d'alanine. Les résidus fonctionnels tels que la lysine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'arginine sont présents en moindre quantité.

Ces 11 isoformes résultent de 2 types d'épissage alternatif :

- Le premier favorise l'excision des exons codants pour un domaine impliqué dans la réticulation de la tropoélastine

- L'autre favorise l'excision des exons codants pour des séquences hydrophobes.

La régulation de la synthèse et de l'épissage alternatif de la tropoélastine se fait en fonction de la localisation tissulaire. La transcription du gène de l'élastine est contrôlée par sa sensibilité à des facteurs solubles, comme des facteurs de croissance ou hormones, qui peuvent être sécrétés lors de processus tel que la cicatrisation. Parmi les facteurs stimulant sa synthèse on retrouve le TGF β , l'IGF, l'IL-1 β (Foster et al., 1987). A contrario, le TNF α , l'interféron γ ainsi que la vitamine D3 sont considérés comme inhibiteurs (Berk et al., 1991; Eichner and Rosenbloom, 1979; Pierce et al., 1992). Enfin, point crucial, sa synthèse est soumise à une autorégulation négative par la tropoélastine elle-même, via son accumulation dans l'espace extracellulaire.

La tropoélastine ne subit quasiment pas de modifications post-traductionnelles. Elle est sécrétée (*FIGURE 14. 1*) via un récepteur spécifique composé d'une sous unité extra cellulaire, l'EBP (pour Elastin Binding Protein) et de deux sous unités transmembranaires. L'EBP intervient dans l'assemblage de l'élastine en permettant aux monomères de tropoélastine sécrétés de s'aligner correctement tout en les protégeant de la dégradation par des protéases. L'EBP est aussi le principal récepteur impliqué dans la capacité de l'élastine et de ses produits de dégradation à influencer le comportement cellulaire à travers la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que l'expression des gènes (Hinek and Rabinovitch, 1994). Cette association avec l'EBP est nécessaire à la sécrétion de la tropoélastine.

Une fois dans l'espace extra cellulaire, les molécules de tropoélastine s'agrègent en coacervate (*FIGURE 14. 2*) où elles sont stabilisées par réticulation covalente via la formation de desmosine (*FIGURE 14. 3*) par les lysyl oxidase (LOX), essentiellement par l'isoforme LOXL (Lemaire et al., 2007; Lucero and Kagan, 2006; Mithieux and Weiss, 2005; Szauter et al., 2005). La tropoélastine devient alors insoluble.

Les LOX initient la réticulation de la tropoélastine. Elles catalysent la désamination oxydative des résidus de lysine, respectivement lysyl et hydroxylysyl en α -aminodipic- δ -semialdéhydes correspondant. Cette réaction initiale produit l'allysine. Elle est suivie par des réactions

spontanées de condensation de résidus lysine et allysine proches afin de former des ponts de réticulation tels que l'allysine aldol, la lysinonorleucine, la merodesmosine et les liaisons croisées tétra-fonctionnelles spécifiques à l'élastine : la desmosine et l'isodesmosine (Partridge et al., 1964). La desmosine et l'isodesmosine sont donc le résultat de la réticulation de 4 résidus lysine présents sur les molécules de tropoélastine.

Les LOX, enzymes dépendantes du cuivre, font partie de la famille des amines-oxydases spécifiques du collagène et de l'élastine.

La conservation du gène codant pour la LOX au cours de l'évolution reflète son importance. Elle est synthétisée sous la forme d'une préproapoprotéine. La pro apoenzyme est obtenue par clivage du peptide signal avant d'être N glycosylée pour permettre sa sécrétion sous la forme pro-enzyme. Un atome de cuivre Cu^{2+} est incorporé au niveau de son site actif puis sécrété dans le milieu extracellulaire. Enfin elle est clivée par la procollagène-c-protéinase en protéine mature (Lucero and Kagan, 2006).

Il existe à ce jour 5 isoformes : la LOX, et les lysyl oxidase Like: LOXL1, LOXL2, LOXL3, LOXL4

Toutes possèdent une région C-terminale (*FIGURE 15*) identique comprenant le site de fixation au cuivre et les résidus de lysine et de tyrosine impliqués dans la formation du cofacteur lysine tyrosylquinone (LTQ). Les isoformes diffèrent par leur région N-terminale. Leurs différences de structure et d'expression tissulaire *in vivo* suggèrent des fonctions biologiques et des spécificités différentes des isoformes des LOX.

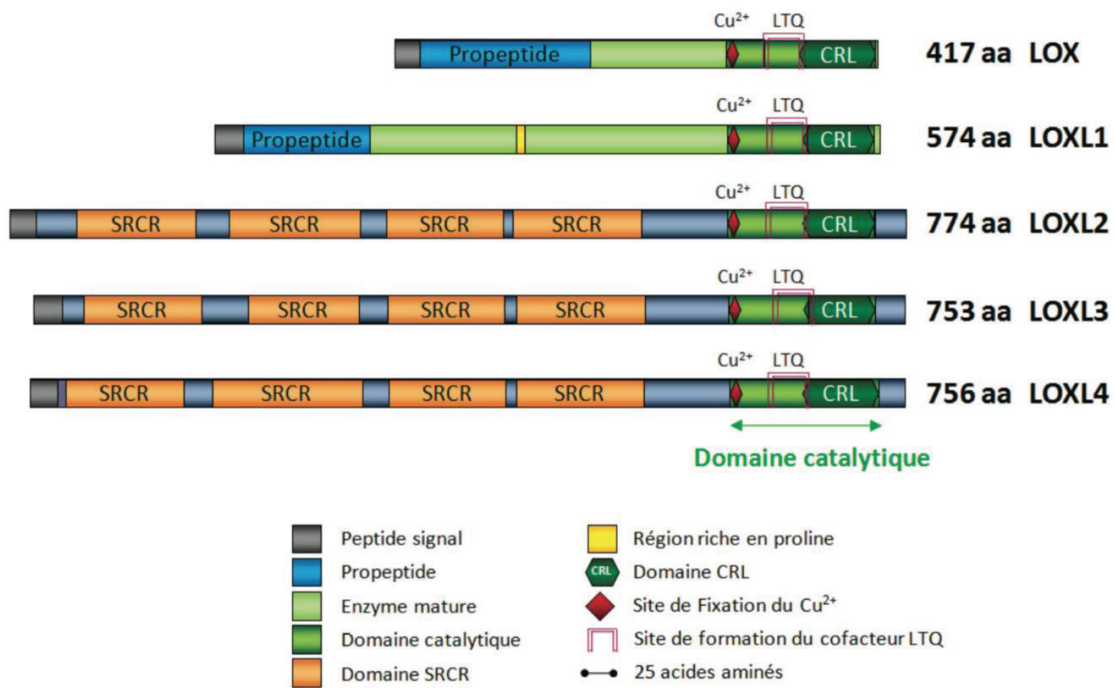


Figure 15: représentation schématique de la structure des membres de la famille des lysyl oxidase.

Tableau 3 : résumé des principales caractéristiques des lysyl oxidases

Enzyme	Principales caractéristiques	Références
LOX	<ul style="list-style-type: none"> - Expression variable en fonction des processus biologiques. - Régulation via des facteurs de transcription, facteurs de croissance, cytokines et hormones, dont le βFGF et le TGFβ1 - Principale enzyme responsable de la réticulation de l'élastine et du collagène 	(Atsawasuwan et al., 2008; Csiszar et al., 1996)
LOX L1	<ul style="list-style-type: none"> - L'isoforme LOXL1 est la plus similaire à LOX d'un point de vue structural et fonctionnel. - Active sur les substrats de collagène et d'élastine avec une <u>action préférentielle pour l'élastine</u> 	(Borel et al., 2001; Noblesse et al., 2004)
LOXL2	<ul style="list-style-type: none"> - Impliquée dans les phénomènes de sénescence - Sa surexpression a été rapportée dans plusieurs types de tumeurs, de façon corrélée à un mauvais pronostic de survie 	(Peinado et al., 2008; Saito et al., 1997)
LOXL3	<ul style="list-style-type: none"> - Exprimée dans le système nerveux central et le cerveau, mais aussi dans les leucocytes, la peau et le cartilage des tissus embryonnaires - Sa surexpression favorise la transition épithélio-mésenchymateuse 	(Molnar et al., 2003; Peinado et al., 2008)
LOXL4	<ul style="list-style-type: none"> - Exprimée dans le muscle squelettique, le pancréas et les testicules 	(Asuncion et al., 2001; Mäki et al., 2001)

Les molécules de tropoélastine réticulées vont alors se déposer sur les microfibrilles (FIGURE 14.4) qui forment une charpente pour leur dépôt et leur alignement.

Les microfibrilles associées à l'élastine sont creuses et ont un diamètre compris entre 6 et 18 nm, elles sont donc plus grosses que les microfibrilles de collagène (de 8 à 10 nm). Leur coupe longitudinale en microscopie électronique les montre en collier de perles (FIGURE 17) (Pasquali-Ronchetti and Bacarani-Contrì, 1997).

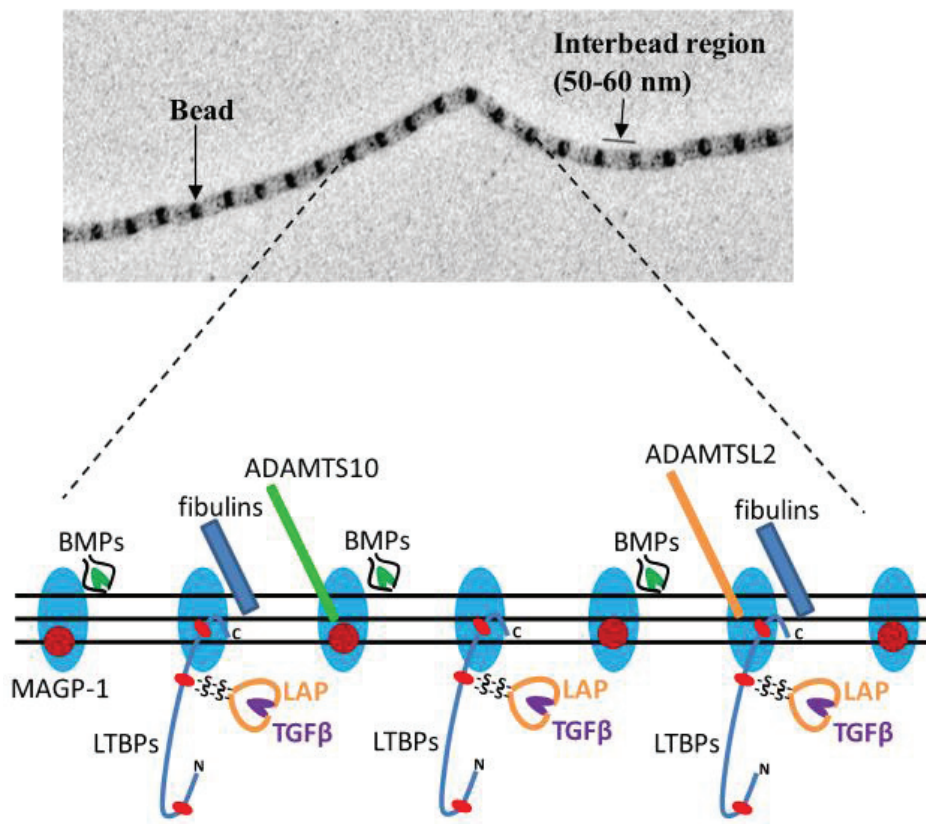


Figure 16: modèle d'organisation des microfibrilles, structure et interactions **PANEL DU HAUT :** Microfibrilles vues en microscopie électronique, il est possible de voir une périodicité de 50-60nm. **PANEL DU BAS :** L'organisation moléculaire précise reste à déterminer, cependant elles possèdent des sites de fixation pour certaines protéines de la MEC comme les fibulines ou les MAGP. C'est aussi un lieu de stockage du TGFβ via la formation de ponts disulfure entre la protéine LAP et la protéine LTBP (Jensen et al., 2012).

Certaines molécules sont localisées à la surface des microfibrilles d'élastine et d'autres se trouvent à l'interface cellules-fibres élastiques. Le calcium joue un rôle clef dans la formation et l'organisation des microfibrilles.

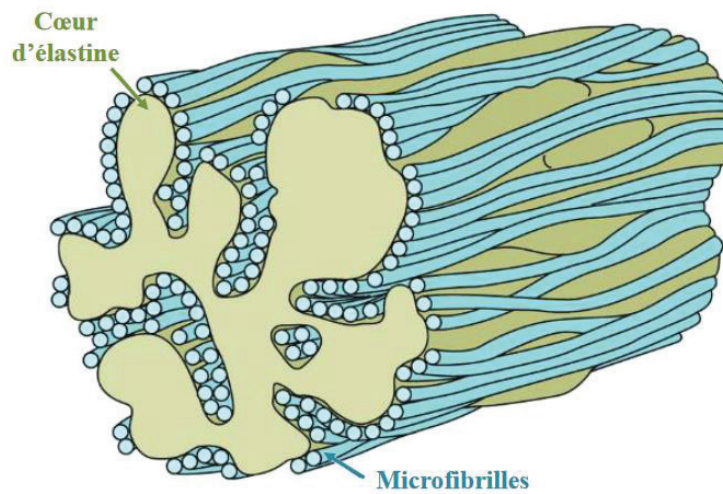


Figure 17 : Représentation d'une fibre élastique mature composée d'un cœur d'élastine insoluble réticulé entoure des microfibrilles (Leslie P.Gartner, James L.Hiatt, Chapter 4 Color Text Book Of Histology 3rd Ed 2007)

On parle de fibres élastiques matures pour l'assemblage du cœur amorphe composé de tropoélastine et des microfibrilles (*FIGURE 14 ET 17*). L'élastogénèse met en jeu un grand nombre de molécules dont:

- Les Fibrillines qui représentent la colonne vertébrale des fibres élastiques (Keene et al., 1991). Ce sont des glycoprotéines riches en cystéine, avec 56 répétitions de séquences riches en cystéine. Dans la peau on retrouve principalement la fibrilline-1, de même que dans les tissus où les fibres élastiques sont linéaires (Pereira et al., 1997). Les monomères de fibrilline s'assemblent dans les microfibrilles selon un motif anti parallèle, via les résidus de cystéine libres.
- Les MAGP (pour Microfibrilles associated glycoprotein) sont présentes au niveau de la structure perlée des microfibrilles
 - o MAGP1 ou MFAP2 (Microfibrillar associated protein) est importante pour assurer l'intégrité structurale des microfibrilles (Segade et al., 2002). Cette glycoprotéine

très acide dont la partie N-terminale riche en proline contient un groupe de résidus glutamine qui se lie à la partie C-terminale de la tropoélastine et à la fibrilline selon un mécanisme dépendant du calcium. La MAGP1 et la tropoélastine sont liées de façon covalente par la transglutaminase. Il semble donc que la MAGP1 intervienne comme protéine de liaison entre les microfibrilles et l'élastine dans les étapes tardives de l'élastogénèse et serve à lier et aligner la tropoélastine au niveau des microfibrilles lors de sa réticulation (Jensen et al., 2001).

- MAGP2, est aussi retrouvée dans les microfibrilles non associées à l'élastine. Riche en sérine et thréonine elle contient un motif qui se lie à l'intégrine $\alpha 5\beta 3$. Cela montre son rôle dans la signalisation cellulaire durant l'assemblage des microfibrilles. La MAGP2 interagit aussi avec la fibrilline-1 pour renforcer la structure des microfibrilles. Elle peut stimuler l'assemblage des fibres élastiques, probablement en ciblant l'élastine sur les microfibrilles (Lemaire et al., 2007).
- Les MFAP : 1&3 et 4, co-localisent avec les fibres élastiques dans la peau
 - Les MFAP -1 et -3 étant peu étudiées, les données les concernant sont peu nombreuses
 - MFPA 4 est considérée comme l'homologue humain de la protéine MAGP-36 de la souris (36-kDa microfibril-associated glycoprotein). Chez la souris, la MAGP-36 co-localise avec les microfibrilles d'élastine. Chez l'homme, la protéine MFAP4 est retrouvée exprimée dans de nombreux tissus élastiques, tels que l'aorte (Wulf-Johansson et al., 2013), la peau (Toyoshima et al., 1999) et les poumons (Schlosser et al., 2006). Il semblerait que MFAP4 soit impliquée dans l'assemblage et le maintien du tissu élastique (Pilecki et al., 2016). Elle interagit avec la fibrilline 1 et guide l'assemblage et l'organisation des microfibrilles. Elle contribue

au maintien des autres protéines de la MEC comme le collagène de type I par exemple (Wulf-Johansson et al., 2013).

- Décorine & Biglycan : ces deux petits protéoglycanes riches en leucines lient les fibres élastiques à la MEC environnante (Kielty et al., 2002). Le biglycan est localisé dans le cœur d'élastine et forme un complexe avec la tropoélastine et la MAGP1 ; alors que la décorine est localisée au niveau des microfibrilles.
- Les Fibuline 1 2 5 :
 - La Fibuline-1 localisée dans le cœur amorphe des fibres élastiques, n'est pas retrouvée au niveau des microfibrilles du tissu élastique de la peau
 - les Fibuline-2 et -5 sont localisées à l'interface entre les microfibrilles et le cœur d'élastine. La fibuline 5 est très présente au niveau de la peau, de l'aorte et de l'utérus. Elle est localisée à la surface des fibres élastiques, elle permet de lier les fibres élastiques aux cellules adjacentes via les intégrines de surface cellulaire (Yanagisawa et al., 2009).
- Les Emilines (pour Elastin microfibril interface located protein) : il existe 4 isoformes d'émiline (émiline-1, -2, -3 et -4), elles sont observées principalement dans les zones d'interface entre les microfibrilles et l'élastine. A l'heure actuelle, seule l'émiline-1 a été décrite comme associée à la formation des fibres élastiques (Zanetti et al., 2004).
- Les protéines de la famille « latent TGF-β-binding proteins » (LTBP) : sont des glycoprotéines extracellulaires qui présentent des similitudes avec les fibrillines. Elles ont la particularité de réguler la disponibilité du TGF-β via sa fixation. Il existe 4 isoformes mais seule la LTBP-1 est un composant des microfibrilles. Lorsque le TGF-β n'est pas capté par les LTBP, il est libre d'aller activer son récepteur (*FIGURE 18*), déclenchant une cascade de signalisation via les protéines Smad2/3 ce qui aboutit à terme à l'induction de la synthèse d'élastine (Akhurst and Hata, 2012; Charbonneau et al., 2004).

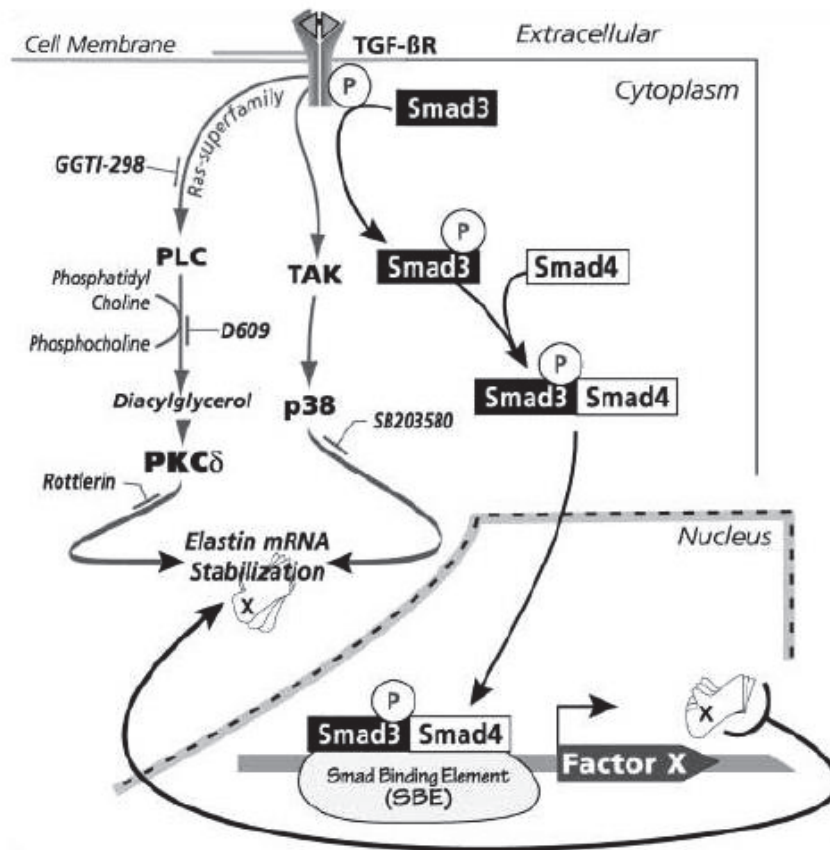


Figure 18: voie de signalisation du TGFβ conduisant à l'induction de la transcription du gène codant pour la tropoélastine (Kucich et al., 2002)

Tous ces acteurs sont indispensables au bon déroulement de l'élastogénèse et leur absence ou une simple mutation sur une de ces protéines, impact l'assemblage des fibres élastiques à l'origine de pathologies graves dont certaines sont listées dans le *TABLEAU 4* ci-dessous.

Tableau 4: Liste non exhaustive des pathologies liées à une mutation sur une protéine des fibres élastiques (Kielty, 2006; Milewicz et al., 2000; Uitto, 1979)

Pathologie	Gène affecté	Observations cliniques	Phénotype moléculaire
<i>Cutis Laxa (récessif ; dominant ou acquis)</i>	Elastine	Peau lâche, pendante et en quantité excessive Pathologie de l'aorte	Dégénération des fibres élastiques du derme et du tissu conjonctif lié à un déficit en élastine au sein des fibres élastiques Inflammation du derme
<i>Syndrome de Williams Beuren</i>	Elastine	Pathologie vasculaire obstructive	Déposition diminuée d'élastine dans les parois artérielles
<i>Syndrome d'Ehlers Denlos</i>	Collagène de type V	Peau hyperextensible et fragile Hyperlaxité articulaire	Diminution de la réticulation du collagène et de l'élastine par les LOX
<i>Syndrome de Marfan</i>	Fibrilline 1	Pathologie vasculaire (anévrisme et dissection de l'aorte)	Fibrilline 1 altérée incorporée dans les fibres élastiques Augmentation des signaux de la voie TGFβ
<i>Syndrome de Loeys Dietz</i>	TFGβ récepteur de type II	Pathologies vasculaires très sévères, dont une prédisposition familiale à l'anévrisme de l'aorte thoracique	Augmentation de la voie TGFβ Augmentation de l'expression de collagène
<i>Pseudoxanthoma elasticum</i>	ABCC9 (adenosine triphosphate binding cassette gene subfamily C6)	Lésions dermiques oculaires et cardiovasculaires	Accumulation de fibres élastiques irrégulières fragmentées et calcifiées

Après avoir détaillé la structure de la peau et particulièrement les cellules souches épidermiques, les mécanismes d'adhésion de l'épiderme au derme, ainsi que la composition en collagènes et fibres élastiques du derme, nous allons maintenant concentrer notre exposé sur le vieillissement cutané, ses mécanismes et les effets macro/microscopiques et biochimiques observables lorsque la peau vieillie.

II. LE VIEILLISSEMENT CUTANE

Globalement, le vieillissement peut-être décrit comme une perte de l'intégrité physiologique conduisant à une vulnérabilité accrue face à la maladie ou la mort. Il est réglé principalement par la génétique mais aussi par des processus biologiques qui persistent avec l'évolution. Tous les tissus et organes sont soumis au même régime. Mais la peau en surface, visible et exposée aux agressions de l'environnement extérieur qui viennent aggraver le vieillissement, est le reflet précoce de ses effets. C'est pourquoi, la peau est le tissu idéal pour décortiquer les mécanismes qui régissent le vieillissement. Qui plus est, l'apparence et le vieillissement ont un fort impact social, ce qui explique l'engouement des chercheurs fondamentaux, pharmaceutiques et cosmétiques pour cette thématique.

A. LES MECANISMES DU VIEILLISSEMENT

Le vieillissement de la peau est considéré comme la résultante du vieillissement intrinsèque et extrinsèque.

Le **vieillissement intrinsèque**, chronologique ou génétique, est défini par les modifications observables avec « le temps qui passe » pour un individu donné. Le **vieillissement extrinsèque** aussi appelé photovieillissement est lié aux agressions extérieures, telles que l'exposition aux UV, le plus fréquent, au tabac ou à la pollution atmosphérique.

1. LE VIEILLISSEMENT INTRINSEQUE

N'étant pas tous égaux d'un point de vue de la génétique, il existe de grandes variations interindividuelles en réaction au temps qui passe. Cependant, le vieillissement intrinsèque reste la résultante de l'accumulation de dysfonctionnements intimement liés les uns aux autres.

La *FIGURE 19* synthétise les différentes causes induisant le vieillissement cellulaire. Dans un souci de clarté et de synthèse toutes les causes ne seront pas détaillées

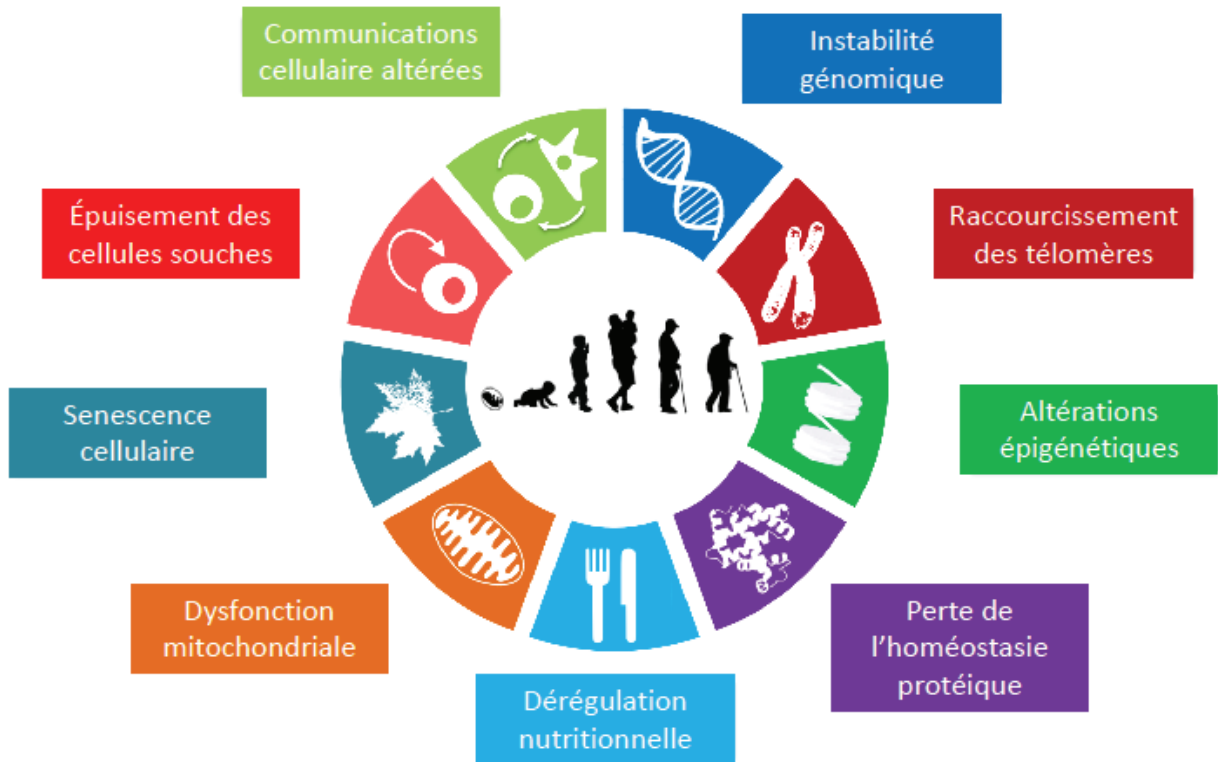


Figure 19: représentation des causes du vieillissement cellulaire (traduit de (López-Otín et al., 2013))

La première cause du vieillissement intrinsèque est **l'instabilité génétique**. Au cours de la vie et lors des divisions cellulaires, les cellules accumulent des dommages génétiques (Moskalev et al., 2013). L'intégrité et donc la stabilité de l'ADN sont conditionnés par l'absence d'erreur de réplication. Lorsqu'elles surviennent, ces anomalies de réplifications peuvent induire l'apparition de dommages de l'ADN génomique et mitochondrial qui doivent être réparés par la cellule pour en assurer la pérennité. En cas de dommage de l'ADN, il existe plusieurs systèmes enzymatiques pour réparer les mutations spontanées générées (López-Otín et al., 2013). Lorsque les dommages touchent des gènes essentiels cela peut conduire à une cellule non fonctionnelle. Elle sera par la suite éliminée par les systèmes de sénescence et d'apoptose. Toutefois, à terme, ce mécanisme d'élimination cellulaire peut déséquilibrer l'homéostasie des tissus. L'ADN mitochondrial, est quant à lui particulièrement exposé au stress oxydatif et est de par sa

structure (absence d'histones) et des systèmes de réparation peu efficaces, particulièrement sensible à l'instabilité génomique (Kazak et al., 2012)

Plusieurs systèmes enzymatiques coopèrent pour réparer les mutations spontanées générées par l'organisme ou induites par des agressions extérieures : les systèmes « fidèles » et les systèmes « non fidèles ». Les systèmes de réparation dits « fidèles » permettent la restitution complète et fiable de l'ADN lésé. Les systèmes de réparation « non fidèles » permettent la survie de la cellule au prix d'une perte d'information génique.

Avec l'âge, la fonctionnalité des mitochondries est compromise. Cela résulte en une augmentation de la **production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO)**, qui sont chimiquement instables et toxiques. La chaîne respiratoire, localisée dans la membrane mitochondriale interne est le siège de la production d'énergie cellulaire par la phosphorylation oxydative. Si l'oxygène est indispensable à la vie de la cellule, il est aussi délétère : c'est le paradoxe de la vie aérobie (Davies, 1995). La production de ERO est physiologique et nécessaire à la signalisation cellulaire et la régulation de gènes au cours de processus tel que l'inflammation ou la balance prolifération/apoptose (Finkel, 2003).

Chaque ERO présente une réactivité différente (*FIGURE 20*), mais tous sont responsables de l'oxydation des lipides, des protéines cellulaires, ainsi que l'ADN génomique et mitochondrial (Sohal and Orr, 2012) :

- l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ est formé directement par la réduction de l' O_2 par les NADPH oxydase au sein de la chaîne respiratoire, il est modérément réactif et rapidement métabolisé en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .
- Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est produit par la dismutation de $O_2^{\bullet-}$ par les superoxydes dismutases (SOD), et est relativement stable. Lorsque H_2O_2 n'est pas métabolisé par les systèmes antioxydants cellulaires, il peut générer le radical hydroxyl l' OH^{\bullet} par la réaction de Fenton.
- Le radical hydroxyl HO^{\bullet} , très instable, est hautement réactif et cause différents dommages cellulaires à proximité de son lieu de production. Il agit

via 3 mécanismes : arrachement d'un électron, arrachement d'un atome d'hydrogène sur un radical RH, ou addition sur une liaison double.

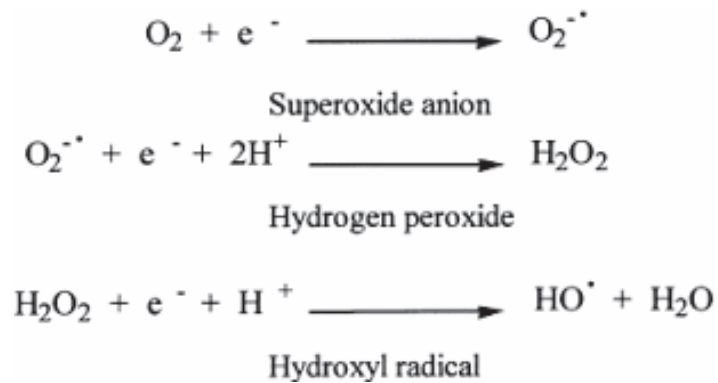


Figure 20 : réactions chimiques produisant les radicaux libres : 1. Formation de l'anion super oxyde ; 2. Formation du peroxyde d'hydrogène ; 3. Réaction de fenton qui donne de radical hydroxyle

Le stress oxydatif est défini comme une altération de l'équilibre entre la production de systèmes oxydants et les capacités de la cellule de s'en protéger.

Au cours du vieillissement, le stress oxydatif résulte d'une part d'une production de radicaux libres augmentée au sein des mitochondries et d'une accumulation de molécules oxydées qui n'ont pas été éliminées; et d'autre part d'une diminution de l'efficacité des systèmes de protection (protéines chaperones, protéasomes et enzymes d'oxydo-réductions diminuées).

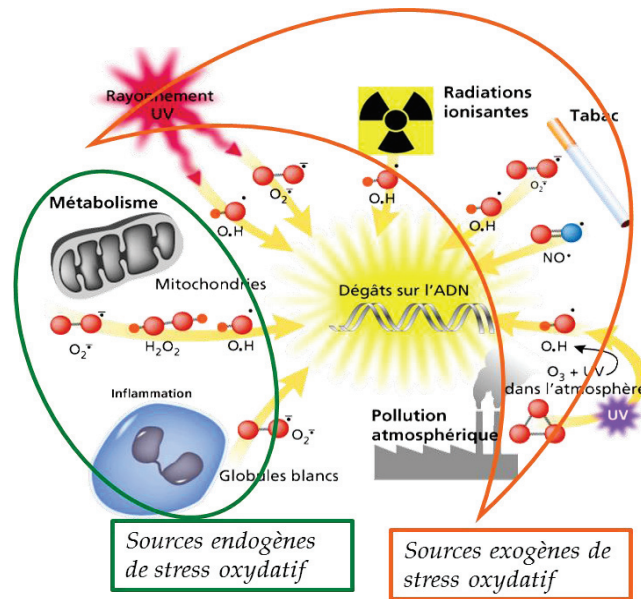


Figure 21: Les différentes origines du stress oxydatif et des radicaux libres

Il est possible de classifier les sources à l'origine de stress oxydatif dans la cellule via la production de ERO :

- De nature endogène à l'organisme : production par la chaîne respiratoire mitochondriale et par les cellules immunitaires lors de la destruction d'agents pathogènes.
- De nature exogène à l'organisme: due à des rayonnements ionisants, l'exposition aux UV, la pollution, le tabac.

L'organisme se protège de ce stress oxydatif par plusieurs systèmes antioxydants :

- Les enzymes antioxydantes dont les superoxydes dismutase (SOD), les catalases, la glutathion peroxydase (GPX) sont les plus efficaces et seront détaillées *CHAPITRE 3 DE L'INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE*.
- Les vitamines type A (rétinol), C (acide ascorbique), E (α -tocophérol), mais aussi les caroténoïdes, les polyphénols ou le cytochrome C. Certains éléments traces sont considérés comme antioxydant car ils sont des cofacteurs indispensables à l'activité des enzymes antioxydantes, comme par exemple le sélénium pour la GPX.

Enfin, à chaque division cellulaire, il y a un **raccourcissement des télomères** c'est à dire des régions situés aux extrémités chromosomiques. Les télomères sont des répétitions des séquences TTAGGG associés à des protéines spécifiques répliqués par la télomérase durant la vie embryonnaire, dont le rôle est de protéger le chromosome contre les dommages et les fusions inter-chromosomiques. De ce fait, dès la naissance, à chaque division cellulaire une partie du chromosome n'est pas répliqué, ce qui conduit à sa réduction progressive. Les télomères sont considérés comme l'horloge biologique de la cellule. Dès lors que le télomère atteint une taille minimale dite critique, le cycle cellulaire s'arrête et la cellule entre en sénescence répllicative. Les cellules germinales sont épargnées par ce phénomène car elles possèdent une activité télomérase.

Les télomères sont donc impliqués dans le processus de vieillissement, il a été montré que la longueur des télomères est inversement proportionnelle à l'âge du donneur (Allsopp et al., 1992). A la suite de cela, des travaux ont montrés que l'introduction de la télomérase dans des cellules qui en étaient dépourvues restaurait la longévité des cellules (Bodnar et al., 1998) et que l'absence de télomérase dans un modèle murin conduit à une diminution de la durée de vie au cours des générations (Herrera et al., 1999). Depuis, de nombreux autres travaux ont permis de prouver le lien existant entre le raccourcissement des télomères et l'installation du vieillissement dans l'organisme (Armanios et al., 2009; Jaskelioff et al., 2011).

La **senescence cellulaire** est définie comme l'arrêt stable du cycle cellulaire associé à des modifications morphologiques de la cellule (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Ce phénomène a été initialement décrit par Leonard Hayflick et Paul Moorhead en 1961, lorsqu'ils ont découvert que des fibroblastes humains présentaient une capacité de division limitée à environ 50 doublements de population cumulé (CPD) une fois mis en culture (Hayflick and Moorhead, 1961). On parle de « sénescence répllicative » lors de l'arrêt du cycle cellulaire lié au raccourcissement des télomères. La sénescence cellulaire et la sénescence répllicative sont morphologiquement et biochimiquement semblables.

Parmi les signaux inducteurs de senescence cellulaire, il est possible de retrouver les rayonnements UV et gamma (Shaulian et al., 2000; Webley et al., 2000), le stress oxydatif ou

l'activation d'oncogènes. Avec l'érosion des télomères, ces modifications au sein de la cellule sont considérés comme un signal de dommage de l'ADN ce qui active la voie de réponse aux dommages de l'ADN conduisant à terme à l'arrêt du cycle cellulaire via l'activation des voies de signalisation p53/p21WAF1 et p16INK4a/pRb.

L'induction de p21WAF1 inhibe les protéines régulatrices principales du cycle cellulaire, les CDK (kinases dépendantes des cyclines), qui empêchent la phosphorylation de pRb (protéine du rétinoblastome) et le relargage des facteurs de transcription E2F : il y a arrêt du cycle cellulaire. (FIGURE 22). La seconde voie de signalisation passe par p16INK4a qui inhibe les CDK4 et CDK6, bloquant également l'activation de pRb (FIGURE 22).

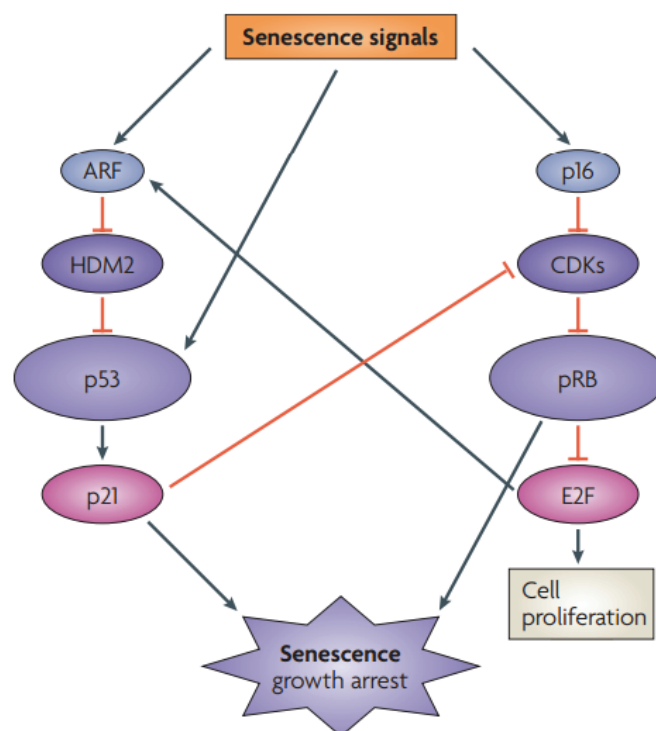


Figure 22: mécanismes moléculaires conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007)

Les deux p21WAF1 et p16INK4a peuvent induire la sénescence. Les niveaux d'expression de p21WAF1 augmentent dans les cellules pré-sénescents avant la surexpression de p16INK4a,

p21WAF1 déclenche probablement la sénescence avant p16INK4a. En revanche, p16INK4a reste surexprimé dans les cellules sénescents alors que les niveaux de p21WAF1 diminuent, ce qui fait de p16INK4a un bon marqueur pour identifier des cellules sénescents (Ressler et al., 2006; Waaijer et al., 2012).

L'entrée en sénescence de la cellule induit d'importants changements : un arrêt de la croissance cellulaire, l'augmentation de la taille de la cellule ainsi à des modifications du métabolisme. Les cellules sénescents possèdent une activité l'enzyme β galactosidase augmentée (Dimri et al., 1995), une surexpression de gènes impliqués dans le remodelage de la MEC tels que les MMP-1 et 3 ainsi que des gènes codant pour des cytokines inflammatoires telles que l'interleukine 1 ou 6 (Kuilman et al., 2008).

L'entrée en sénescence des cellules est un mécanisme de protection contre l'accumulation de dommage de l'ADN et l'initiation de la transformation cancéreuse des cellules. Cependant, il est aussi admis que la sénescence contribue de façon importante au vieillissement de l'organisme via la perturbation de l'homéostasie tissulaire et l'augmentation du nombre de cellules qui entrent en sénescence (Dimri et al., 1995; Rodier and Campisi, 2011)

2. VIEILLISSEMENT EXTRINSEQUE, ACTINIQUE OU PHOTOVIEILLISSEMENT

Les sources du vieillissement extrinsèque sont représentées à 80% par les radiations du soleil auxquelles s'ajoutent dans une moindre mesure la pollution atmosphérique, le tabac, le stress, l'alcool et l'alimentation, l'hygiène de vie. Il semblerait que les effets négatifs de ces agents externes passent surtout par la production de radicaux libres.

L'exposition solaire est le facteur majeur responsable de l'accélération du vieillissement cutané. Cependant, ses effets sont dépendants de l'intensité du rayonnement, la durée et la fréquence d'exposition ainsi que des conditions de cette exposition et de la nature des UV (FIGURE 23).

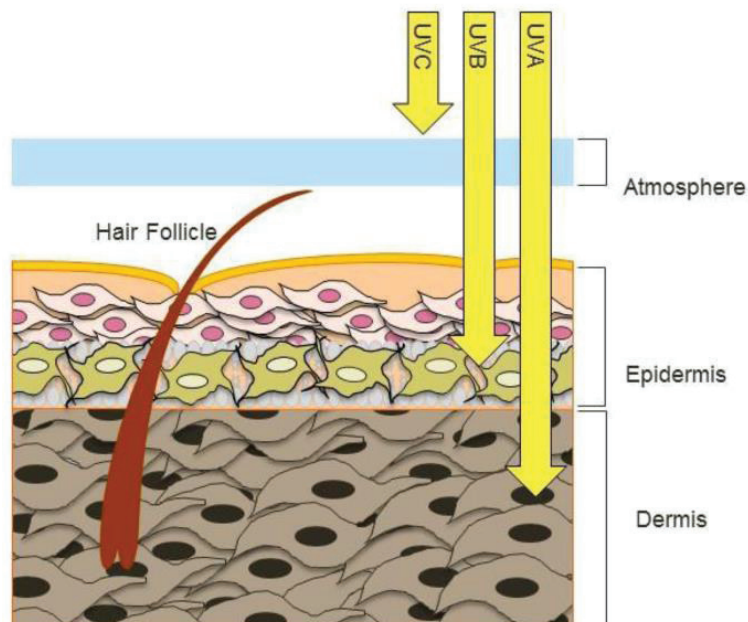


Figure 23: degré de pénétration des UV dans les différentes couches de la peau (D'Orazio et al., 2013)

- ❖ **les UVB (290-320 nm)** : beaucoup plus énergétiques que les UVA ils sont pour autant moins pénétrants dans le derme profond. Dans l'épiderme, ils induisent des dommages à l'ADN via entre autres la formation de dimères de pyrimidine, ce qui peut conduire lors de surexposition à l'initiation d'une carcinogénèse ou à la mort cellulaire (Battie et al., 2014).

- ❖ **les UVA (320-400 nm)**, moins puissants, peuvent pénétrer jusqu'au derme où ils induisent de nombreuses altérations. Les UVA altèrent aussi les molécules d'ADN via une augmentation de production de radicaux libres et donc induisant des lésions type 8-oxo-deoxyguanosine mais aussi en créant des lésions de type dimère de thymine. (Cadet et al., 2015; D'Orazio et al., 2013)

Sous l'effet des UV, le facteur de transcription AP-1 est ainsi activé, ce qui conduit à l'activation de la transcription des gènes MMP1, MMP3 et MMP9 (Fisher and Voorhees, 1998) tout en inhibant la transcription du pro collagène de type 1 (Rittié and Fisher, 2002). Il en résulte une destruction de la MEC et plus spécifiquement du collagène de type I, II et III par la MMP1 et la MMP3 ainsi que du collagène de type IV par la MMP9.

En ce qui concerne l'élastine, l'accumulation de matériel élastique anormal, phénomène responsable de l'élastose solaire (*DETAILLEE SECTION SUIVANTE*), est une des principales altérations de la peau lors du photovieillissement.

B. LES MANIFESTATIONS DU VIEILLISSEMENT DE LA PEAU

Le vieillissement touche des molécules impliquées dans la signalisation cellulaire, la transcription et l'intégrité cellulaire. Il est difficile d'établir clairement que ces changements sont la cause ou la conséquence du vieillissement.

Il semblerait que, *in vivo*, les cellules devenant sénescentes avec les années qui passent, elles s'accumulent dans les tissus et seraient à l'origine du déclin de l'intégrité et de la fonction de la peau. En devenant sénescentes, les cellules sécrètent des cytokines, enzymes ou facteurs de croissance, induisant des modifications tissulaires, on parle d'un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP senescence-associated secretory phenotype). La cellule devient alors incapable de contrôler son microenvironnement et il peut y avoir induction carcinogène ou inflammatoire. Parmi les molécules sécrétées, on retrouve entre autre le facteur de transcription NF- κ B, l'IL-1 β et CCN1 (angiogenic inducer protein 61 (CYR61)) (Campisi, 1998; Rodier and Campisi, 2011; Tigges et al., 2014).

Nous concentrons ici notre exposé à la description des manifestations du vieillissement touchant les 3 compartiments de la peau détaillés ici (épiderme, JDE et Derme) ainsi que les deux types cellulaires principaux (kératinocytes et fibroblastes) (FIGURE 24).

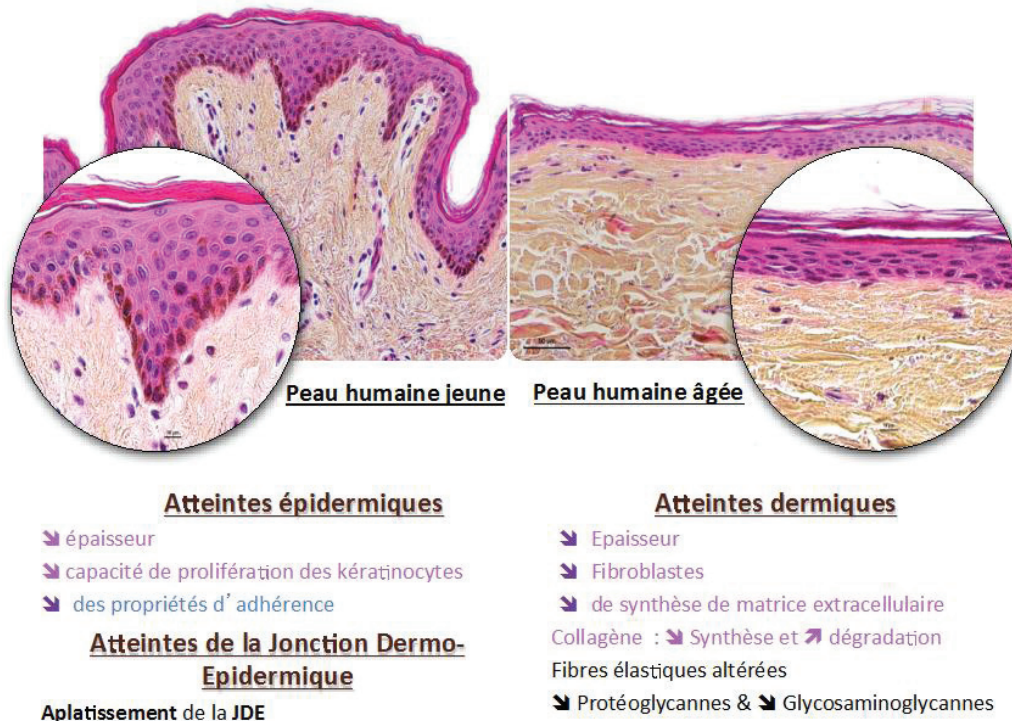


Figure 24: différences histologiques observées au cours du vieillissement cutané (Illustration : thèse de doctorat de Morgan Dos Santos – LSC)

1. ATTEINTE DES KERATINOCYTES ET DE L'EPIDERME

Kératinocytes : Il existe une relation inverse entre la durée de vie et le nombre de doublements de kératinocytes et l'âge du donneur. Ainsi les kératinocytes néonataux ont un doublement de population de 50 alors que les kératinocytes adultes de 30. Le CFE est aussi impacté passant de 10% pour les kératinocytes jeunes à 0.01% pour les kératinocytes adultes. (Rheinwald and Green, 1975).

Le vieillissement induit des altérations multiples de l'épiderme se traduisant notamment par une diminution de l'épaisseur totale de l'épiderme sans toucher l'épaisseur de la couche

cornée. Cette atrophie est liée à l'accumulation de kératinocytes sénescents ainsi qu'à la perte progressive des ondulations au niveau de la JDE (Mestre-Deharo and Sayag, 1991).

De la couche la plus externe à la couche basale, on pourra observer que :

- Le stratum corneum ainsi que les cornéocytes ne présentent pas d'altérations morphologiques avec l'âge mais le profil lipidique modifié conduit à une diminution de la fonction barrière. Les lipides, organisés en bicouche lamellaire ont pour propriété de former une barrière hydrophobe limitant la perte de molécules d'eau. Lorsque la quantité de lipide diminue, l'hydratation de la peau diminue aussi conduisant à la sécheresse de la peau. (Saint Leger et al., 1988).
- Les couches suprabasales de l'épiderme ne subissent pas d'altérations morphologiques évidentes à l'exception du nombre de couches diminuée.

Enfin, les kératinocytes de la couche basale, non seulement perdent leur aspect palissadique, mais présentent une disparité et une hétérogénéité de taille et de forme avec notamment l'apparition de kératinocytes basaux de forme cuboïde. C'est surtout leur capacité de prolifération qui diminue. Il est en particulier démontré que, si le stock de cellules souches épidermiques ne varie pas avec l'âge, les KSC deviennent moins réceptifs aux stimuli provenant du microenvironnement (Giangreco et al., 2008; Zouboulis et al., 2008). D'autre part, les propriétés d'adhésion de l'épiderme au derme diminuent avec l'âge en raison de la diminution de l'expression de l'intégrine $\beta 1$, une des principales protéines impliquées dans l'adhésion des kératinocytes basaux à la lame basale sous-jacente. (Varlet et al., 1998)

2. ALTERATION DE LA JONCTION DERMO EPIDERMIQUE

D'un point de vue histologique, c'est à la JDE que le vieillissement de la peau est le plus visible. En microscopie optique et électronique, il est possible de voir un aplatissement de la JDE, une nette diminution des papilles dermiques et une duplication de la *lamina densa* (Hull and Warfel, 1983; Naylor et al., 2011). La diminution des papilles dermiques entraîne une baisse de la surface d'échange ainsi qu'une baisse de la surface d'ancrage de l'épiderme au derme.

Ces anomalies résultent de plusieurs processus moléculaire et cellulaires :

- La diminution des densités cellulaires avoisinantes (fibroblastes du derme papillaire et kératinocytes) et des modifications moléculaires de la MEC du derme sous-jacent.
- L'augmentation de l'activité des métalloprotéinases qui dégradent les constituants de la JDE (Amano, 2009).
- La diminution puis la disparition des fibres oxytalanes et élaunines, principales constituants des papilles dermiques, qui entraînent l'aplatissement de la JDE.
- La diminution drastique du collagène de type VII.

3. ATTEINTES DES FIBROBLASTES ET DU DERME

Le vieillissement a un impact aussi bien sur la composante cellulaire que sur la MEC du derme.

a) Fibroblastes

Le nombre de fibroblastes diminue avec l'âge (Uitto, 2008). Comme nous l'avons vu il existe différentes populations de fibroblastes. *In vitro*, les fibroblastes papillaires prolifèrent plus rapidement et ont aussi une espérance de vie en culture plus longue que les fibroblastes réticulaires, même si ils proviennent du même donneur et de la même zone anatomique. Ces variations peuvent expliquer la diminution du potentiel prolifératif des cellules du derme âgé, via l'augmentation de la proportion de fibroblastes réticulaires au détriment des fibroblastes papillaires (Sorrell and Caplan, 2004).

Ainsi, les fibroblastes fœtaux sont capables de 35 à 63 doublements de population cumulés alors que les fibroblastes adultes ne sont capables que de 14 à 29 doublements (Hayflick and Moorhead, 1961).

Avec les passages, les fibroblastes subissent aussi des changements structuraux : la cellule sénescence a un plus gros noyau, une surface cellulaire altérée avec diminution de leur capacité de synthèse dont celle de la fibronectine (Dimri et al., 1995) d'où une diminution des

interactions cellules-substrat et cellules-cellules. Les fibroblastes sénescents montrent aussi une altération des systèmes de réparation de l'ADN. (Tigges et al., 2014)

Le derme est le siège d'une profonde désorganisation avec le vieillissement. De souple, la matrice extracellulaire apparaît dense, réticulée, rigide donc moins élastique et moins vascularisée. Les changements les plus significatifs sont observés au niveau du derme papillaire. Les principales caractéristiques du derme vieillissant sont des altérations des fibres de collagène et du matériel élastique, ainsi que des modifications du contenu en protéoglycannes (Waller and Maibach, 2006).

b) Les Collagènes

Le vieillissement affecte de manière spécifique la synthèse de collagène de type I et III ainsi que leur proportion (ratio de 6/1 dans une peau jeune versus 3/1 dans une peau âgée) (Lovell et al., 1987). De plus il induit une augmentation de l'activité de certaines enzymes protéolytiques, les MMP-1 ; MMP-2 et MMP-9, impliquées dans la protéolyse des fibres de collagène; ainsi qu'une diminution de l'expression des TIMPs (Tissu Inhibitor Matrix Protease), inhibiteurs de ces enzymes protéolytiques. Cet accroissement relatif de l'activité protéolytique conduit à une diminution globale de l'épaisseur du derme. C'est dans le derme papillaire que la majorité des changements ont lieu. Les fibrilles de collagène deviennent granuleuses et les fibres plus compactes. Elles se dissocient et s'orientent parallèlement à la JDE.

c) Fibres élastiques

Dans l'organisme, à l'abri du soleil, le tissu élastique (TE) est très peu dégradé. Il existe tout de même une faible proportion de dégradation durant la grossesse, la cicatrisation et le vieillissement (Werb et al., 1982). Il est dégradé par les élastases, endopeptidases matricielles qui existent sous 3 formes : les élastases à sérine généralement leucocytaires et pancréatiques ; les élastases à métaux dont font partie les metalloprotéinases matricielles (MMPs) comprenant les MMP-2, -7, -9 et -12 (Berton et al., 2000) ; et enfin les élastases à cystéine parmi lesquelles on retrouve les cathepsines dont l'activité enzymatique dépend d'un pH acide à 5,5-6,5.

La dégradation du TE entraîne la libération de peptides d'élastine (PE) et de chimiokines appelées matrikines (Duca et al., 2004). La libération des PE induit une acidification du microenvironnement qui va activer les élastases et amplifier le phénomène de dégradation. (Antonicelli et al., 2007). En même temps, les matrikines induisent la formation d'un microenvironnement inflammatoire (Fulop et al., 2012) qui active la prolifération des fibroblastes, et amplifie l'activation des élastases. Ces produits de dégradation sont retrouvés dans les liquides biologiques (urine, plasma, lavage broncho-alvéolaire) où ils peuvent être dosés (Faury, 2001). Ils sont retrouvés à forte concentration lors de la dégradation pathologique du TE (Frances and Robert, 1984; Robert et al., 1984) tel que dans les pathologies pulmonaires chroniques avec pour conséquence une fibrose (Maclay et al., 2012; Pierce et al., 1995; Turino et al., 2012); ou cardiovasculaires avec altération des vaisseaux sanguins dont la dissection de l'aorte abdominale (Cattell et al., 1993; Isenburg et al., 2007; Tsamis et al., 2013).

(1) *Elastine & vieillissement chronologique*

Au niveau de la peau, bien que ne représentant que 2 à 4% du volume du derme, le tissu élastique subit des altérations précoces, profondes et irréversibles avec l'âge. Jusqu'à présent il est classiquement admis que le nombre de fibroblastes et leur capacité de synthèse diminue au cours du vieillissement chronologique (Uitto, 2008), avec possible réactivation en condition pathologique telle que la cicatrisation (Foster et al., 1983). Cependant les cicatrices montrent une fibrose avec une MEC désorganisée et non élastique (Cohen et al., 2017; Maquart and Monboisse, 2014). Dans le cas des brûlures graves, la présence d'élastique n'est détectée qu'après 2 ans dans les cicatrices (Raghunath et al., 1996).

C'est lors de la vie *in utero* que la synthèse de tropoélastine est maximale. Chaque individu naît avec son propre capital. Sa demi-vie, estimée à 70 ans, montre que son renouvellement est quasi nul (Frances and Robert, 1984; Sherratt, 2009). À la naissance, les analyses en microscopie électronique à transmission (TEM) montrent les fibres élastiques immatures laissant voir des microfibrilles non complètement recouvertes d'élastine amorphe. Autour de vingt ans, à maturité, celles ci sont complètement recouvertes d'élastine amorphe (Pasquali-Ronchetti and Baccarani-Contrì, 1997). Alors le processus de l'élastogénèse s'arrête (Wagenseil and Mecham,

2007). Ensuite autour de 30-40 ans, bien que la quantité ne diminue pas, les fibres deviennent plus rugueuses, compactes, denses, cassées, et elles se calcifient (FIGURE 25) (Bouissou et al., 1988; Pasquali-Ronchetti and Bacarani-Contrì, 1997; Suwabe et al., 1999) et se chargent en lipides (Robert et al., 2008). D'un point de vue macroscopique, au niveau du derme papillaire les fibres oxytalanes disparaissent progressivement; et au niveau du derme réticulaire, le tissu élastique perd ses microfibrilles externes, puis celles de toute la trame donnant de véritables lacunes au sein des plages amorphes (El-Domyati et al., 2002; TSUJI and HAMADA, 1981).

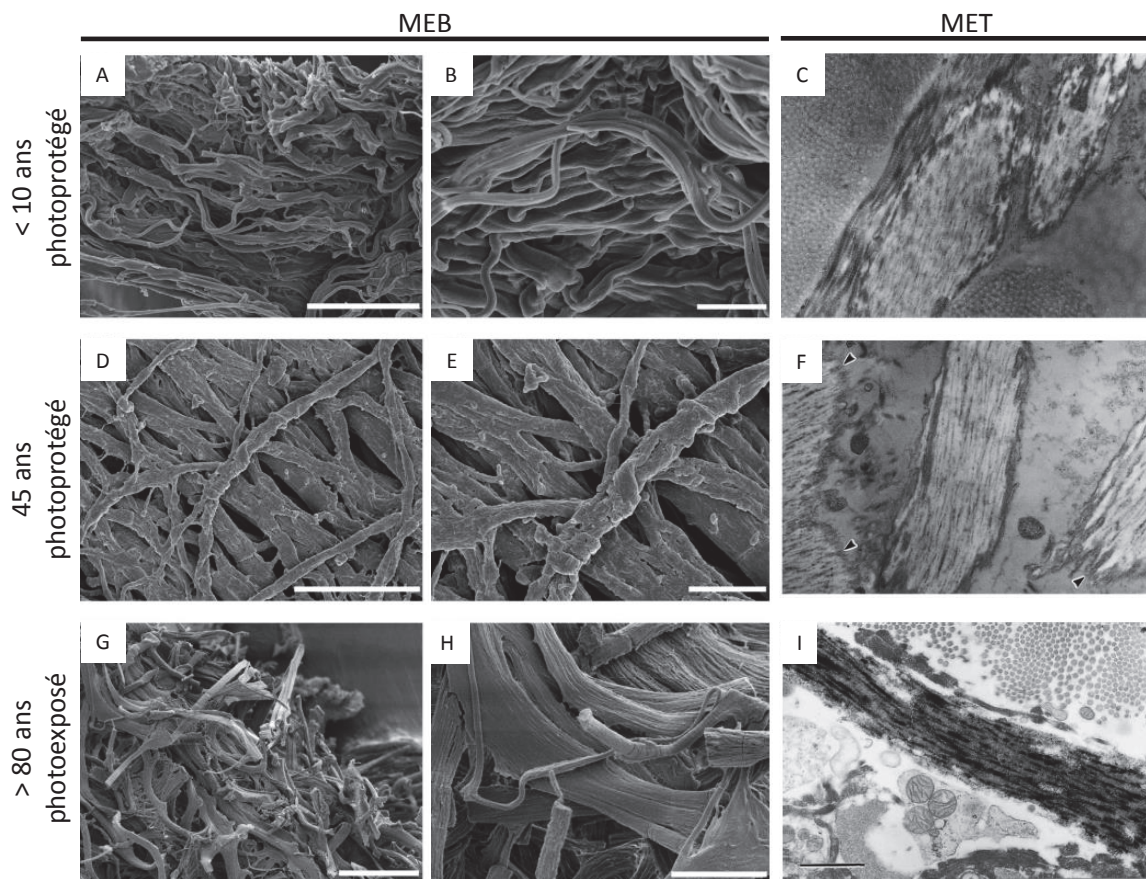


Figure 25 : Visualisation de l'élastine dermique par microscopie électronique à balayage et à transmission chez un individu jeune photoprotégé (<10 ans – A/B/C) ; adulte photoprotégé (45 ans – D/E/F) et âge photoexposé (>80 ans – G/H/I). (Mora Huertas et al., 2016; Suwabe et al., 1999)

De plus, la racémisation spontanée de l'acide L-aspartique de la tropoélastine en son stéréoisomère D conduit à une altération de la structure (Bailey, 2001; Ritz-Timme and Collins, 2002). Mais cette augmentation de la proportion du stéréoisomère D / L est mise à profit pour évaluer l'âge d'un tissu et même dater des momies (Ohtani et al., 2005; Waite et al., 1999). Toutes ces modifications dues au vieillissement changent la structure de la tropoélastine et la rende plus accessible et sensible à l'élastase (Battie et al., 2014; Mora Huertas et al., 2016). Il ne faut pas omettre l'activation de l'élastase par les ERO qui augmentent avec l'âge (Cantor et al., 2006).

L'accumulation de glucose induit des réticulations non enzymatiques sur les résidus lysine et arginine du collagène comme des fibres élastiques en formant des « AGE » (pour Advanced glycosylation end products). Ce phénomène, la glycation, rigidifie les collagènes, et probablement les fibres élastiques (Bailey, 2001; Paul and Bailey, 1996; Robert et al., 2009).

Bien qu'il soit admis que la synthèse d'élastine diminue avec l'âge, les résultats de qPCR ne permettent pas de mettre en évidence de différences significatives avec le vieillissement (Bernstein et al., 1994; Lacroix et al., 2007; Toyoshima et al., 1999). Une des limitations de cette méthode d'analyse est l'absence d'information quant à la réticulation et la formation des fibres matures. Pour approcher la quantification des fibres avec l'âge, l'immunohistologie suivie soit d'une évaluation visuelle de la qualité (organisation des fibres) et de la quantité des fibres élastiques par classification histologique graduelle (Fantasia et al., 2013), soit par mesure du pourcentage d'expression du marqueur recherché (élastine, fibrilline) par rapport à la surface de derme peu être utilisée (Robert et al., 1988; Suwabe et al., 1999). Elle permet de mettre en évidence une diminution entre la naissance (1-20 ans), l'âge adulte (33-56 ans) et l'âge sénior (61-100 ans). Les techniques d'histologie montrent aussi que l'évolution des fibres élastiques dépend non seulement de l'âge, mais aussi de la zone anatomique du prélèvement et l'origine ethnique du donneur (Fantasia et al., 2013; Langton et al., 2014).

Tableau 5: liste non exhaustive des techniques utilisées pour analyser l'élastine dans la peau et son évolution au cours du vieillissement chronologique et photo-induit.

Référence	Technique d'analyse	Paramètre suivi	Type d'échantillon	Résultat
(Hult and Goltz, 1965)	% d'élastine solubilisée/poids sec de peau Lecture colorimétrique en UR	Elastine	PNH <45 ans et > 70 ans	4.16% jeunes versus 9.4 % Pas de différences observées sur histologies
(Robert et al., 1988)	% de surface occupée par les fibres élastiques derme papillaire et réticulaire	Fibres élastiques totale	N= 50 15-75 ans Zone photoprotégée	% de surface augmenté dans le derme superficiel et profond avec l'âge
(Bernstein et al., 1994)	RT qPCR Et immuno marquage	Elastine Fibrilline 1	PNH 49-66 ans n=16 Zone photoprotégée et photo exposée analysée par paire	Avec le photovieillissement Augmentation de 5.3x élastine expression 2.5x fois fibrilline + confirmation histologique
(Suwabe et al., 1999)	% de surface occupée par les fibres élastiques dans le derme papillaire et réticulaire	Fibres élastiques totales	Peau de donneur N=45 Jeune 1-27 ans Adulte 33-56 ans Senior 61-100 ans Zone photoexposée	Diminue dans le papillaire Stable dans le réticulaire
(Hirano et al., 2001)	RT q PCR	Elastine	Fibroblastes en culture (1 ; 17 ; 31 ; 42 ; 48 ; 78 et 86 ans	Pas de différences significatives
(Ritz-Timme et al., 2003)	Racémisation acide aspartique dans biopsie de peau			Augmentation de l'isomère acide D aspartique avec l'âge
(Vicanova et al., 2006)	Échelle semi quantitative sur images d'immunofluorescence	Fibrillin-1 Elastin	PR	Présence dans PR et dépôt augmente avec ajout de principe actif

(Mewes et al., 2007)	RTqPCR et immunofluorescence pour visualisation	Elastine	Peau reconstruite après 21 jours à l'A/L	Diminution quantité ARNm TE Pas de différence significative en histologie
(Lacroix et al., 2007)	RT qPCR Visualisation par immunofluorescence	Elastine Fibrilline 1	Peau reconstruite avec fibroblastes de 19 ans et 49 ans	Pas de différence élastine Diminution fibrilline1
(Rossetti et al., 2011)	RT q PCR	Tropoélastine Fibrilline1	Explants de peau et culture de fibroblastes	Acide rétinolique stimule l'expression d'ARNm de TE et fibrilline1
(Langton et al., 2012)	RT q PCR et immunofluorescence	LTP2 &3 LOXL1	Biopsie de peau Zone photoprotégée N= 18 2 classes « jeune » 18-29 ans et « âgée » 65-75 ans	Augmentation LTP2 et LOXL1 Pas de différence pour LTP3
(Fantasia et al., 2013)	Evaluation histologique RT q PCR	Elastine	Peau caucasienne et africaine Fibroblastes dérivés de ces peaux 35-45 ans Zone photoexposée et photoprotégée	Peau caucasienne : Diminution élastine dans les zones photoexposées non retrouvé dans la peau africaine TGFβ stimule la synthèse d'élastine (ARNm augmenté) dans les cultures de fibroblastes
(Langton et al., 2014)	% d'occupation du derme sur images d'immuno histo chimie	Elastine Fibrilline Fibuline5	PNH 18- 30ans	Comparaison ethniques
(Czekalla et al., 2017)	Microscopie <i>in vivo</i> de seconde harmonique Mesure de l'auto fluorescence du derme			L'index collagène/élastine diminue avec l'âge qui augmente

(2) *Fibres élastiques et photovieillissement*

Si peu de données concernent le vieillissement chronologique, les recherches sur le vieillissement photo induit ont été motivées du fait de son incidence sur l'initiation des cancers cutanés.

Pour résumer, les UV induisent une altération du derme et particulièrement du tissu élastique. La richesse en acides aminés chromophores (Cysteine, Histidine Phenylalanine, Tyrosine et Tryptophane) spécialement de la fibrilline, des fibulines, des LTBP ainsi que des LOX qui en possèdent autour de 20% en font des composés particulièrement sensibles à la dégradation par les UV (Sherratt et al., 2010). De plus, l'exposition aux UV entraîne aussi l'activation des MMP-2,-3,-9,-12 et -13, dégradant la MEC et spécifiquement la fibrilline 1 et la fibuline 5. S'ajoute à cela toutes les modifications du microenvironnement qui ont été décrites précédemment et qui amplifient dégradation.

Par ailleurs, nous avons vu que le gène codant pour la tropoélastine est soumis à un épissage alternatif dont un des isoformes, le 26A provient d'un épissage alternatif régulé spécifiquement par les radiations UV ou par une exposition à des températures élevées. Cela a été confirmé par l'analyse des ARNm de l'isoforme 26A dans la peau de donneur prélevée sur une zone photo exposée ou non (Chen et al., 2009). Cet isoforme comprend une séquence supplémentaire comprenant 33 acides aminés, appelé exon 26A (*FIGURE 26*).

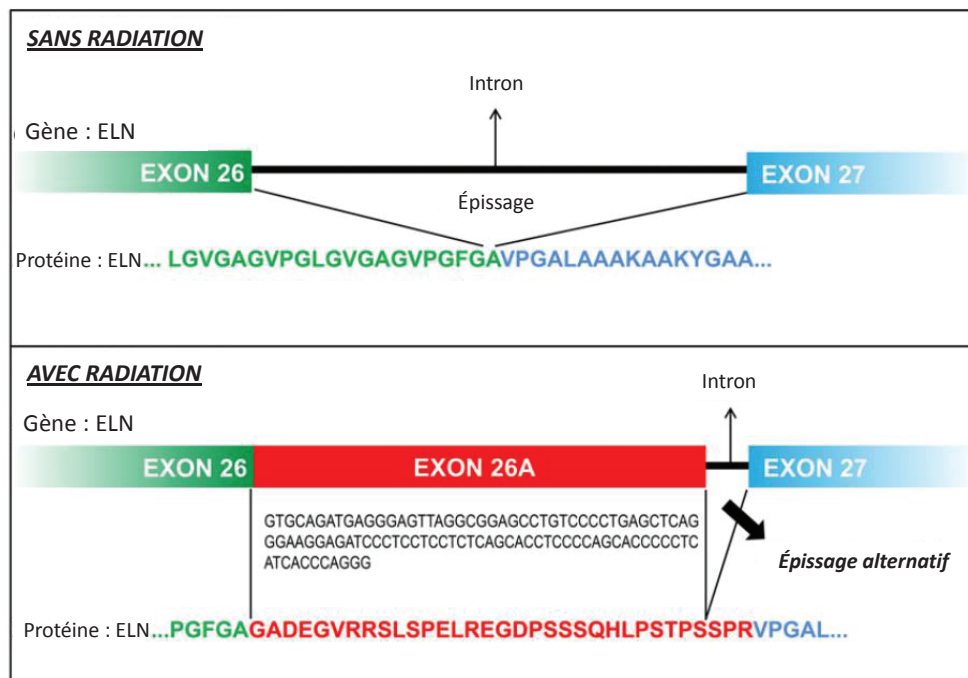


Figure 26: épissage alternatif de la tropoélastine en présence ou absence de radiation UV – traduit de (Weihermann et al., 2017)

OR, C--et isoforme 26A ne peut être réticulé par les LOX et les fibres élastiques non fonctionnelles produites s'accumulent dans le derme sous forme **d'élastose solaire** (Bedell-Hogan et al., 1993; Chen et al., 2009). Le lysozyme a été détecté dans les fibres élastiques d'une peau présentant une élastose solaire, un pseudoxanthoma elasticum, mais pas dans les fibres élastiques d'une peau native (Albrecht et al., 1991; Mera et al., 1987). Ce dépôt de lysozyme sur les fibres élastiques fragmentées par les UV entraîne l'inhibition de la dégradation par l'élastase et donc son accumulation par absence de recyclage (Seite et al., 2006; Suwabe et al., 1999). Bien que peu étudiés, les autres acteurs de l'élastogénèse peuvent être dérégulés avec le vieillissement. Ainsi, la synthèse de la fibrilline 1 et des fibulines 2 et 5 diminue au cours de la vie, mais elles ont tendance à s'accumuler avec le photovieillissement (Ashworth et al., 1999; Hunzelmann et al., 2001; Kadoya et al., 2005). Les microfibrilles associated glycoprotéines, et

particulièrement la MAGP-1 est diminuée dans le derme avec l'âge et le photo vieillissement (Zheng et al., 2013).

Le vieillissement cutané est donc complexe, et au cœur de la préoccupation d'une grande partie des chercheurs en dermo-cosmétique. L'exploration des mécanismes via l'histologie ou la biologie moléculaire sur des biopsies de peau native humaine est une première étape, une étape de référence, mais n'est pas suffisante. Des modèles d'études innovants exposés dans le chapitre suivant sont donc nécessaires.

CHAPITRE N°2

**LES DIFFERENTS MODELES D'ETUDES DU
VIEILLISSEMENT CUTANE**

I. MODELES DE PEAUX RECONSTRUITES EN 3D

La culture des kératinocytes sur couche nourricière de fibroblastes irradiés (Rheinwald and Green, 1975) a permis leur amplification jusqu'alors impossible au-delà de la primo culture. Elle a permis l'essor des techniques pour le traitement des grands brûlés et des plaies chroniques (Gallico et al., 1984). Nous concentrerons notre exposé sur le développement des modèles tridimensionnel de peau reconstruite.

La recherche sur les modèles de peaux reconstruites (PR) a été motivée par des raisons médicales mais également suite à l'interdiction en 1998 d'utiliser l'expérimentation animale pour tester l'efficacité des produits cosmétiques (Directive 93/35/CEE, 1993; Official Journal of the European Community [JOCE], L 151, p. 32 ; European cosmetic settlement n°1223/2009). C'est à la fin des années 90 que les différents modèles de PR ont été développés avec pour point commun: un épiderme reconstruit, pluristratifié, différencié grâce à la culture à l'interface air/liquide (Pruniéras et al., 1983). Leurs différences reposent sur la présence ou non d'une partie dermique et si oui, sur sa qualité. Ainsi les épidermes reconstruits sont cultivés sur différents supports biologiques ou synthétiques et les PR sont caractérisées par leur partie dermique générée par l'ensemencement de fibroblastes. Nous citerons les épidermes reconstruits et ne développerons que les ensembles dermo-épidermiques qui sont au cœur de ce travail.

Parmi les différents modèles de PR, les premiers développés ont utilisés des supports poreux dans lesquels les fibroblastes adhèrent, prolifèrent, migrent et synthétisent leur propre MEC. La présence de Vitamine C, co-facteur de la prolyl-hydroxylase et des LOX, permet la fibrillogénèse du collagène le rendant insoluble ainsi que l'élastogénèse (Shimizu et al., 1965).

Concernant les **épidermes reconstruits**, brièvement, les kératinocytes sont ensemencés sur un insert de polycarbonate (Rosdy and Clauss, 1990) ou sur un support biologique tels que du collagène de type IV (Tinois et al., 1991), ou un derme désépidermisé. L'inconvénient majeur de ce genre de modèle est le manque d'interaction de l'épiderme avec le derme via la jonction dermo-épidermique. Des modèles de peau totale, comprenant le derme et l'épiderme ont par la

suite été développés, l'avantage est qu'ils ont une durée de vie plus longue que les épidermes reconstruits grâce aux interactions entre les deux compartiments.

Les différents modèles de PR seront décrits dans leurs grandes lignes et l'accent sera porté sur les deux modèles développés au laboratoire et qui ont été utilisés dans ce projet.

A. MODELE DE BELL DANS UN GEL DE COLLAGENE

Le modèle de Bell, précurseur, est un ensemble dermo-épidermique dans lequel une solution de collagène bovin de type I est transformée en gel solide lorsque sont incorporés des fibroblastes vivants (Bell et al., 1981). Au fur et à mesure de la culture, le gel de collagène se rétracte. Cependant, cette rétractation, induit la sécrétion de MMP par les fibroblastes qui entraîne la dégradation du gel de collagène et donc de l'ensemble. La rétractation du derme équivalent (DE) est directement proportionnel au nombre de fibroblastes présents. L'ajout d'un gel de fibrine ou d'acide hyaluronique estérifié permet de pallier au problème de dégradation du gel. L'ensemencement des kératinocytes à la surface ainsi que l'interface air/liquide (A/L) conduit donc à une PR totale avec un épiderme possédant toutes les structures d'adhérence. (Bell et al., 1981 ; Bell et al., 1983 et Coulomb et al., 1983). Cependant, bien que tous les composants de la membrane basale aient été retrouvés, l'organisation ultra structurale de la JDE n'a pas été démontrée. Ce modèle a été commercialisé par la société Organogenesis mais il a été retiré du marché. En effet, la rétractation et la durée de vie limitée de ce modèle sont des inconvénients qui ont été rédhibitoires à leur commercialisation, mais ils sont toujours utilisés dans les laboratoires de recherche.

B. MODELE SUR TREILLIS DE NAUGHTON

Dans ce modèle, l'ensemencement de fibroblastes de prépuce est réalisé sur une trame de nylon préalablement traitée afin de permettre la culture. Ainsi les fibroblastes adhèrent et prolifèrent rapidement à la trame, puis synthétisent une MEC riche et abondante composée de

collagène de type I et II ainsi que de GAG qui remplissent les trous du treillis (Slivka et al., 1993). Comme précédemment, l'ensemencement de kératinocytes en surface suivi de l'élévation à l'interface A/L permet d'obtenir une peau reconstruite. Cependant, bien que les microfibrilles de type fibres élastiques aient été mises en évidence, il n'en est pas de même pour l'élastine.

L'avantage de ce modèle est l'absence de rétraction lié à la présence d'un support rigide, mais sa finesse le rend difficile à manipuler. Qui plus est la trame de nylon peu compliquer les analyses histologiques.

Ce modèle a été commercialisé par la société ATS (Advance Tissue Sciences) pour les essais pharmacotoxicologiques. Il a aussi été retiré du marché car il a une durée de vie limitée et a été développé ensuite sous le nom de Dermagraft pour des applications cliniques. A cet effet, la trame de nylon a été remplacée par une trame d'acide polyglycolique biocompatible et biorésorbable.

C. MODELE SUR SUPPORT POREUX

Le premier modèle a été développé à partir d'un substrat dermique à base de collagène bovin de type I et III et de chondroïtine sulfate, réticulés par le glutaraldéhyde (Yannas et al., 1980). La réticulation permet de garantir l'absence de rétractation du DE. Elle s'effectue après lyophilisation du gel et permet de lier les molécules de collagène entre elles par des liaisons covalentes, ce qui rend le collagène insoluble et apporte une solidité au DE. Après colonisation du DE par les fibroblastes, l'ensemencement des kératinocytes à la surface et enfin l'élévation à l'interface A/L, on obtient un ensemble dermo-épidermique vivant très proche de la peau normale (Boyce et al., 1990). Cependant, le glutaraldéhyde étant toxique il a vite été remplacé par une réticulation avec d'autres procédés de nature physiques (Koide et al., 1993), chimiques (Ebersole et al., 2010; Tiollier et al., 1990) ou ionique (Echinard et al., 1989).

Un nouveau modèle de collagène réticulé ioniquement a été développé et breveté dans notre laboratoire. Il est constitué de collagène bovin de type I, de chondroïtine 4- et 6-sulfate, et de chitosan. Le chitosan est un polysaccharide polycationique composé de N-acétyl-D-glucosamine, qui permet d'établir des liaisons ioniques avec le collagène et les chondroïtines sulfates.

Les fibroblastes ensemencés à la surface du substrat dermique migrent dans la structure poreuse et synthétisent une MEC riche et abondante. L'épiderme présente une organisation physiologique avec les 4 couches exprimant spécifiquement les diverses protéines (kératines, loricrine, involucrine, filaggrine, ...), ainsi qu'une JDE (composée de collagène type IV, VII et laminine 3.3.2, hémidesmosomes) très proche de celle de la peau normale (*FIGURE 27*).

Toutes les protéines de la MEC du derme recherchées ont été retrouvées dans ce modèle, mais surtout avec une organisation ultrastructurale proche de la peau humaine: fibres de collagène regroupées en faisceaux (Berthod et al., 1996), dépôts de collagène de type I, III, IV, V, VI, XII, XIV, de fibronectine, décorine, acide hyaluronique (Berthod et al., 1996; Metral et al., 2014; Dos Santos et al., 2015), élastine (Cerimele et al., 1990), fibulline-5, fibrillin-1 et, enfin, lysyl oxydases LOX et LOXL (Noblesse et al., 2004). Ce modèle est donc considéré comme un modèle de référence car très proche d'un point de vue de sa composition, de sa physiologie et de son organisation de la peau normale humaine. Sa culture peut être prolongée pendant 4 mois permettant ainsi d'obtenir un modèle de sénescence *in vitro* très proche du vieillissement *in vivo*.

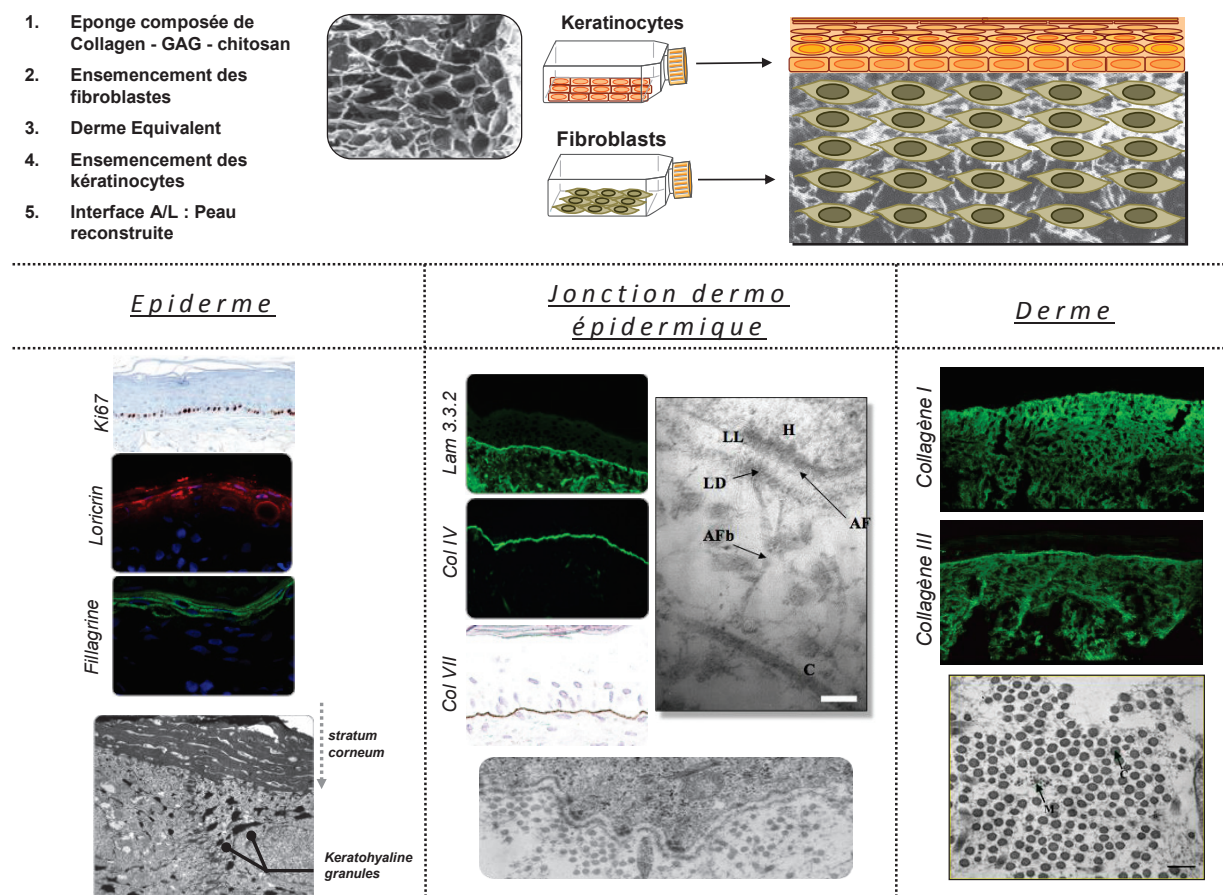


Figure 27 : protocole simplifié de la production des peaux reconstruites selon le modèle sur éponge de GAG-Collagène I-chitosan (panel de haut). Images représentatives de l’histologie de l’épiderme, du derme et de la jonction dermo épidermique (panel du bas)

Ce modèle est évolutif puisqu’il peut être enrichi avec l’ajout de cellules cutanées autres que les kératinocytes ou les fibroblastes. Ainsi, incorporés à l’épiderme, les mélanocytes permettent d’avoir de la peau reconstruite pigmentée PRP (Nakazawa et al., 1997, 1998), les cellules de Langerhans provenant de différenciation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34+ donnent de la peau reconstruite immunocompétente PRI (Dezutter-Dambuyant et al., 2006). Dans le derme, des cellules endothéliales provenant de la différenciation des CSH du cordon ombilical permettent d’avoir une peau reconstruite endothélialisée PRE dans laquelle les

cellules se regroupent en structures tubulaires (Auxenfans et al., 2012). Aujourd’hui, des cellules endothéliales micro-vasculaires sont utilisées (Black et al., 1998; Hudon et al., 2003).

Ce modèle versatile permet plusieurs alternatives pour étudier le vieillissement cutané:

- ❖ La culture prolongée de ce modèle permet de mettre en évidence certaines caractéristiques du vieillissement chronologique sans variations interindividuelles (FIGURE 28).

Si l’on s’intéresse dans un premier temps à l’épiderme, on retrouve à partir de 60 jours la diminution du nombre de cellules exprimant Ki67, PCNA, P63, marqueurs de cellules prolifératives, associé à la diminution de l’épaisseur de l’épiderme. A ces diminutions, s’associent des anomalies de la différenciation terminale dont l’expression de l’involucrine, la filaggrine, et la loricrine dans les couches suprabasales. Dans notre modèle, l’altération du processus de différenciation kératinocytaire entraîne une altération de la fonction barrière de la couche cornée, phénomène également retrouvé *in vivo* durant le vieillissement de la peau (Cerimele et al., 1990; Roskos and Guy, 1989).

Concernant la JDE, la structure reste bien conservée jusqu’au 120^{ème} jour où l’on observe alors une duplication de la lamina densa, altération typique d’une peau âgée (Makrantonaki and Zouboulis, 2007; Hull and Warfel, 1983).

Comparativement à ce qui a été décrit *in vivo*, nous avons observé une augmentation de l’expression de p16INK4a dans les couches basale et suprabasales de l’épiderme (Dos Santos et al., 2015), supportant le processus de sénescence cellulaire est bien retrouvé dans notre modèle (Ressler et al., 2006; Sharpless, 2004; Waaijer et al., 2012).

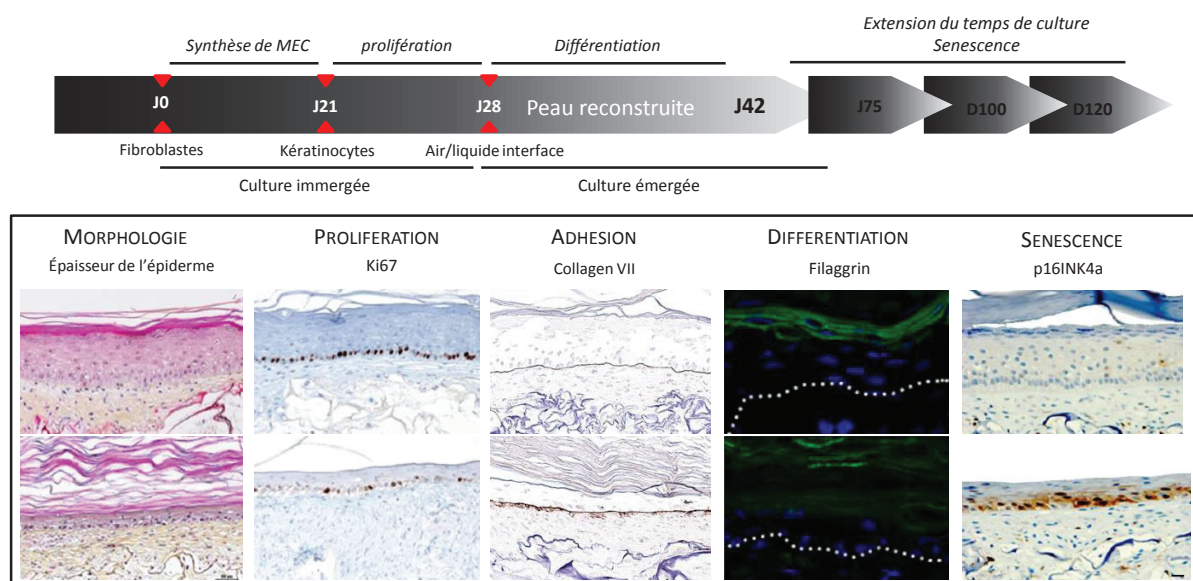


Figure 28: Caractérisation histologique des peaux reconstruites sénescents entre j42 et j120, suivie par la morphologie de la peau, la prolifération des cellules de l'épiderme, l'expression de protéine d'adhésion, de différenciation et de sénescence (Dos Santos et al., 2015).

Ces résultats confirment que ce modèle obtenu par rallongement du temps de culture permet d'imiter fidèlement le vieillissement chronologique observé dans une peau humaine normale prise comme témoin. Ce modèle est donc pertinent pour étudier les processus biologiques impliqués dans le vieillissement ainsi que pour tester de nouvelles molécules anti-vieillessement.

- ❖ L'utilisation de cellules (kératinocytes et fibroblastes) issues de donneurs d'âges différents est une possibilité mais la très grande variation interindividuelle provenant du patrimoine génétique des cellules de donneurs différents est un biais potentiel qui limite leur utilisation.

En effet, chaque individu possède son propre background génétique et épigénétique, processus non contrôlable et qui pourrait influencer les réponses biologiques obtenues. De plus, le mode de vie, le climat, l'hygiène de vie, l'exposition aux UV ou au tabac, interviennent sur la « qualité » des cellules. C'est pourquoi, les cellules provenant de 2 donneurs différents du même âge peuvent évoluer différemment en culture. Pour être fiable, il faudrait pouvoir

analyser les réponses des cellules obtenues avec un grand échantillonnage de donneurs de chaque âge.

De façon globale, la « destinée » d'une PR est son vieillissement, la variable est la vitesse à laquelle la sénescence est atteinte. La sénescence répliquative démontrée avec les cellules de donneurs d'âge différent a pu être confirmée avec les cellules d'un même donneur qui a eu le courage de prélever des biopsies de sa peau au cours de sa vie et d'en extraire les fibroblastes. Il a été démontré que les fibroblastes ont un doublement de population cumulé (CPD) qui diminue lorsque l'âge augmente (Kaji et al., 2009).

A. MODELE SANS SUPPORT

Le modèle sans support repose sur la réticulation du collagène en présence de vitamine C pour permettre l'auto-assemblage des fibroblastes en DE (L'Heureux et al., 1999). L'épaisseur du feuillet dépend directement de la quantité de MEC sécrétée par les fibroblastes. Le dépôt de cette matrice composée principalement de collagène est maximal après 3 semaines de culture. Le DE est épidermisé par des kératinocytes après 3 à 5 semaines de culture. Comme dans les autres modèles, l'élévation à l'interface A/L permet la stratification et la différenciation terminale de l'épiderme (Michel et al., 1997). A ce stade, la jonction dermo-épidermique est continue, composée des protéines de la JDE dont le collagène de type IV, VII et de laminine et suivant l'organisation ultrastructurale de la membrane basale de la peau native.

De façon similaire au modèle sur support poreux, dans le derme il est possible de retrouver les protéines principales de la MEC telles que le collagène de type I et III, la fibrilline, l'élastine, la fibuline-5 entre autres, ainsi que dans l'épiderme Ki67, les différentes kératines et protéines de la différenciation épidermique.

Ce modèle sans support est peu contraignant car il ne nécessite pas de biomatériaux. Qui plus est l'absence de support poreux permet d'éviter les inclusions épidermiques dans le derme lorsque la présence de MEC est insuffisante. La maturation de la peau totale est assez longue

mais en revanche, l'homéostasie du tissu est bien conservée durant 20 semaines, ce qui permet des tests de toxicité ou d'innocuité sur le long terme (FIGURE 29).

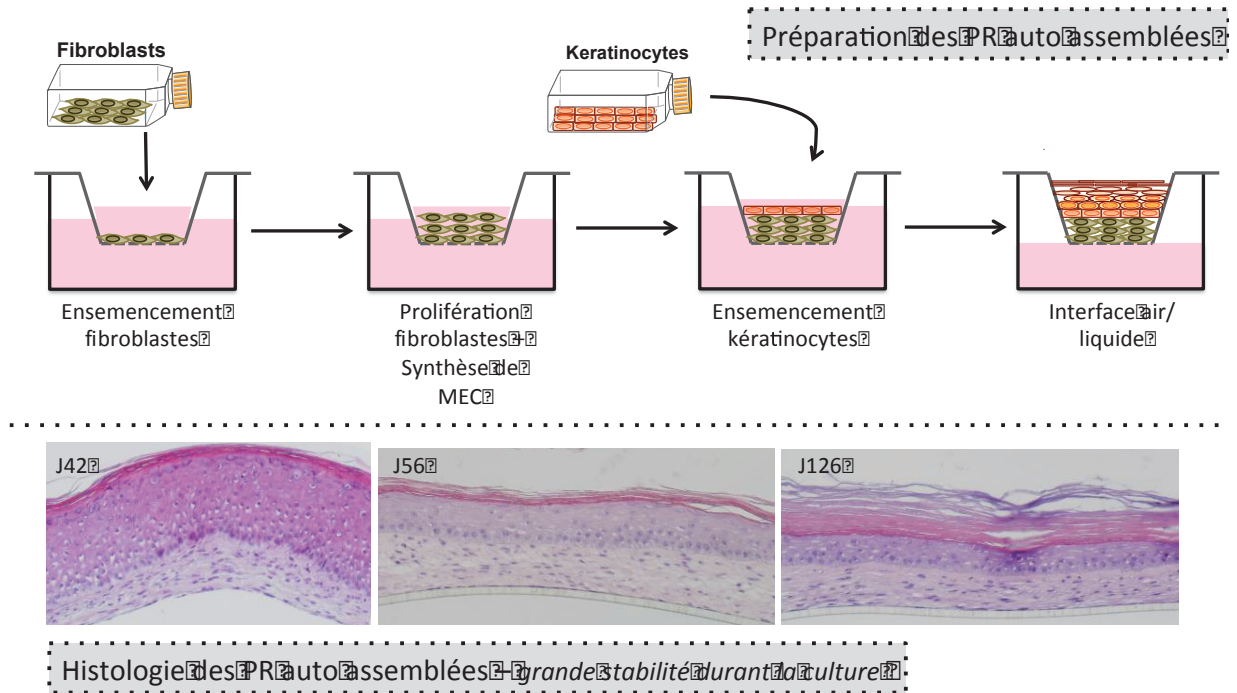


Figure 29 : protocole simplifié de la production des peaux reconstruites selon le modèle auto-assemblé sans support (panel de haut). Images représentatives de l'histologie des peaux reconstruites sans support au cours du temps (panel du bas). Il est possible d'observer une grande stabilité de l'épiderme et du derme au cours du temps.

II. LES MICRO ARNS

Les micro-ARNs (miRNAs) ont été découverts en 1993, ce sont des ARNs interférents endogènes à la cellule de 20-22 nucléotides, transcrits à partir du génome.

Le génome humain est composé d'une grande portion d'ADN dit « non codant » (introns et régions intergéniques). Cependant, la très forte conservation (Shabalina et al., 2001) de cette partie du génome avec l'évolution ainsi que sa transcription (Sun and Wu, 2015) suggère un rôle fonctionnel de ces ARN non codants. Ces ARN non codant auraient donc une fonction de régulation qui est nécessaire à l'évolution.

Il existe plusieurs type de miRNAs : intergéniques (localisés à l'extérieur des régions génomiques et possèdent leur propre promoteur), intragéniques intronique ou exonique (transcrits à partir d'une séquence génomique incluse dans une séquence codante ou non pour un gène). Par ailleurs, environ un tiers des miRNAs chez les mammifères sont regroupés en « clusters » et transcrits en un seul transcrit primaire (pri-miRNA) (Han, 2004; Lee et al., 2011, 2004).

Les miRNA régulent l'expression de protéines cibles en s'appariant de manière spécifique aux ARN messagers, inhibant ainsi leur traduction ou entraînant leur dégradation. Ils sont donc impliqués dans la plupart des processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la communication cellulaire et la réponse au stress.

La majorité des miRNA sont transcrits par l'ARN polymérase II sous la forme d'un long transcrit primaire pri-miRNA. La transcription des miRNA introniques est régulée par le gène hôte (Rodriguez et al., 2004) alors que les miRNA intergéniques possèdent leur propre promoteur (Monteys et al., 2010).

Le pri-miRNA est caractérisé par une tige d'ARN double brin d'environ 30 nucleotide présentant des mésappariement, une boucle et des fragments d'ARN simple brin de part et d'autre de cette structure tige/boucle (FIGURE 30). Il est clivé localement par Drosha, une RNase de type III, pour libérer les structures tige-boucle, on obtient alors les pre-miRNAs. Les pre-miRNAs générés dans le noyau par clivage sont exportés activement dans le cytoplasme, où à lieu un deuxième clivage par une autre RNase III, Dicer. Le duplex miRNA-miRNA correspond à la partie inférieure

de la « tige » du pre-miRNA débarrassé de la boucle. L'un des deux brins du duplex miRNA-miRNA, est appelé le brin « guide » ou miRNA mature, et est incorporé au sein d'un complexe RISC, rejoignant ainsi la voie « interférence à ARN ». Il existe des pre-miRNAs donnant des miRNAs matures provenant des deux brins distingués par la notation miR-x-3p (brin 3') et miR-x-5p (brin 5'). (Daugaard and Hansen, 2017)

On parle de complexe RISC un ensemble moléculaire pour éteindre l'expression de gènes cibles par divers mécanismes comme la dégradation de l'ARNm ou la répression de la traduction. Un complexe RISC est caractérisé par la présence d'une protéine effectrice de la famille Argonaute et d'un petit ARN (siRNA, miRNA entre autres) servant de guide en s'appariant à un ARN cible.

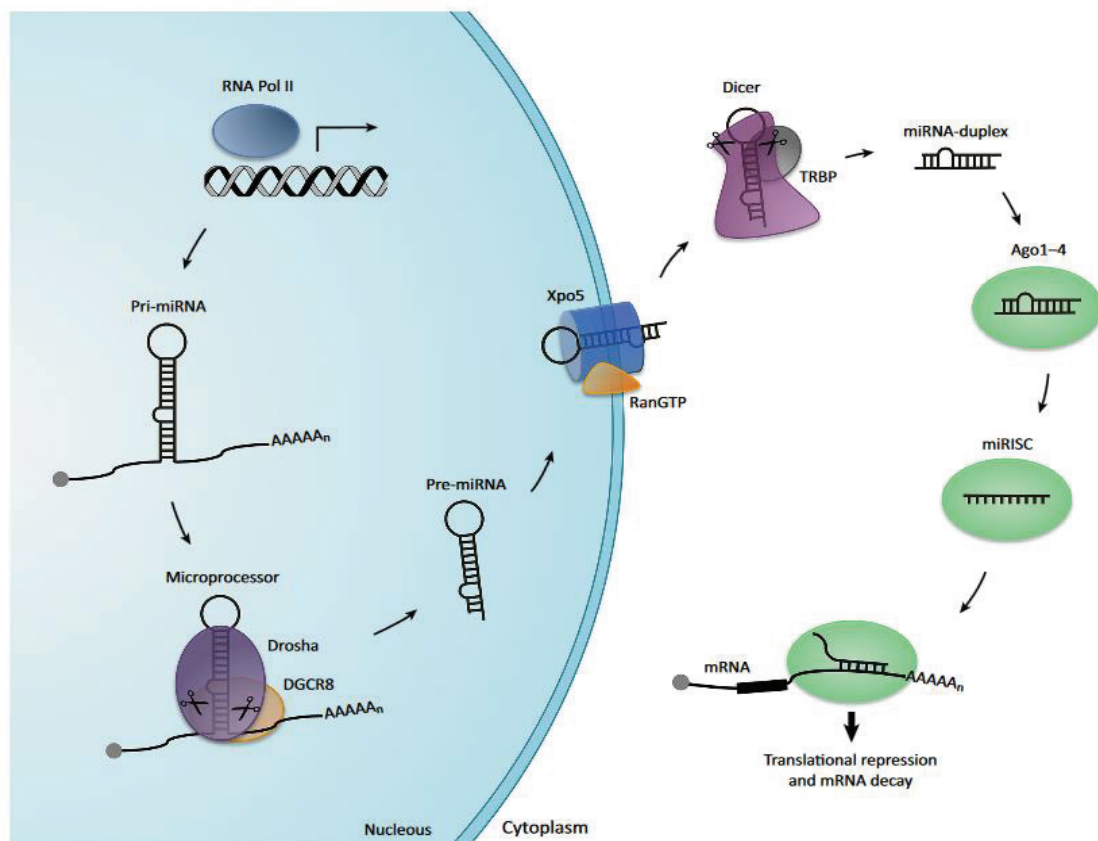


Figure 30: biogénèse des micro ARN (Daugaard and Hansen, 2017). Les microARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II en longs pri-miRNA, clivé par Drosha RNase III pour donner le pré-miRNA. Ce dernier sera exporté vers le cytoplasme, où il est ensuite traité par une autre enzyme RNase III, Dicer, qui débarrasse le double brin d'ARN de la boucle. Le microARN simple brin sera incorporé au miRISC pour induire sur l'ARNm cible une induction ou une répression de la traduction.

Les miRNA sont impliqués dans la morphogénèse de l'épiderme et particulièrement dans la formation de la fonction barrière. Des souris KO conditionnel de DICER dans les cellules progénitrices de l'épiderme présentent une déshydratation sévère conduisant au décès ; associé à un épiderme hyper prolifératif présentant un nombre de cellules Ki67 et K5 positives bien plus importantes et donc une différenciation de l'épiderme altérée (Yi et al., 2006). Ces résultats montrent que les miRNA sont importants pour la morphogénèse de l'épiderme et le contrôle de la balance prolifération/différenciation au niveau des kératinocytes de la couche basale.

L'homéostasie de l'épiderme résulte d'un équilibre entre la prolifération et la différenciation des kératinocytes. Sur la base de ces observations, de nombreux auteurs ont regardés les profils d'expression des miR dans des kératinocytes proliférant ou entrés en différenciation après ajout de calcium dans le milieu de culture (Hildebrand et al., 2013).

Aussi les microARNs sont aussi impliqués dans des processus tel que la cicatrisation (Banerjee et al., 2011; Herter and Xu Landén, 2017).

La mise en évidence du rôle et de la régulation des microARN pour l'organisme dans des situations physiologiques comme pathologiques est très récente. En particulier dans le cas du vieillissement cutané, où les microARN ont une place importante dans la mise en place de l'épiderme durant le développement de l'organisme ainsi que dans son homéostasie durant le vieillissement cutané (Horsburgh et al., 2017). Ainsi une meilleure compréhension des mécanismes de régulations via les microARN ouvre des perspectives dans le développement de traitement anti-âge.

Après avoir passé en revue la peau sa structure et son vieillissement, ainsi que les modèles *in vitro* et *in silico* pour l'étude du vieillissement, la 3^{ème} partie de cette introduction bibliographique sera consacrée au sélénium, élément trace essentiel pour l'organisme et son potentiel rôle dans la prévention du vieillissement cutané.

CHAPITRE N°3

**SELENIUM, ELEMENT TRACE ESSENTIEL ET
PREVENTION DU VIEILLISSEMENT**

Cette partie bibliographique présente une synthèse générale des connaissances sur le sélénium : ses propriétés et son métabolisme ; ses sources alimentaires, et les conséquences de sa déficience sur la santé humaine. Une attention particulière est également portée aux sélénoenzymes, protéines catalytiques pour lesquelles le sélénium est indispensable. Cette revue de la littérature peut paraître exhaustive mais nécessaire pour la compréhension de notre problématique initiale de l'utilisation du sélénium en prévention du vieillissement cutané.

I. PROPRIETES & METABOLISME

Le sélénium a été identifié en 1817 par le physico-chimiste suédois Berzelius, lors de recherches entreprises pour comprendre une soudaine maladie mystérieuse dont souffraient les ouvriers d'une usine de fabrication d'acide sulfurique. En effet, la production d'acide sulfurique était réalisée via une réaction d'oxydation et un milieu comportant du sélénium. Son abondance conduit à une toxicité cellulaire, mais il est néanmoins nécessaire car une carence engendre des effets dramatiques et délétères. Le sélénium est aujourd'hui considéré comme un élément trace absolument indispensable à l'homme, le seul inscrit dans le code génétique sous forme de sélénocystéine (SeCyst) (Rayman, 2012). La sélénocystéine est présente dans les 25 sélénoprotéines identifiées à ce jour dans le sélénoprotéome humain (Kurokawa and Berry, 2013). Il est cependant présent sous différentes formes; organique ou inorganique dans notre environnement (*FIGURE 31*):

- L'acide sélénieux (H_2SeO_3) et l'acide sélénique (H_2SeO_4) représentent les formes inorganiques, et sont deux acides solubles dans l'eau qui permettent d'obtenir respectivement les sels de sélénite et de sélénate de sodium. On retrouve ces formes chimiques au niveau du sol et dans l'eau.
- Les formes organiques du sélénium sont représentées par les levures sélénées et les acides aminés sélénés : la sélénométhionine (Se-Met) et la sélénocystéine (Se-Cys). La sélénométhionine est principalement retrouvée dans les plantes, alors que la sélénocystéine est retrouvée majoritairement dans les tissus humains.

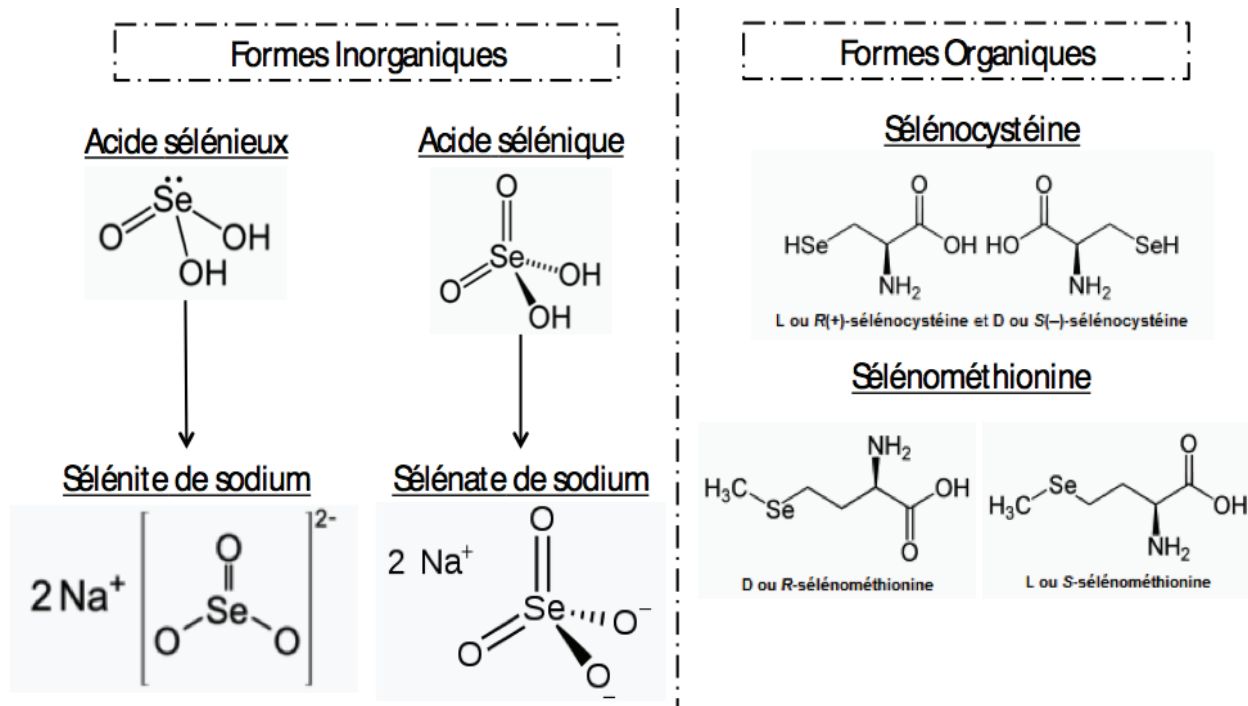


Figure 31: différentes formes chimiques du sélénium, ici les levures sélénées ne sont pas représentées.

Les besoins journaliers en sélénium d'un être humain de 50 à 200 µg, sont apportés par l'alimentation, où il est principalement présent sous forme organique (sélenométhionine et sélocystéine), particulièrement dans les aliments riches en protéines. Le sélénium minéral (sélénite, sélenate) est trouvé dans les eaux de boissons et dans la plupart des compléments alimentaires.

In vivo, le sélénium présente une dualité d'effets liée à la dose absorbée. C'est en 1295 que Marco Polo, lors de sa progression en Chine occidentale, remarqua que les chevaux suite à la consommation d'astragale, plante accumulatrice de sélénium, perdaient leurs sabots et mourraient de sélenose. De plus, dans cette partie de la Chine, le sol est très riche en sélénium. C'est pourquoi, historiquement, chez l'homme, le sélénium avait mauvaise réputation. C'est Klaus Schwarz, un Allemand, qui a défini pour la première fois en 1957 le sélénium **comme élément trace essentiel** pour la santé humaine. Il est désormais reconnu qu'une carence en sélénium pouvait être la source de pathologies et que la couverture des besoins par des apports nutritionnels était indispensable à la santé.

Il y a une accumulation préférentielle du sélénium dans le cerveau, la thyroïde, la glande pituitaire, le foie, le cœur, les muscles et les globules rouges (Myriam et al., 2006).

Brièvement, le cycle du sélénium comprend son absorption, sa distribution, son métabolisme et son élimination (*FIGURE 32*).

L'absorption du sélénium est réalisée dans le corps humain via deux voies d'assimilation:

- ❖ Au niveau de la peau, la voie transcutanée est sous l'influence de la température, de l'hydratation de la peau, de la présence d'autres composés chimiques

- ❖ La voie digestive, voie principale d'absorption du sélénium, est étroitement liée à la forme chimique du sélénium (*FIGURE 32*) :
 - Les aminoacides séléniés, sélénométhionine et sélénocystéine sont absorbés dans l'intestin grêle comme tous les acides aminés
 - Le sélérate de sodium est absorbé par un mécanisme de transport identique à celui du sulfate
 - Le sélénite de sodium, lui est assimilé par diffusion passive.

Toutes les formes physiques de sélénium, une fois dans le sang constituent le pool de sélénium. Il est alors transporté sous forme de sélénoenzymes (sélénoprotéines P pour 50% et glutathion peroxydase pour 15%) (Myriam et al., 2006). L'incorporation dans les sélénoprotéines représente la principale voie de métabolisme du sélénium.

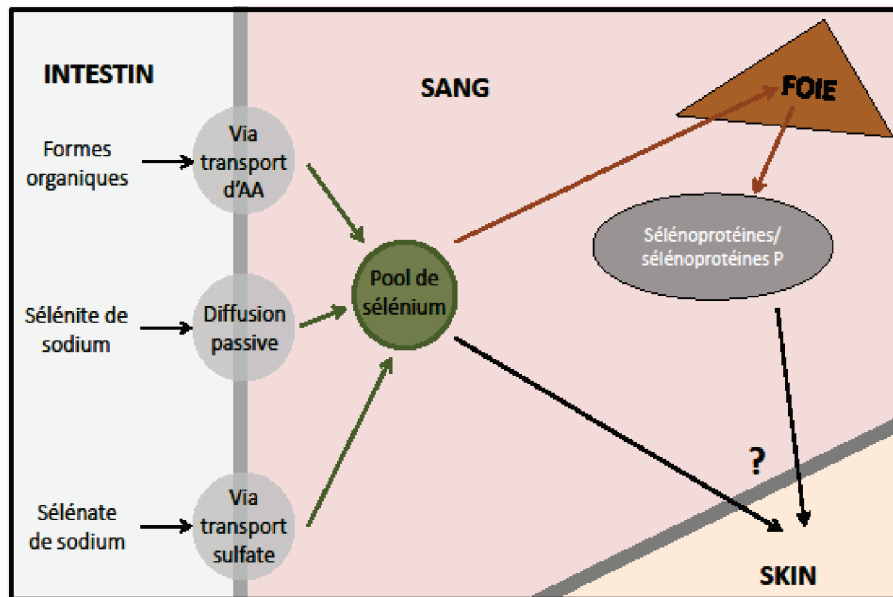


Figure 32 : schéma simplifié du mécanisme de l'absorption du sélénium (adapte de (Myriam et al., 2006)

Le sélénium non absorbé est ensuite éliminé par voie urinaire (60%) ou dans les fèces (35%). La part du sélénium cutané et donc la voie de passage du sang vers la peau est encore à ce jour peu analysée et donc mal connue.

II. LES SELENOENZYMES

C'est principalement grâce à des approches *in silico*, que les 25 sélénoenzymes humaines constituant le sélénoprotéome ont pu être déterminées (Driscoll and Chavatte, 2004; Kryukov et al., 2003; Lescure et al., 2002) (TABLEAU 6)

Elles forment une famille non pas au sens de leur homologie de séquence mais par leurs propriétés physico-chimiques communes et par leur implication dans des fonctions biologiques similaires.

Les sélénoenzymes sont des protéines contenant dans leur structure le sélénium sous la forme de sélénocystéine ou de sélénométhionine. Le sélénium régule sa propre incorporation dans les sélénoenzymes en 6 étapes: la transcription, le traitement au niveau du noyau, l'exportation du noyau, la translation, la stabilité des ARN messagers ainsi que la synthèse protéique. Il agit principalement lors de la translation et en post translation. Les différentes enzymes peuvent être

groupées en familles et seront listées en détail *TABLEAU 6* ci-après.

Brièvement :

- La famille des glutathions peroxydases (GPx), premières sélénoprotéines de mammifère identifiée en 1973 (Flohe et al., 1973; Rotruck et al., 1973). Cette famille comporte 4 enzymes, dont le rôle est de détoxifier les cellules et tissus des peroxydes et hydroperoxydes (*FIGURE 33*). Elles constituent la protection principale de l'organisme contre les radicaux libres et le stress oxydant. L'activité enzymatique est directement proportionnelle à l'apport en sélénium, d'où le lien étroit entre carence en sélénium et stress oxydant (Arthur, 2000). Il semblerait que les selenoenzymes de la famille des glutathions peroxydases sont en lien avec le vieillissement; une étude de cohorte a montré une relation inverse, significative et indépendante entre l'activité de la GPx sérique et l'âge (Espinoza et al., 2008).

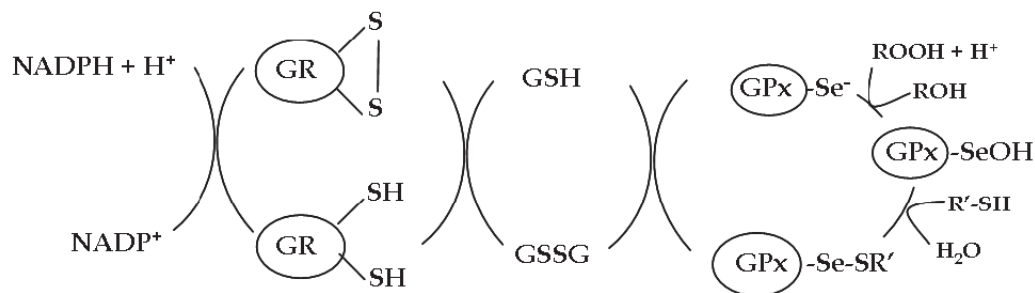


Figure 33: diagramme des chaînes de réactions de détoxification via les enzymes de la famille des glutathions peroxydases. Les GPx obtiennent des électrons du NADPH, via la glutathion réductase (GR) et le glutathion (GSH forme réduite, GSSG forme oxydé), pour catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques, protégeant ainsi les cellules contre les dommages oxydatifs.

- Les enzymes de la classe des thiorédoxines réductases (TrxR) utilisent le NADPH pour la réduction de son substrat, la thiorédoxine (Trx). La forme réduite de la Trx permet la réduction de nombreuses molécules cibles. Avec le NADPH, la Trx et la TrxR forment un système cellulaire utilisé dans de nombreux processus biologiques dont la réduction des ribonucleotides essentiels à la synthèse de l'ADN, dans le maintien de la balance

réduction/oxydation dans les cellules, dans la régulation de l'activité des facteurs de transcription ainsi que dans la régénération des systèmes antioxydants.

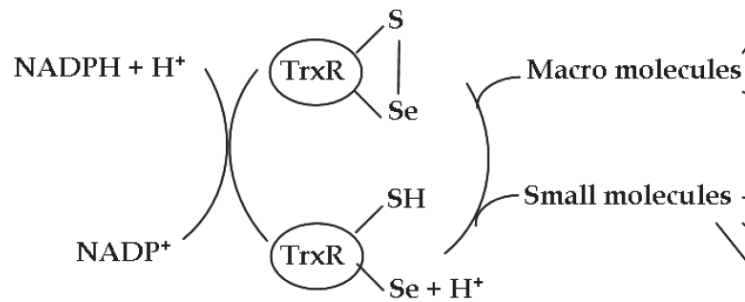


Figure 34 : transfert d'électrons du NADPH par des thiorédoxine réductases (TrxR) sur différents substrats. Les substrats peuvent être des macromolécules dans lesquelles les liaisons disulfures jouent des rôles critiques dans la régulation de leurs fonctions, mais également des composés de bas poids moléculaire.

- Les déiodases sont des enzymes régulatrices du métabolisme des hormones thyroïdiennes.

Tableau 6 : synthèse des principales sélénoenzymes humaines et leurs fonctions (Labunskyy et al., 2014)

Famille	Sélénoenzyme	Abréviation	Localisation cellulaire	Rôle
Glutathion peroxydases	Glutathion peroxydase cytosolique	GPX1	Cytoplasme	Ubiquitaire Abondante dans le foie et les érythrocytes : source de sélénium disponible pour la cellule Sensible aux variations de concentration en sélénium
	Glutathion peroxydase gastrointestinale	GPX2	Cytoplasme	Protège l'épithélium intestinal du stress oxydatif
	Glutathion peroxydase plasmatique	GPX3	Sécrétée	2 ^{ème} plus abondante dans le plasma (20% du sélénium plasmatique)
	Phospholipide hydroperoxydase	GPX4	Cytoplasme	Protège de la peroxydation des lipides intégrés aux membranes
Thiorédoxine réductase	Thiorédoxine réductase 1	TR1	Cytoplasme et noyau	La TrxR1 est une enzyme ubiquitaire du cytoplasme. C'est une des sélénoprotéines la plus étudiée, il semble que sa surexpression de façon stable dans un modèle cellulaire entraîne une diminution de l'expression des autres sélénoprotéines, corrélé avec une augmentation de certains marqueurs épithéliaux. (Nalvarte et al., 2015).
	Thiorédoxine réductase 2	TR2	Mitochondrie	Expression intense au niveau de la prostate, les testicules, l'utérus, le foie et les intestins
	Thiorédoxine réductase 3	TR3		Impliqué dans la maturation des spermatozoïdes

Déiodinase	déiodinase de type 1	DIO1	Membranaire	Très fortement exprimée dans le foie, le rein et la glande thyroïde. Son rôle principal est la conversion de la pro-hormone T4 en hormone thyroïdienne active T3.
	déiodinase de type 2	DIO2	Membranaire	Retrouvée essentiellement dans le système nerveux central, la glande thyroïde ainsi que les muscles cardiaques et squelettiques. Rôle dans la conversion de la T4 en T3
	déiodinase de type 3	DIO3	Membranaire	Retrouvée dans le cerveau et des tissus placentaires Rôle dans l'inactivation la T4 et la T3.
sélenoenzymes	Sélenoenzyme H	Sel H	Noyau	Rôle dans la régulation des niveaux d'expression de gènes impliqués dans la synthèse de glutathion et d'enzyme de détoxification
	Sélenoenzyme I	Sel I	Transmembranaire	Biosynthèse des phospholipides
	Sélenoenzyme K	Sel K	RE (réticulum endoplasmique)	Rôle non élucidé
	Sélenoenzyme 15	Sel 15 /SelIM	RE	Une sur expression de cette enzyme est associée à des niveaux altérés en peroxyde d'hydrogène, en SOD et GPX Rôle dans le contrôle d'un développement de cancer
	Sélenoenzyme O	Sel O		Pas d'information sur la distribution tissulaire cellulaire ni le rôle physiologique
	Sélenoenzyme P	Sel P	Cytoplasmique, sécrétée	1ère enzyme plasmatique la plus abondante et constitue 50% des réserves en sélénium plasmatique Rôle dans le stockage et transport du sélénium dans l'organisme sous la forme de sélénocystéine

				Rôle protecteur vis-à-vis de la neurodégénération et des dommages oxydatifs lié au vieillissement
Sélenoenzyme R	Sel R	Cytoplasmique		
Sélenoenzyme S	Sel S	RE		Expression inversement proportionnelle à la concentration en glucose plasmatique Rôle dans la régulation du diabète
Sélenoenzyme T	Sel T	RE		<i>In vitro</i> , rôle dans la mobilisation du calcium
Sélenoenzyme V	Sel V			Expression restreinte aux testicules : Rôle dans la spermatogénèse ?
Sélenoenzyme W	Sel W	cytoplasme		elle a des fonctions redox car elle est capable de lier le glutathion. protection des myoblastes du stress oxydatif

III. SOURCES DE SELENIUM ET COUVERTURE DES BESOINS

La quantité de sélénium nécessaire à l'organisme doit permettre une activité optimale des sélénoprotéines. En moyenne, les apports devraient être autour de 60 µg par jour, soit environ de 1 µg par kilo et par jour. Cependant, il existe des populations à risques qu'il serait souhaitable de compléter : les personnes âgées, les personnes atteintes de malabsorption intestinale ou nourries exclusivement par voie intraveineuse, celles souffrant d'infections virales sévères ou de cancers.

Le sélénium est apporté par l'alimentation et la boisson, son apport dépend donc de la teneur des aliments et des quantités ingérées. Les aliments protéiques sont les plus riches en sélénium : viandes, poissons, crustacés, abats, céréales et noix du Brésil comme le montre le *TABLEAU 7*. Par contre, les végétaux en contiennent peu, sauf certaines plantes accumulatrices ou les céréales dites complètes.

Tableau 7: Concentration en sélénium de catégorie alimentaire selon l'INRA (Leblanc et al., 2004)

Teneur en sélénium	Type d'aliment	[Se] moyenne	Forme de sélénium
Très riches	Volaille, gibier & abats	184 µg/kg	sélénocystéine
	Poisson	170 µg/kg	Sélénocystéine/ sélénométhionine
	Noix du Brésil	30 à 80 µg/g	sélénométhionine
Riches	Charcuterie	118 µg/kg	sélénocystéine
	Viande	95 µg/kg	sélénocystéine
	Œufs	40 µg/kg	sélénocystéine
	Fruits secs & oléagineux	48 µg/kg	
	Légumes secs	60 µg/kg	
Pauvres	Légumes	17 µg/kg	Sélénate / sélénocystéine / sélénométhionine
	Pain blanc	16 µg/kg	Sélénate / sélénométhionine

Aujourd'hui, la prise de complément nutritionnel est à l'origine d'une part non négligeable à ces apports. Mais il ne faut pas oublier que la variabilité des bienfaits d'une supplémentation en sélénium est souvent liée à la forme chimique des suppléments, à la dose administrée, à la forme galénique, au statut de l'individu en sélénium et en antioxydants et enfin à l'association du sélénium avec d'autres composés pour un effet synergique ou antagoniste.

IV. SELENIUM ET SANTE : UN LIEN AMBIVALENT

La *FIGURE 35* représente le rôle ambivalent du sélénium en fonction de sa concentration dans l'organisme. L'impact sur la santé humaine sera présenté en fonction d'une dose physiologique, d'une carence ou d'un surdosage.

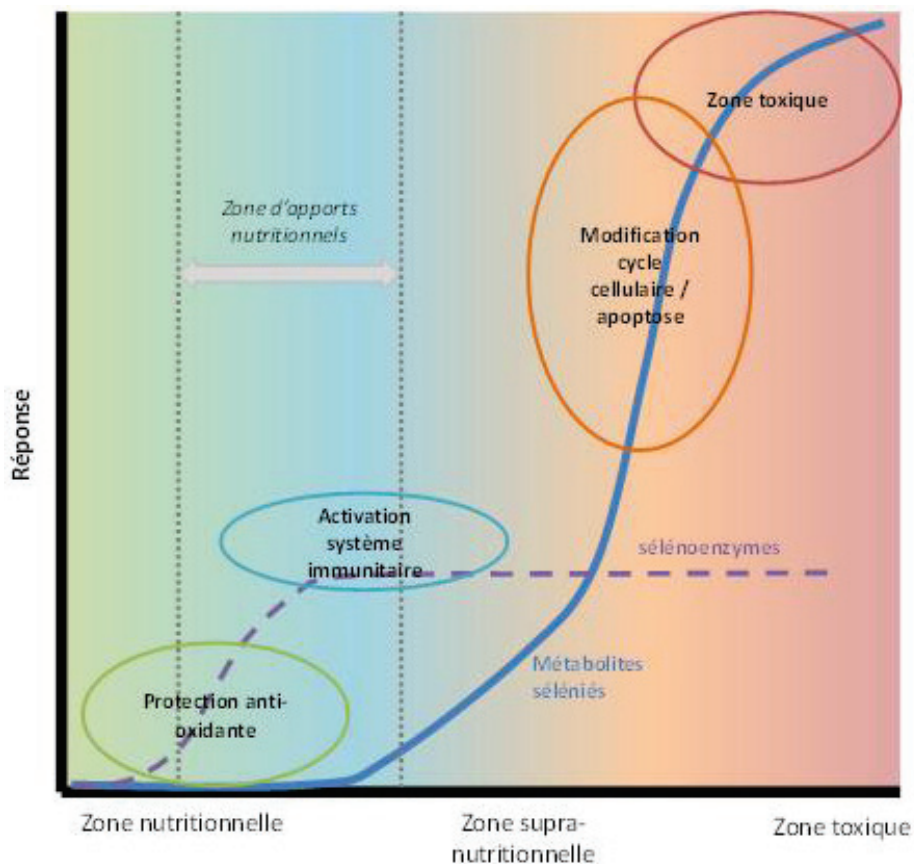


Figure 35: modélisation de la réponse organique à la concentration en sélénium (traduit de Combs and Gray, 1998)

A. ROLE PHYSIOLOGIQUE

Il existe un lien direct entre la couverture des besoins en sélénium, la fonctionnalité des sélénoprotéines, et les effets bénéfiques pour l'homme. (Duntas and Benavenga, 2015; Roman et al., 2014). Les effets bénéfiques du sélénium sont liés à ces divers rôles.

1. *ROLE ANTIOXYDANT*

Les sélénoprotéines jouent un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire, en préservant l'intégrité membranaire et en réduisant la probabilité de propagation de lésions oxydatives à des biomolécules telles que les lipides, les protéines et l'ADN (Labunskyy et al., 2014). Les glutathion peroxydases détoxifient les peroxydes d'hydrogène et hydroperoxydes organiques. Les thiorédoxines réductases jouent un rôle essentiel dans les processus antioxydants, en réduisant les ponts disulfures intramoléculaires, et en catalysant la régénération de la forme réduite de substances telles que vitamines C et E. Les sélénoprotéines P assurent, en synergie avec d'autres molécules de nature enzymatique (superoxyde dismutase, catalase) ou non enzymatique (vitamine E, C, caroténoïdes, groupes thiols, polyphénols, Q10), l'équilibre intra et extracellulaire de la balance pro- et antioxydants. Comme nous l'avons vu plus haut l'équilibre pro/antioxydants est essentiel pour la cellule, particulièrement pour les cellules cutanées, en lien avec le vieillissement de la peau.

2. *ROLE ANTI-INFLAMMATOIRE ET IMMUNO-MODULATEUR*

L'action anti-inflammatoire du sélénium passe par l'inhibition du facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B par la GPx3, ce qui entraîne une répression de l'expression des gènes qui codent pour les cytokines pro-inflammatoires, limitant ainsi la réaction inflammatoire. L'activité anti-radicalaire et anti-inflammatoire est complétée par les propriétés immuno-modulatrices du sélénium. Le rôle de modulateur de la réponse inflammatoire et immunitaire passe par l'action sur la phagocytose, aussi bien que par l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes (Huang et al., 2012).

Sans rentrer dans les détails, loin de nos préoccupations dans cette revue bibliographique, le sélénium a aussi un rôle dans la détoxification des cellules des xénobiotiques organiques ou des

métaux lourds (cadmium, mercure, plomb) (Eybl et al., 1969 ; Magos and Webb, 1980). Enfin, il semblerait que le sélénium module l'agrégation plaquettaire, car dans les cas de déficits en sélénium, on constate une production accrue de Thromboxane A2 et une synthèse diminuée de prostacycline, et donc une activation de l'agrégation plaquettaire (Toivanen, 1987).

B. DEFICITS EN SE ET CONSEQUENCES CLINIQUES

Des données récentes confirment le rôle majeur du sélénium dans de nombreuses situations physiopathologiques (Fairweather-Tait et al., 2011). La connaissance du fonctionnement des sélénoprotéines a permis de comprendre le lien entre déficits séléniés et l'apparition de pathologies. Certains auteurs soulignent même qu'une carence modérée en sélénium pourrait accroître la sensibilité à diverses maladies. Les pathologies observées sont pour la plupart liées à une augmentation du stress oxydant et à des altérations du signal redox (*FIGURE36*).

La séléniémie plasmatique ainsi que l'activité de la glutathion peroxydase sont utilisés comme marqueurs du statut sélénié. Un taux de sélénium plasmatique inférieur à 0,70 µmol/L indique un déficit, qui devient profond lorsque le taux est inférieur à 0,57 µmol/L. Les signes cliniques d'une carence profonde sont essentiellement des douleurs et une faiblesse musculaires, des anomalies des ongles, une dépigmentation de la peau et des cheveux, des ostéo-arthropathies, des arythmies et cardiopathies congestives.

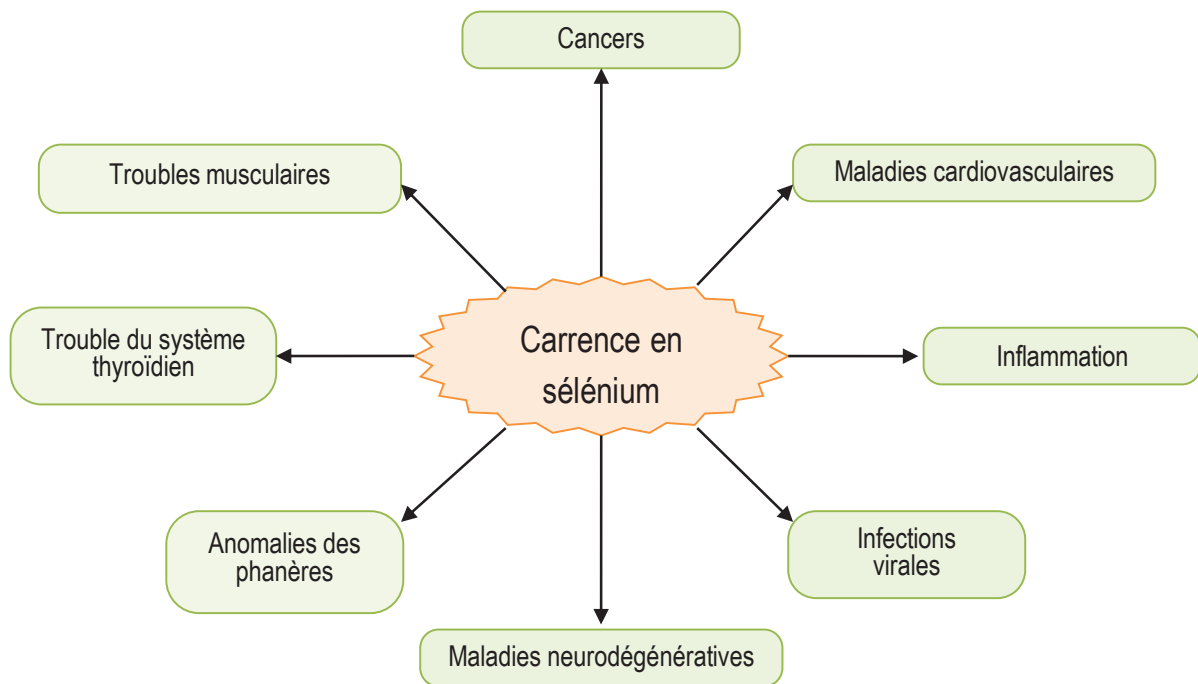


Figure 36: représentation simplifiée des implications physiopathologiques du sélénium

1. SELENIUM ET CANCERS

La glutathion peroxydase protège les membranes cellulaires, les acides nucléiques et les protéines d'une façon générale contre la dégradation par les radicaux libres. Un défaut des mécanismes protecteurs du stress oxydatif est aujourd'hui impliqué dans l'initiation et le développement des cancers. Depuis les années 70, de nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence une relation inverse entre les apports de sélénium et l'incidence de cancers (Clark et al., 1996; Schrauzer, 1977, 2009). Un statut ainsi que des apports optimaux en sélénium participent à la diminution du risque de cancers (Schrauzer, 2009; Vinceti et al., 2014; Hatfield et al., 2014 ; Chen et al., 2013).

Les mécanismes sont complexes mais le sélénium semble intervenir sur l'initiation et le développement tumoral. Tout d'abord, en amont de la formation de tumeur, il joue un rôle capital dans la prévention de l'apparition de mutations délétères de l'ADN grâce à ces propriétés anti-oxydantes via l'action des sélénoprotéines (Davis et al., 2012; Irons et al., 2006).

Dans un deuxième temps, par une action précoce sur les cellules cancéreuses il inhibe la croissance cellulaire avec un différentiel vis-à-vis des cellules normales ; il régule la différenciation, stimule le système immunitaire, et divers mécanismes anti radicalaires (Méplan and Hesketh, 2014). C'est pourquoi, le déficit en sélénium pourrait favoriser l'apparition de certains cancers (prostate, rein, côlon et foie).

2. *SELENIUM ET MALADIES CARDIOVASCULAIRES*

Sur le plan théorique, l'hypothèse de l'effet protecteur du sélénium contre les maladies cardiovasculaire est soutenue par la capacité des GPx à lutter contre l'oxydation des lipides et l'agrégation des plaquettes (Nève, 1996).

Les premières observations ont rapportées l'existence d'une cardiomyopathie sévissant dans les régions séléniprives de Chine, la maladie de Keshan. Cette pathologie cardiaque a été retrouvée plus tard dans d'autres situations de déficit sélénié (malades placés sous-alimentation parentérale, SIDA, maladie de Crohn, hémodialysés), toutes caractérisées par une baisse du sélénium sérique et des activités glutathions peroxydases globulaires et plasmatiques.

Cependant, bien que les déficits en sélénium soient associés à une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires, les méta-analyses récentes ne concluent pas aux bénéfices des complémentations en sélénium dans la prévention des maladies cardiovasculaires (Brigo et al., 2014).

3. *SELENIUM ET AUTRES PATHOLOGIES*

Maladies inflammatoires : La faible concentration sérique en sélénium augmente l'incidence des affections inflammatoires telles que les péricardites, l'asthme, et la polyarthrite rhumatoïde.

Maladies neuro-dégénératives : Le cerveau étant un organe dit accumulateur de sélénium, un déficit en sélénium pourrait contribuer au déclin des fonctions cognitives, comme par exemple dans la maladie d'Alzheimer ou des cas de sénilité précoce. (Berr et al., 2012; Hawkes and Hornbostel, 1996). Et inversement, comme rapporté par l'étude EVA, un statut sélénié adéquat apparaît être, un facteur de longévité (Arnaud et al., 2007).

Système immunitaire : Le sélénium agit via l'activation de nombreuses cellules immunocompétentes telles que les lymphocytes T auxiliaires, T cytotoxiques, les cellules NK, etc. (Hoffmann, 2007; Huang et al., 2012). Plusieurs études suggèrent qu'une carence modérée en sélénium s'accompagne d'une forte diminution de l'immunocompétence. Une carence en sélénium favoriserait ainsi la survenue, la virulence, ou la progression de certaines infections virales comme le virus de l'influenza de type A, virus de l'hépatite B (Beck, 2001; Beck et al., 2001). Chez les patients infectés par le VIH, on observe une baisse brutale de la séléniémie et de l'activité de la glutathion peroxydase, associée à une production importante de radicaux libres. La séléniémie serait même un puissant facteur prédictif de l'évolution de l'infection par le VIH.

C. SURCHARGE EN SELENIUM ET CONSEQUENCES CLINIQUES

L'OMS considère que le sélénium inorganique est plus toxique que le sélénium organique. Parmi les formes minérales, le sélénite serait plus toxique *in vitro* et *in vivo*. (Bandura et al., 2005; Rafferty et al., 2003). La toxicité du sélénium dépend bien évidemment du mode d'administration, du temps d'exposition, de la forme physico-chimique et des interactions potentielles avec d'autres composés.

Comme nous l'avons vu, un excès de sélénium induit notamment une déformation des ongles, une perte de cheveux et des lésions cutanées (Fan and Kizer, 1990), une détresse respiratoire, des troubles du système nerveux ainsi que des troubles gastro-intestinaux et hépatiques. Bien que le mécanisme exact de la toxicité du sélénium reste méconnu, deux hypothèses ont été formulées :

- tout d'abord, une interférence avec le métabolisme des composés sulfurés : lors d'un excès de sélénium il y a inhibition des systèmes enzymatiques de la respiration cellulaire par remplacement du groupement thiol des déshydrogénases.
- production de radicaux libre via un déséquilibre du métabolisme du glutathion.

V. SELENIUM ET LONGEVITE - ETUDES D'OBSERVATION

Seules quelques études rapportent les relations entre le sélénium, l'âge et la longévité des populations (Akbaraly, 2005; Olivieri et al., 1994; Ray et al., 2006). Le sélénium plasmatique semble être un indicateur de longévité des populations et il existe une corrélation inverse entre la concentration plasmatique en sélénium et l'âge.

Brièvement, nous allons parcourir les études portant sur des populations européenne ou nord-américaine. Dans les années 1994, une étude italienne a été menée sur la population d'un village du nord de l'Italie (Olivieri et al., 1994). Les individus ont été classés en fonction de l'âge (20-39ans ; 40-59ans ; 60-75ans ; >75 ans), avec n=13-15 individus par sexe par classe d'âge. Différents paramètres ont été suivis tel que la teneur plasmatique en sélénium, en vitamine A et E, certains acides gras et enzymes telles que la GPX et la SOD. Dans cette population bien alimentée vivant dans une zone économiquement riche du nord de l'Italie, on observe une diminution linéaire de la teneur en sélénium et de l'activité de la GPX avec l'âge.

Plus, récemment, une étude française menée sur 10 ans, l'étude EVA, a permis de suivre plus de 1300 individus âgés de 59 à 69 ans au moment du recrutement (Akbaraly, 2005). Cette étude prospective a montré une meilleure survie des individus ayant une concentration plasmatique plus élevée en sélénium. Les résultats de cette étude correspondent à ceux de Ray en 2006 à Baltimore sur 632 femmes âgées entre 70 et 79 ans, « classées » en 4 quartiles en fonction de leur teneur en sélénium sérique : <1.038 ; >= 1.038 – 1.045 ; >= 1.045 – 1.994 ; >+ 1.995 µmol/L (Ray et al., 2006). Les résultats montrent que le groupe ayant la plus faible concentration en sélénium a une survie significativement plus faible que les 3 autres groupes. La conclusion est que cet élément trace joue un rôle important dans le maintien de la santé chez les individus âgés, mais ne permet pas d'affirmer que le sélénium est un indicateur de longévité dans la population vieillissante.

VI. ÉTAT DES LIEUX « PEAU ET SELENIUM »

Il existe peu de données concernant la teneur en sélénium au niveau de la peau. Le *TABLEAU 8* présente deux articles qui se sont intéressés au dosage du sélénium cutané. Les gammes de concentrations sont assez larges mais directement dépendantes de l'état nutritionnel du donneur.

Tableau 8 : données sur la teneur en sélénium cutané en µg/g de poids sec de peau (Mirastschijski et al., 2013; MOLOKHIA et al., 1979)

		(MOLOKHIA et al., 1979)			(Mirastschijski et al., 2013)	
		Gamme	Médiane	Moyenne	Gamme	Médiane
Peau	Epiderme	0.20-0.81	0.55	0.52	0.242-0.434	0.362
	Derme	0.24-0.53	0.37	0.39		
		Peau d'abdomen de donneurs décédés de plus de 50 ans (n=17 épiderme ; n=36 derme)			Peau de 37 donneurs de plus de 18 ans (provenant du sinus pilonidal de la région sacrée)	

Malgré les allégations « sélénite de sodium et protection de la peau » reconnues par l'EFSA (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2016) et le rôle important des sélénoprotéines dans le développement cutané (Sengupta et al., 2010), très peu d'études ont vraiment évalué l'effet protecteur du sélénite de sodium sur le vieillissement chronologique de la peau humaine. Le *TABLEAU 9* regroupe les principaux articles qui reflètent l'importance de l'apport en sélénium, dans les milieux de culture ainsi que via le sérum de veau, sur les cultures de cellules cutanées (fibroblastes et kératinocytes) et d'autres types cellulaires (humaines ou animales).

Le sélénium semble essentiel à la peau, via les sélénoenzymes. Les kératinocytes expriment 10 à 15 sélénoenzymes (Rafferty et al., 1998), cependant leurs rôles exacts dans la peau peu connu. Pour investiguer leurs rôles dans le développement et la fonction de la peau, Sengupta *et al.*, ont développé un modèle murin où l'expression de sélénoenzymes à été spécifiquement inactivée dans les kératinocytes exprimants K14. Cela conduit à des souris présentant des anomalies du développement du tissu avec des zones de discontinuité de la JDE et donc le détachement de la couche basale de l'épiderme (Sengupta et al., 2010). Il a aussi été observé

une surexpression de K6, kératine exprimé lors de la cicatrisation de l'épiderme ou dans des pathologies telles que le psoriasis. Une récente étude a mis en évidence qu'une expression prolongée de K6 induisait la formation de rides cutanées (Sano et al., 2009), ce qui explique dans le modèle murin de Sengupta *et al.*, l'apparition de rides et un relâchement de la peau. Enfin, les kératinocytes provenant de la peau de ces souris présentent une morphologie modifiée et des capacités d'adhésion compromises.

In vitro, de nombreux auteurs ont rapportés l'influence du sélénium sur la sénescence répllicative des cellules (Hornsby and Harris, 1987; Legrain et al., 2014; Wu et al., 2014). Les travaux publiés par Legrain & Chavatte utilise un modèle de fibroblastes diploïdes humains WI38 dérivés de tissu pulmonaire embryonnaire afin d'étudier la sénescence répllicative des cellules supplémentées ou non en sélénium. Différents paramètres ont été suivis tels que : l'accumulation de protéines oxydées, le raccourcissement des télomères et l'augmentation du nombre de cellules SABG (senescence associated β Galactosidase) et SAHF (senescence associated heterochromatin foci) positives (Legrain et al., 2014). Les résultats montrent qu'une carence en sélénium induit une augmentation de la production cellulaire d'espèces réactives oxygénées ce qui crée des dommages oxydatifs et l'activation de l'entrée en sénescence de la cellule par les voies de signalisation p53, p16, p21, and pRb. Lors d'une supplémentation, le nombre de cellules SAGB et SAHF positives diminue de façon très significatif par rapport à la condition sans sélénium.

La participation des sélénoenzymes a aussi été analysée, soit dans le contexte de supplémentation en sélénium soit lors de la sénescence répllicative. Une sélénoenzyme commune diminue lors de la sénescence et augmentée lors de la supplémentation a été mise en évidence : la sélénoenzyme H (SelH).

La selH a aussi été identifiée par d'autres auteurs pour son implication dans l'entrée en sénescence cellulaire de fibroblastes via le maintien de la stabilité du génôme. En effet, Wu et al., ont montrés que la SelH jouait un rôle essentiel dans la protection de la cellule face à l'entrée en sénescence en réponse au stress oxydatif ou aux dommages de l'ADN via la

signalisation par p53 (Wu et al., 2014). Cette enzyme possède un domaine spécifique qui lui confère sa fonction d'oxidoréduction dans l'instabilité du génome et en réponse au stress oxydatif (Novoselov et al., 2007). En effet cette sélénoenzyme est nucléaire et participe donc à la limitation des espèces réactives oxygénées dans le noyau de la cellule et donc à l'accumulation de dommage oxydatif de l'ADN. Les dommages oxydatifs de l'ADN font partis des modifications observées dans le vieillissement cellulaire (Gladyshev, 2014), et en ce sens cette sélénoenzyme peut être une cible potentielle pour protéger la cellule du vieillissement.

Après revue des données de la littérature, nous avons pu utiliser notre modèle de peau reconstruite sénescence pour évaluer l'effet du sélénium sur le vieillissement chronologique de la peau.

Les résultats obtenus sont présentés *CHAPITRE RESULTATS – ARTICLE N°2*

Tableau 9 : Bilan des gammes de concentrations et formes chimiques de sélénium ainsi que les modèles cellulaires utilisés

Cellules/modèle utilisé	Forme chimique	Concentrations	Conditions opératoires & résultats	Référence
Fibroblastes humains WI-38	Sélénite de sodium	4 conditions: ❖ Contrôle : 5-15 nM ❖ Déplétion : 3 nM ❖ Supplémentation de 30nM dans contrôle : 45 nM ❖ Déplétion + Sélénium: 30nM	La supplémentation avec 30nM de sélénium permet : - Retarde la sénescence répllicative des cellules WI38 (augmentation des doublements de population cumulés) - Diminue l'expression de marqueurs de sénescence (longueur des télomères, SAHF et SABG)	(Legrain et al., 2014)
Cellules souches intestinales dans un modèle de souris BALB/c	Sélénite de sodium	4 mg/kg/jour par voie orale	Activation de la prolifération des cellules souches intestinales + activation de marqueurs spécifiques Amélioration de la capacité des cellules à la formation d'organoïdes Augmentation des activités enzymatiques de la GPX et TrxR et donc protection contre le stress oxydant	(Chen et al., 2016)
Lignée de mélanome humain et Kératinocytes et mélanocytes normaux	Sélénite de sodium sélénate de sodium	0.5 – 1 – 5 – 10 µmol/L 10 – 50 – 100 – 250 – 500 µmol/L	Survie cellulaire: les deux composés ne sont toxiques qu'après 72h d'exposition Le sélénite de sodium à la plus faible concentration accélère la prolifération des kératinocytes	(Bandura et al., 2005)

<p>Fibroblastes primaires humains provenant de biopsies cutanées de donneurs jeunes adultes</p>	<p>Sélénite de sodium</p>	<p>3 conditions de milieu : - 0.59 ± 0.06 µmol/L (milieu basal) - 1.25 ± 0.11 µmol/L (↔ à la concentration plasmatique) - 3.72 ± 0.31 µmol/L (↔ 3 fois la concentration plasmatique)</p>	<p>Les fibroblastes sénescents sont plus résistants au stress oxydatif lorsqu'ils sont cultivés avec les milieux contenant plus de sélénium Cet article indique aussi que le milieu de culture de fibroblastes ne contient pas de sélénium et que le sérum de veau ajouté ne contient pas assez de sélénium pour une activité antioxydante optimale.</p>	<p>(Ghneim and Al-Sheikh, 2011)</p>
<p>Lignées cellulaires humaines : fibroblastes pulmonaires, cancer cervical, adénocarcinome colorectal</p>	<p>Utilisation de shARN pour réaliser l'extinction de l'expression de la sélénoprotéine H</p>	<p>Inhibition sévère de la prolifération, début précoce de la sénescence cellulaire et augmentation du stress oxydatif. Rôle protecteur de la sélénoprotéine H contre le stress oxydatif chronique et la sénescence répllicative des fibroblastes pulmonaires via la maintenance du génome</p>	<p>(Wu et al., 2014)</p>	
<p>Kératinocytes primaires de souris et modèle de souris KO</p>	<p>Inactivation stable de l'expression des sélénoenzymes dans les cellules exprimant spécifiquement la kératine 14</p>	<p>Les souris présentent un développement cutané anormal et une mort prématurée. D'un point de vue histologique, la peau présente des défauts de différenciation terminale mais aussi des détachements de l'épiderme au niveau de la jonction dermo-épidermique. Les kératinocytes extraits de ces peaux de souris présentent des défauts d'expression des protéines d'adhésion ainsi qu'une accumulation de ERO.</p>	<p>(Sengupta et al., 2010)</p>	

Cellules adréno-corticales bovines	Sélénite sodium	de 20 nM	Utilisation des cellules bovines comme modèle de sénescence répllicative En présence de sélénium dans le milieu de culture dès le début des cultures, il est possible de réaliser 4 passages supplémentaires, soit une légère amélioration de la sénescence répllicative L'augmentation du potentiel clonogénique en présence de sélénium est liée à la prévention de la mort cellulaire qui résulte d'un faible niveau de toxicité lié au peroxyde en condition de culture dite « clonale ».	(Hornsby and Harris, 1987)
Mélanocytes primaires Kératinocytes primaires Hacat	Sélénite sodium	1 à 200nM (10nM)	Sélénite de sodium plus toxique que la sélénométhionine	(Rafferty et al., 1998)
	Sélénométhionine	10 nM à 1 µM (50-100nM)	Sélénite de sodium plus efficace en agent protecteur contre les UVB ; la dose optimale étant de 10 nM	
Fibroblastes humains	sélénite sodium	de 0-5µM	Sur les fibroblastes, sélénite de sodium plus toxique que la sélénométhionine. A des doses inférieures à 1µM (dose maximale non toxique) le sélénite de sodium induit l'activité de la GPX1 et de la SelW1, ce qui prouve son action anti oxydante.	(Hazane-Puch et al., 2014)

OBJECTIFS

Les objectifs de mon travail de thèse ont été variés, mais toujours en utilisant des modèles de de peau reconstruite pour en comprendre son vieillissement, et ont permis d'aboutir à 3 parties qui seront présentées comme suit :

Le **premier chapitre** est l'identification de marqueurs moléculaires du vieillissement de l'épiderme à partir du modèle de peau reconstruite sénescence. L'objectif de ce projet était d'identifier un ou plusieurs microARN spécifiquement liés à l'âge. Les microARNs sont des ARN non codants et sont reconnus pour jouer un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie épidermique (Banerjee et al., 2011). Un criblage haut débit a été réalisé sur des kératinocytes primaires humains de sujets jeunes ou âgés. Un microARN a été mis en évidence modulé dans le vieillissement, le miR-30a et son mécanisme d'action a été exploré.

J'ai participé à ce travail via la production des peaux reconstruites sénescences, et j'ai choisi d'inclure cet article dans mon manuscrit de thèse afin de présenter un exemple d'utilisation des modèles de peaux reconstruites.

Cette collaboration a été publiée en novembre 2017 dans le journal AGING.

« An expression screen for aged-dependent microRNAs identifies miR-30a as a key regulator of aging features in human epidermis ». Charlotte Muther, Lara Jobeili, Maelle Garion, Odile Damour, Jérôme Lamartine. Article publié dans Aging

Le **deuxième chapitre** concerne l'analyse de l'efficacité « anti-âge » du sélénium sous la forme sélénite de sodium Oligsol fournit par LABCATAL.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet d'une supplémentation en sélénium sur le vieillissement de la peau, en particulier sur les kératinocytes, principales cellules de l'épiderme. Le sélénium, co facteur des sélénoenzymes possède une activité antioxydante et est impliqué dans la physiologie cutanée (Kanekura et al., 2005; Sengupta et al., 2010). Pour cela, des kératinocytes primaires cultivés en monocouche jusqu'à la sénescence répliquative ainsi que le modèle de peau reconstruite sénescence ont été utilisés.

Ce travail a été valorisé par la publication d'un article dans le journal AGING en novembre 2017.

« **Selenium preserves keratinocyte stemness and delays senescence by maintaining epidermal adhesion** ». *Lara Jobeili, Patricia Rousselle, David Béal, Eric Blouin, Anne-Marie Roussel, Odile Damour and Walid Rachidi.*

La **troisième partie** présente des résultats préliminaires sur le développement et la caractérisation d'un modèle de peau reconstruite préparé avec les fibroblastes provenant d'un donneur unique et particulièrement sur l'analyse du tissu élastique.

La mise à disposition de fibroblastes provenant d'un même donneur à différents âge de sa vie (entre 36 et 72 ans) nous a permis de mettre en place un modèle unique de peau reconstruite permettant de se dédouaner de l'impact de la variabilité interindividuelle. L'influence des fibroblastes a été évaluée sur la qualité et la fonctionnalité du tissu élastique.

Dans un souci de clarté, j'ai choisi de consacrer quelques pages au « matériels et méthodes » utilisé au cours de ces divers projets et particulièrement aux techniques d'imagerie et d'analyse quantitative ou semi quantitative qui m'ont permis d'extraire des données chiffrées de mes images. Chaque partie de résultat pourra être précédée d'une partie consacrée au protocole spécifique.

MATERIEL ET METHODES

I. CULTURE CELLULAIRE

Toutes les cellules utilisées au cours de ce travail sont des cellules primaires, extraites de peaux humaines normales obtenues auprès du Centre de Ressources Biologiques de la BTC/HCL conformément à la réglementation française (autorisation DC n°2008162) incluant le consentement du patient.

L'utilisation de cellules d'autre provenance sera précisé et suivra les mêmes règles de culture.

A. MILIEUX DE CULTURE

- *Milieu de culture des fibroblastes = MCF*

Composants	Concentrations
DMEM/Glutamax	qsp
Sérum de veau	10 %
Pénicilline	100 UI/mL
Gentamycine	20 µg/mL
Amphotéricine B	1 µg/mL

- *Milieu de culture de kératinocytes = MCK*

Composants	Concentrations
DMEM/Glutamax	qsp
Ham f12	qsp
Sérum de veau fœtal	10 %
Hydrocortisone	0,4 µg/ml
Umuline	0,12 UI/ml
Isuprel	0,4 µg/ml
Adénine	24,3 µg/ml
Tri iodo thyronine	2 nM
EGF (extemporanément)	10 ng/ml
Amphotéricine B	1 µg/ml
Pénicilline	100 UI/ml
Gentamycine	20 µg/ml

- Milieu pour la culture du Derme Equivalent (MCDE)= MCF + EGF + Vitamine C
- Milieu pour la culture de la peau reconstruite en immersion (MCPR) = MCK + Vitamine C
- Milieu de différenciation des kératinocytes -utilisé pour l'interface air/liquide (MAL)

Composants	Concentrations
DMEM/Glutamax	qsp
HAM F12	qsp
BSA	8 mg/ml
Hydrocortisone	0,4 µg/ml
Umuline	0,12 UI/ml
Amphotéricine B	1 µg/ml
Pénicilline	100 UI/ml
Gentamycine	20 µg/ml
Vitamine C	50 µg/ml

B. EXTRACTION DES CELLULES

La peau décontaminée dans du DMEM supplémenté en antibiotiques (pénicilline à 500 UI/ml, Amphotéricine B à 4µg/ml, Gentamycine 50µg/ml) est découpée en fines bandelettes et incubée dans de la dispase (Sigma, St Quentin Fallavier, France) pendant 3h à 37°C, enzyme qui va permettre la séparation dermo-épidermique.

FIBROBLASTES : Les morceaux de derme obtenus sont traités à collagénase (Roche, Indianapolis, USA) à 0,5 mg/ml, sous agitation, pendant 4 à 6 heures à 37°C afin de digérer la matrice extracellulaire et ainsi permettre la libération des fibroblastes.

KERATINOCYTES : Les morceaux d'épiderme sont traités par la trypsine-EDTA 0,05% (Thermo Fisher) à 37°C pendant 15 minutes. Après agitation douce par aspiration refoulement, la suspension cellulaire est filtrée.

Les cellules sont comptées sur une cellule de Malassez après coloration au bleu de trypan, colorant vital, qui permet de différencier les cellules vivantes des cellules mortes.

A l'extraction, les kératinocytes et fibroblastes sontensemencés à la densité de 20 000 à 40 000 cellules/cm².

C. CULTURE EN MONOCOUCHE

Les FIBROBLASTES,ensemencés à 8 – 10 000 cellules/cm², sont cultivés dans du MCF à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO₂ jusqu'à confluence ou pendant 7jours.

Les KERATINOCYTESensemencés à 8 – 10 000 cellules/cm², sont cultivés jusqu'à pré-confluence dans du MCK à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO₂ sur couche nourricière de fibroblastes irradiés à 60 gray et préalablementensemencée à 4 000 cellules/cm².

Quel que soit le type de culture, les milieux sont changés trois fois par semaine puis les cellules sont remises en suspension par incubation dans la trypsine-EDTA à 0,05% jusqu'à complète dissociation et réensemencées pour être amplifiées et ainsi de suite jusqu'au passage désiré. A chaque passage les cellules sont utilisées et/ou congelées pour une utilisation ultérieure.

D. TEST DE CLONOGENICITE

Le CFU « colony forming unit » permet de déterminer le potentiel clonogénique de différentes souches de kératinocytesensemencés à densité clonale (10 et 20 cellules/cm²). Après 10 et 15 jours de culture selon la taille des colonies, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde à 4% et colorées à la rhodamine durant 30 min. Pour chaque test, 6 flasques sontensemencées, 3 pour le calcul du CFU/CFE, 3 pour le calcul du doublement de population et taux de croissance. Le CFU correspond au nombre de colonies (holoclones + meroclones). Le CFE est le pourcentage de cellules ayant formé des colonies, il est calculé avec la formule suivante :

$$CFE = \frac{CFU}{Innoculum} * 100$$

Pour le calcul du taux de croissance, les cellules détachées de 3 flasques sont comptées. Le taux de croissance TC correspond au nombre de doublement de population PD par jour de culture : TC= (PD/nombre de jour de culture). Le PD peut être calculé sur les cellules lors de culture à densité clonale ou à densité usuelle.

Avec $PD = \frac{\ln(N/N_0)}{\ln(2)}$ (N =nombre de cellules récoltées et N_0 =nombre de cellules ensemencées) ou $PD = \frac{\ln(\text{Nombres de cellules}/\text{nombre de clones})}{\ln(2)}$ (pour un ensemencement à densité clonale).

E. MODELES DE CULTURE EN 3D

Deux modèles de PR ont été utilisés dans ce document: avec et sans substrat dermique. Quel que soit le modèle de culture 3D, la préparation se fait selon les mêmes séquences et la même cinétique à partir des cellules préalablement amplifiées en monocouche (FIGURE 37).

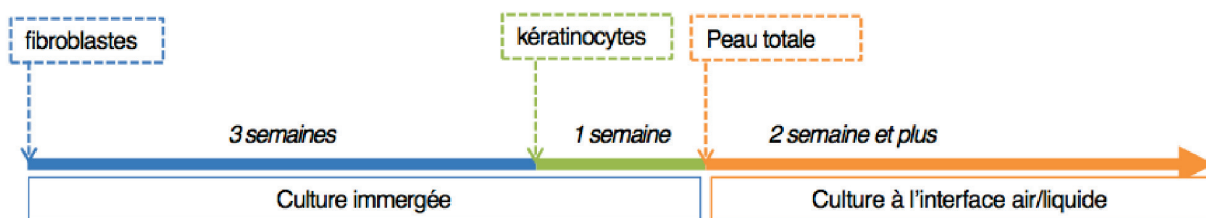


Figure 37: représentation simplifiée de la cinétique de préparation des peaux reconstruites

1. MODELE SUR EPONGE PORREUSE

Le substrat dermique développé et breveté au Laboratoire des Substituts Cutanés est composé d'un mélange à base de collagène bovin de type I et III (72%), de glycosaminoglycanes (8%) réticulés par du chitosan (20%) et lyophilisé. Il sert de support à la reconstruction du derme équivalent après ensemencement des fibroblastes à la densité de 250 000 cellules/cm² dans du MCDE. Il est cultivé durant 21 jours avec ajout dès le premier changement de milieu de l'EGF et de la vitamine C extemporanément. Les milieux sont changés chaque jour y compris le samedi et le dimanche.

Après 21 jours de culture, les kératinocytes sont ensemencés à la surface du derme équivalent à la densité de 250 000 cellules/cm², et cultivé 1 semaine supplémentaire en MCPR avant d'être émergé. L'élévation à l'interface air/liquide permet la différenciation et stratification des kératinocytes. Les PR sont cultivées dans du MAL pendant le temps défini dans chaque protocole. Le milieu est alors changé trois fois par semaine jusqu'à l'arrêt des cultures où les échantillons sont fixés et inclus pour analyses.

2. *MODELE SANS SUBSTRAT DERMIQUE OU AUTO-ASSEMBLE*

Les fibroblastes sontensemencés sur la membrane polyester de porosité de 0,4 μm d'un insert. Toutes les étapes de cultures sont les mêmes, mais la densité est de 40 000 cellules/cm², pour les fibroblastes comme pour les kératinocytes

Quel que soit le modèle, le temps de culture, les cellules et le type de fixation, au minimum n=3 peaux reconstruites sont prévues pour chaque condition.

II. ANALYSES HISTOLOGIQUES ET IMMUNO-HISTOLOGIQUES

L'histologie et l'immuno-histologie sont réalisés sur les peaux reconstruites après arrêt des cultures et fixation des échantillons en paraformaldéhyde à 4% (PFA) ou congélation puis inclusion en Tissu Teck (OCT). Les échantillons fixés à la PFA subissent un cycle de déshydratation pour être inclus en paraffine.

Les coupes de 5µm d'épaisseur sont déposées sur les lames SUPER FROST ULTRA PLUS. La coloration à l'Hématoxyline-Phloxine-Safran (HPS) réalisée sur les coupes paraffines par le laboratoire d'Anatomo-Pathologie des Hospices Civils de Lyon permet d'observer la morphologie générale des échantillons.

Les marquages, sont réalisés soit sur coupe paraffine soit sur coupe congelée en fonction de la spécificité de l'anticorps (*TABLEAU 10*).

Pour les coupes paraffine:

La première étape consiste à déparaffiner les coupes grâce à la succession de trois bains de méthylcyclohexane, deux bains d'éthanol absolu, un bain d'éthanol 95° et un bain d'éthanol 70° durant 5 minutes chacun. Les lames sont ensuite réhydratées pendant 30 minutes à l'eau courante. Un démasquage des sites antigéniques est suivi d'un traitement à l'eau oxygénée pour inhiber l'action des peroxydases endogènes. Les coupes sont alors incubées dans une solution de saturation composée de PBS-BSA à 4%. Puis, l'anticorps primaire est appliqué 1h à température ambiante ou O/N à 4°C. Après 3 rinçages, l'anticorps secondaire correspondant est incubé pendant 45 min à température ambiante. Pour une révélation en fluorescence, l'anticorps secondaire est couplé à un fluorochrome et les noyaux sont colorés avec un intercalant de l'ADN (Hoechst 33342 ThermoFisher Scientifique). Dans le cas d'une révélation dans le visible par histochimie, l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase chromophore (Envision, Dakocytomation, Glostrup, Denmark), la révélation est réalisée par l'ajout du substrat 3,3-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB), puis le reste du tissu est contre-coloré avec de l'hématoxyline de Harris. Enfin, le montage des coupes entre lame et lamelle est réalisé à l'aide d'un milieu de montage aqueux (Dako Faramount Aqueous Mounting Medium) ou spécifique pour la fluorescence.

Pour les coupes congelées :

Après séchage des lames à l'air, les coupes sont fixées par de l'acétone, du méthanol ou de l'éthanol glacial durant 10 min puis rincées. Comme précédemment, elles sont incubées dans une solution de saturation composée de PBS-BSA à 4%. Puis, l'anticorps primaire est appliqué 1h à température ambiante ou O/N à 4°C. Après 3 rinçages, l'anticorps secondaire correspondant est incubé pendant 45 min à température ambiante. La révélation se fait uniquement en fluorescence.

Après séchage des lames à plat, les images sont réalisées à l'aide d'un microscope optique ECLIPSE 50i (Nikon) ou via un microscope confocal Zeiss LSM 510.

Tableau 10 : synthèse des anticorps utilisés et principales caractéristiques (fabricant, clone et réactivité, type de fixation et dilution utilisée)

<i>Anticorps</i>	<i>Fabricant</i>	<i>Clone et réactivité</i>	<i>Type d'échantillon</i>	<i>dilution</i>
<u>αSMA</u>	<i>Novotec</i>	<i>Asm-1 - Monoclonal souris</i>	<i>paraffine</i>	<i>1/1000</i>
<u>Collagène I</u>	<i>Novotec</i>	<i>Polyclonal lapin</i>	<i>OCT</i>	<i>1/500</i>
<u>Collagène de type III</u>	<i>Novotec</i>	<i>8D1-8C7 - Monoclonal souris</i>	<i>OCT</i>	<i>1/250</i>
<u>Cytokératine K15</u>	<i>Thermofischer</i>	<i>LKH15 - monoclonal souris</i>	<i>paraffine</i>	<i>1/20</i>
<u>Décorine</u>	<i>Abcam</i>	<i>Monoclonal souris</i>	<i>paraffine</i>	<i>1/1000</i>
<u>Elastine</u>	<i>Novotec</i>	<i>Polyclonal lapin</i>	<i>OCT</i>	<i>1/100</i>
<u>Fibrilline</u>	<i>Neo-markers</i>	<i>11C1 - Monoclonal, souris</i>	<i>OCT</i>	<i>1/100</i>
<u>Fibulin 5</u>	<i>Sigma</i>	<i>Polyclonal lapin</i>	<i>Paraffine</i>	<i>1/200</i>
<u>Filaggrine</u>	<i>Novocastra</i>	<i>15C10 - Monoclonal souris</i>	<i>paraffine</i>	<i>1/25</i>
<u>Integrine β1</u>	<i>Santa Cruz</i>	<i>P5D2 – Monoclonal souris</i>	<i>OCT</i>	<i>1/100</i>
<u>Integrine α6</u>	<i>Millipore</i>	<i>NIK-GoH3 – Monoclonal rat</i>	<i>OCT</i>	<i>1/500</i>
<u>Ki67</u>	<i>Dako</i>	<i>MIB1 – Monoclonal souris</i>	<i>Paraffine</i>	<i>1/50</i>
<u>Laminine 5</u>	<i>Chemicon</i>	<i>Ms X Hu clone P3H9-2</i>	<i>OCT</i>	<i>1/100</i>
<u>Loricrine</u>	<i>Abcam</i>	<i>Monoclonal lapin</i>	<i>Paraffine</i>	<i>1/500</i>
<u>Lysyl oxidase Lox</u>	<i>Abcam</i>	<i>PHD1</i>	<i>OCT</i>	<i>1/300</i>
<u>MFAP4</u>	<i>Sigma</i>	<i>Polyclonal Lapin</i>	<i>Paraffine</i>	<i>1/50</i>
<u>LTBP1</u>	<i>Abcam</i>	<i>Polyclonal lapin</i>	<i>OCT</i>	<i>1/250</i>

III. ANALYSE QUANTITATIVE D'IMAGE

Afin de bien comprendre comment peuvent être analysées des images de microscopie, j'ai choisi d'introduire un rappel sur la composition d'une image numérique et les informations susceptibles d'être extraites. Une fois les bases posées il sera plus facile de comprendre les méthodes et outils utilisés pour analyser les images et obtenir des données chiffrées qu'il est possible d'exploiter de façon quantitative ou semi quantitative.

A. COMPOSITION D'UNE IMAGE NUMERIQUE – PREAMBULE A L'ANALYSE QUANTITATIVE

Une image numérique est définie comme une succession de points nommés pixels (**picture elements**). Dans un ordinateur, les données (les couleurs) sont stockées en codage binaire.

Le codage binaire en bit représente le nombre de niveau de couleur possible. De façon simplifiée pour le codage 1 bit, deux valeurs sont possibles 0 (noir) ou 1 (blanc). Pour un codage 8 bits, il y a 2^8 valeurs possibles en niveau de gris soit 256 (*FIGURE 38*). Par convention, le 0 correspond toujours au noir et la valeur du blanc est 255 (256 ème valeur).

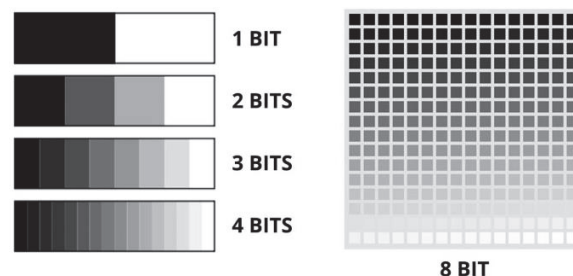


Figure 38 : illustration des niveaux de gris en fonction des codages de 1bit à 8bits

Ainsi un codage 16 bits permet 65 536 ($=2^{16}$) niveaux de gris et un codage 32 bits permet 4 294 967 296 ($=2^{32}$) niveaux de gris. Une image aura donc une plus grande résolution si elle est codée en 32 bits plutôt qu'en 8 bits. Cependant l'œil n'est pas capable de distinguer plus de 100 nuances de gris. La *FIGURE 39* représente 3 images différentes de même taille en termes de pixels représentées par un dégradé de pixels de la valeur la plus faible à la valeur la plus haute. Chaque image est de résolution différente de 32 à 8 bits et donc de taille en octet décroissante. Pour autant, à l'œil les 3 images sont identiques.



Figure 39: illustration d'une image en niveau de gris en 32, 16 et 8bits

L'image est ensuite colorisée selon un codage informatique des couleurs. Le plus utilisé est l'espace colorimétrique rouge-vert-bleu (RVB ou RGB en anglais). Le principe est une synthèse additive des couleurs pour obtenir un mélange des 3 composantes rouge vert ou bleu par une valeur allant de 0 à 255. Ainsi pour une image en 8 bits, il est possible d'avoir une combinaison de $256 * 256 * 256$ possibilités soit plus de 16 millions de couleurs. Par exemple sur cette même image convertie en RVB, le point affiché a pour valeur de R=190 de V=190 et de B=190.

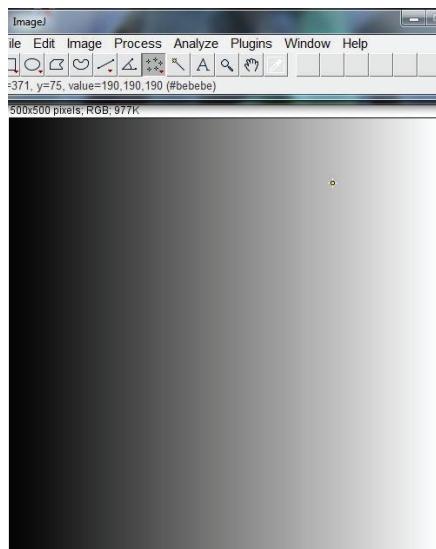


Figure 40: exemple d'une image en format RVB et des valeurs d'un point selon les 3 composantes colorimétriques

Les images sous ce format sont très lourdes, ce qui nécessite donc un grand volume de stockage. Pour éviter ce problème, les images sont stockées sous format bits. Il est alors possible d'appliquer à une image une palette de couleurs.

On parle alors de couleurs indexées : la valeur d'un pixel n'est plus représentée par sa nuance de gris mais par une couleur correspondante à cette même valeur dans une palette de couleur définie en amont. Ce sont des LUT de couleur ou « look-up table » (FIGURE 41). Le programme Image J, utilisé ici, utilise un grand nombre de LUT préenregistrées mais avec la possibilité d'en créer à façon. Il faut retenir que l'attribution d'une LUT à une image en niveaux de gris ne change en rien la valeur des pixels. Ces LUT sont principalement utilisés pour mettre en évidence des détails ou caractéristiques d'une image sans altérations des données. Comme l'œil humain est plus sensible à certaines longueurs d'ondes (de 500nm correspondant au turquoise à 650nm correspondant à l'orange), la coloration par une LUT peut rendre accessible à l'œil certaines informations plus difficilement perceptibles en nuances de gris.

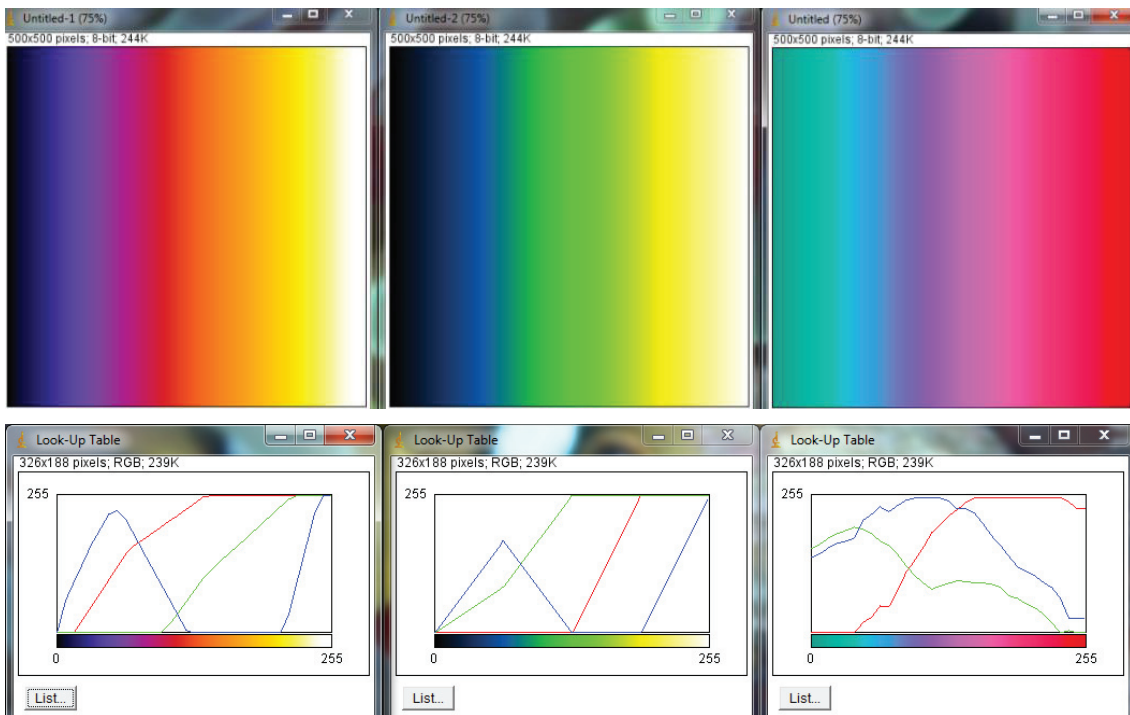


Figure 41: exemple de LUT appliquées à une image 8bit (Fire – Green Fire Blue – Ice) et les histogrammes associés

Pour résumer, une image est donc composée de pixels, codés en niveau de gris du noir au blanc avec une échelle de nuance en fonction du codage en bit. Les pixels peuvent être colorisés pour l'illustration selon les « conventions » scientifiques ou pour mettre en évidence certains détails de l'image.

Une image provenant d'un microscope à fluorescence sera composée de plusieurs images en niveau de gris correspondant aux différents canaux, compilés et colorisés pour donner l'image combinée.

Une image prise dans le visible par un microscope optique est une image en RVB ou chaque pixel est codé par la valeur du point dans les trois composantes colorimétriques.

B. PARAMETRES ANALYSES ET PROCESSUS SUIVIS

Le traitement et l'analyse des images ont été effectués en utilisant le logiciel libre de droit « Image J ». Chaque procédé d'analyse a été détaillé en annexes, sous la forme d'une « fiche technique » explicative avec le processus suivi et les étapes de l'analyse.

Tous les processus présentés ci-après doivent :

- Ne pas dénaturer les valeurs de pixels de l'image initiale
- Permettre de mettre en évidence le paramètre qui sera quantifié
- Subir le même traitement de segmentation, seuillage et analyse dans une même série d'image.

Pour la quasi-totalité des analyses, les images ont besoin d'être prétraitées. Cela comporte :

- une étape de segmentation : permet de séparer les canaux d'une image fluorescente (rouge bleu vert) ou les couleurs d'une image prise dans le visible (soit en appliquant des critères à façon ou prédéterminés dans image J, ou alors en jouant sur la saturation). Le but ici est d'essayer d'isoler au maximum les pixels d'intérêt du reste de l'image.
- une étape de seuillage : permet de ne sélectionner que les pixels correspondants de façon spécifique au marquage et d'éliminer ceux correspondants à de l'auto-fluorescence ou à du bruit du fond.

Ces deux étapes critiques appliquées à toutes les images d'une même série de façon rigoureusement identique sont indispensables à la qualité de l'analyse.

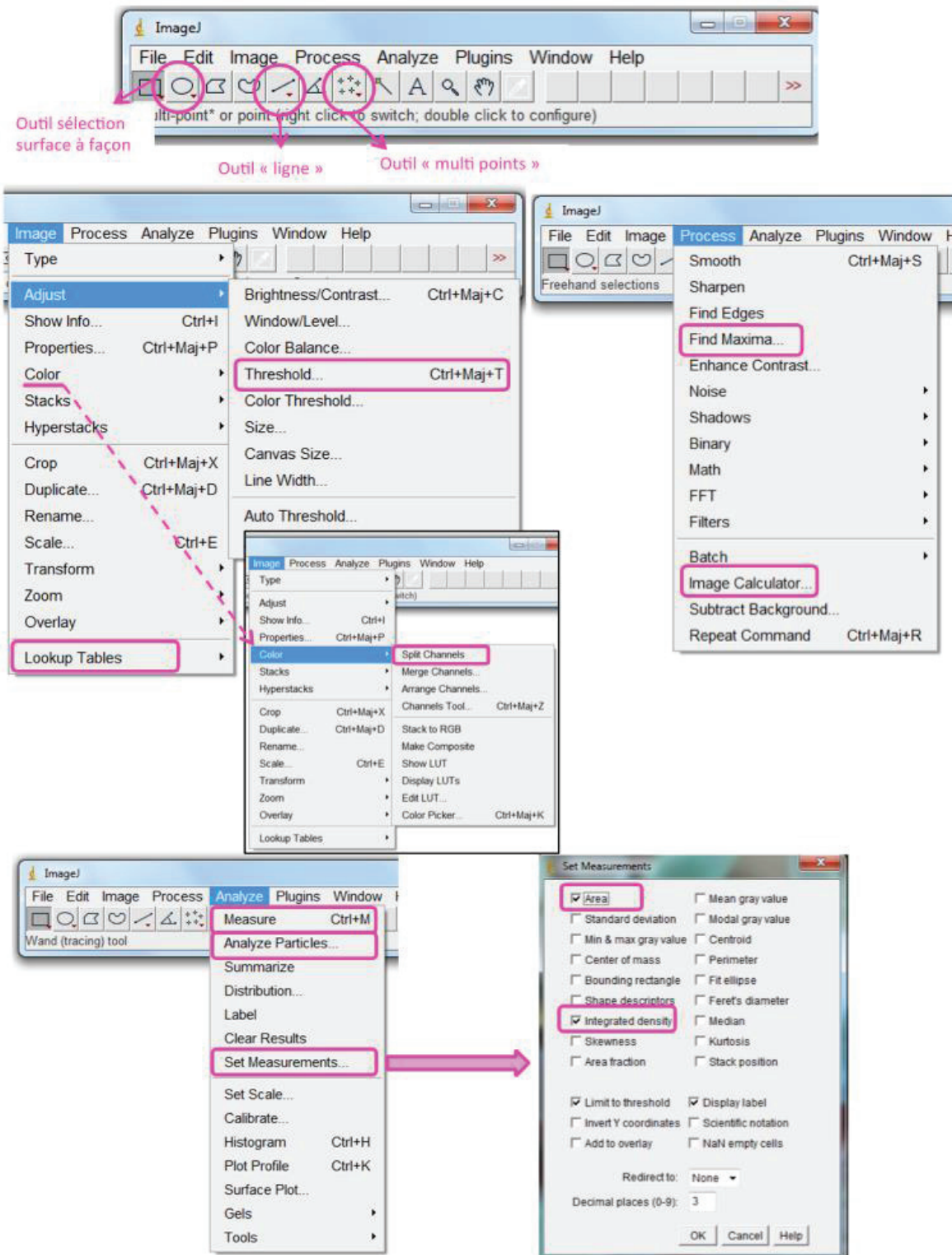


Figure 42: Capture d'écran des différents menus d'image J. Les encadrés en rose montrent les fonctions utilisées pour les diverses quantifications réalisées au cours de ce travail.

La *FIGURE 42* met en évidence les outils les plus utilisés dans ce document

- ✓ Sélection à façon : cet outil permet de créer une sélection de la forme souhaitée à l'aide d'un pointeur de diamètre réglable
- ✓ Outil ligne : trace une ligne uni ou multi point
- ✓ Sélection multi points : permet de sélectionner plusieurs points pour des comptages par exemple
- ✓ Color – split channels : permet de séparer une image en plusieurs images en fonction de la couleur
- ✓ Threshold : seuil
- ✓ Look up Tables : table de correspondance des couleurs
- ✓ Find Maxima : permet une détection automatique dans l'image des maxima c'est-à-dire des pixels ayant une intensité maximale, il est possible de régler la tolérance pour considérer des pixels seul ou des groupes de pixels
- ✓ Image calculator : permet de réaliser des « opérations » sur des images. C'est un outil qui permet de trouver sur une image, par exemple, les pixels présents au même endroit de l'image mais sur deux canaux différents (vert et rouge) et donc de faire de la colocalisation de pixels.
- ✓ Analyze particules : permet d'analyser des objets dans une image binaire ou après application du seuil, par exemple des noyaux.
- ✓ Measure : réalise la mesure en fonction des cases cochées dans « set measurements »
- ✓ Set measurements : fenêtre permettant de choisir les paramètres qui vont être analysés lors de la mesure
- ✓ Area : surface/aire
- ✓ Integrated density : Calcule et affiche deux valeurs:
 - « IntDen » : produit de la mesure de l'aire et Mean Grey Value
 - « RawIntDen » : somme des valeurs de chaque pixel dans l'image ou la sélection

Le *TABLEAU 11* récapitule le type de mesure, l'utilisation d'un seuil ou d'un normalisateur pour les différentes analyses réalisées sur les images de microscopie.

Tableau 11 : récapitulatif des anticorps et des paramètres analysés pour la quantification des expressions protéiques (Surface exprimée en pixel ou μm^2)

<u>Paramètre analysé</u>	<u>Type de mesure</u>	<u>Seuil</u>	<u>Normalisateur</u>	<u>Unité d'expression</u>
Epaisseur épiderme vivant	Mesure de longueur	Non	NA	μm
Epaisseur de derme	Mesure de longueur	Non	NA	μm
Nombre de cellules exprimant Ki67	Comptage des cellules	Non	NA	Nombre de cellules
Nombre de cellules exprimant p16INK4A	Comptage des cellules	Non	NA	Nombre de cellules
Intégrine a6	Integrated density	Oui	Longueur JDE	Unité Relative (UR)
Intégrine b1	Integrated density	Oui	Longueur JDE	UR
Cytokératine 15	Integrated density	Oui	Longueur JDE	UR
Filaggrine	Surface	Oui	Surface épiderme vivant	Pourcentage de surface
Loricrine	Surface	Oui	Surface épiderme vivant	Pourcentage de surface
Collagène de type I	Surface	Oui	Nombre de noyaux ou surface	Surface en $\mu\text{m}/\text{noyau}$ ou UR
Collagène de type III	Surface	Oui	Nombre de noyaux ou surface	Surface en $\mu\text{m}/\text{noyau}$ ou UR
Elastine	Surface	Oui	Nombre de noyaux ou surface	Surface en $\mu\text{m}/\text{noyau}$ ou UR
Fibrilline	Surface	oui	Nombre de noyaux ou surface	Surface en $\mu\text{m}/\text{noyau}$ ou UR
Lysyl oxidase	Surface	oui	Nombre de noyaux ou surface	Surface en $\mu\text{m}/\text{noyau}$ ou UR
LTBP1	Surface	oui	Nombre de noyaux ou surface	Surface en $\mu\text{m}/\text{noyau}$ ou UR
αSMA	Nombre de cellules positives	Non	Nombre de noyaux	Pourcentage de cellule positive

IV. ANALYSES STATISTIQUES

Pour chaque expérimentation, les résultats ont été analysés par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (logiciel GraphPrism). Les résultats ont été considérés significativement différents pour $p < 0,05$ * ; $p < 0,005$ ** et $p < 0,0005$ ***.

RESULTATS

CHAPITRE N°1

ROLE DU MICRO ARN MIR-30A COMME REGULATEUR DANS LE VIEILLISSEMENT DE L'EPIDERME HUMAIN

L'objectif de ce travail était d'identifier un ou plusieurs microARN qui seraient dérégulés dans les kératinocytes âgés. Grâce à la collaboration avec l'équipe du Professeur Lamartine, j'ai participé au projet en produisant les peaux reconstruites sénescences, qui ont permis à Charlotte Muther, doctorante, de réaliser l'analyse des microARNs et des mécanismes d'action. Parmi les 6 microARNs dérégulés identifiés sur des kératinocytes en monocouche, le miR-30a a été sélectionné car il est impliqué dans de nombreux processus biologiques. Dans le modèle de sénescence in vitro, nous avons montré que les peaux reconstruites surexprimaient miR-30a.

Pour confirmer l'impact de miR-30a sur le vieillissement, des épidermes 3-D ont été préparés avec des kératinocytes le sur-exprimant de façon stable, après transfection avec un gène rapporteur inducible, tout en contrôlant la différenciation terminale (marquage des protéines de différenciation terminale), la fonction barrière (mesure de la perte insensible en eau) et l'apoptose (test tunnel). Enfin, pour aborder le mécanisme d'action de ce miR-30a, ses gènes cibles ont été recherchés. La séquence du miR-30a a été retrouvée par alignement sur plusieurs gènes cibles de l'épiderme tels que les gènes de LOX (codant pour la lysyl oxydase, régulateur de la balance prolifération/différenciation des kératinocytes), IDH1 (codant pour l'isocitrate déshydrogénase, enzyme du métabolisme cellulaire) et AVEN (codant pour un inhibiteur de caspase). Leurs expressions ont été recherchées dans les épidermes reconstruits.

Ces travaux ont permis d'aboutir à l'identification du miR-30a dans le vieillissement cutané. Les épidermes reconstruits sur-exprimant le miR-30a, ont eu pour conséquences i) une perturbation de la différenciation terminale (absence d'expression de loricine et d'involucrine); ii) une perte de la fonction barrière et iii) l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques. Toutes ces perturbations correspondent à celles décrites lors du vieillissement cutané. Ce miR-30a pourrait être une cible pour le développement de nouvelles stratégies anti-âge focalisées sur l'épiderme. Ainsi, l'utilisation du modèle de peaux reconstruites sénescences associés à l'utilisation des techniques et données récentes de la biologie moléculaire permettent d'approfondir la connaissance du vieillissement cutané et spécifiquement ici de l'épiderme.

An expression screen for aged-dependent microRNAs identifies miR-30a as a key regulator of aging features in human epidermis

Charlotte Muther¹, Lara Jobeili³, Maëlle Garion¹, Sandrine Heraud², Amélie Thepot², Odile Damour³, Jérôme Lamartine¹

¹Laboratory of Tissue Biology and Therapeutic Engineering, CNRS UMR5305, University Claude Bernard Lyon I, F69367 Lyon, France

²LabSkin Creations, F69003 Lyon, France

³Banque de Tissus et Cellules, Hospices Civils de Lyon, F69003 Lyon, France

Correspondence to: Jérôme Lamartine; email: jerome.lamartine@univ-lyon1.fr

Keywords: microRNA, skin, epidermis, aging, differentiation, apoptosis

Received: July 7, 2017 Accepted: November 11, 2017 Published: November 19, 2017

Copyright: Muther et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

The mechanisms affecting epidermal homeostasis during aging remain poorly understood. To identify age-related microRNAs, a class of non-coding RNAs known to play a key role in the regulation of epidermal homeostasis, an exhaustive miRNA expression screen was performed in human keratinocytes from young or elderly subjects. Many microRNAs modulated by aging were identified, including miR-30a, in which both strands were overexpressed in aged cells and epidermal tissue. Stable MiR-30a over-expression strongly impaired epidermal differentiation, inducing severe barrier function defects in an organotypic culture model. A significant increase was also observed in the level of apoptotic cells in epidermis over-expressing miR-30a. Several gene targets of miR-30a were identified in keratinocytes, including *LOX* (encoding lysyl oxidase, a regulator of the proliferation/differentiation balance of keratinocytes), *IDH1* (encoding isocitrate dehydrogenase, an enzyme of cellular metabolism) and *AVEN* (encoding a caspase inhibitor). Direct regulation of *LOX*, *IDH1* and *AVEN* by miR-30a was confirmed in human keratinocytes. They were, moreover, observed to be repressed in aged skin, suggesting a possible link between miR-30a induction and skin-aging phenotype. This study revealed a new miRNA actor and deciphered new molecular mechanisms to explain certain alterations observed in epidermis during aging and especially those concerning keratinocyte differentiation and apoptosis.

INTRODUCTION

Whatever their structure and anatomic location, tissues are vulnerable to injury and, inevitably, to aging. Skin is a prominent model for studying organ and tissue aging. Skin aging can be modulated by both intrinsic genetically programmed factors and extrinsic environmental factors such as pollution, climatic conditions or sun exposure. Intrinsic, or “chronological”, aging is the major cause of skin thinning, impacting both epidermal and dermal compartments. Dermal thinning is mainly caused by disaggregation of collagen and elastin fibers,

whereas epidermal atrophy is the result of progressive slowing of proliferation and age-related differentiation defects. UV radiation during sun exposure is the main actor in extrinsic skin aging, by direct action on nucleic acids or through generation of strong oxidative stress, damaging DNA, proteins and lipids. Moreover, UV radiation activates signal transduction pathways, leading to immune response activation, cellular senescence and tissue degradation [1]. The combination of intrinsic and extrinsic factors leads to progressive functional defects in aged skin, including impaired barrier function, delayed wound healing, and impaired cutaneous im-

immune response and sensory function. Schematically, age-related skin changes can be considered as a progressive loss of tissue homeostasis, especially in the epidermis, where the balance between keratinocyte proliferation and differentiation is carefully controlled. In the epidermis, keratinocytes proliferate in the basal layer, which is the regenerative layer, and then differentiate progressively in suprabasal layers up to a terminally differentiated state in the horny layer, where the keratinocytes known as corneocytes generate a rigid structure ensuring the barrier function of the skin. We and others have previously identified key regulators of this balance, and especially transcription factors such as GATA3, RUNX1 and P63 [2-4], some of which are down-regulated in aged skin [5]. In the past ten years, non-coding RNAs emerged as additional regulators of epidermal homeostasis, with the identification of numerous long non-coding RNAs [6] and microRNAs [7, 8] involved in the control of epidermal differentiation. MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding RNAs involved in almost all cellular processes, including proliferation, differentiation, cell-cell communication and stress response. They are single strand RNAs, between 21 and 24 nucleotides in length, able to regulate gene expression post-transcriptionally through direct binding to their target messenger RNA, usually to the 3' untranslated region of the mRNA. The involvement of miRNAs in animal aging was first demonstrated in mice, where a conditional knock-out of Dicer, a key protein in miRNA biogenesis, led to rapid onset of aging and cellular senescence [9]. Moreover, senescent associated microRNAs, identified in keratinocytes during replicative

or stress-induced senescence [10], may play a role in skin aging. However, the complex aging process is not restricted to cellular senescence, and the involvement of microRNAs in chronological epidermal aging remains poorly understood. To go further into this question, we set up a large-scale transcriptional analysis to identify miRNAs that are up- or down-regulated in keratinocytes during aging and could be involved in the emergence of the epidermal aging phenotype. We identified numerous microRNAs with age-dependent expression in keratinocytes. The study focused on miR-30a, and investigated its function in keratinocytes by stable over-expression and generation of reconstructed epidermis. We also identified new targets of miR-30a, three of which were potentially involved in the functional defects observed in aged epidermis.

RESULTS

Identification of aged-related microRNAs in human keratinocytes

To identify miRNAs exhibiting age-modulated expression, a genome-wide expression analysis was performed of primary human keratinocytes cultured from skin biopsies of healthy infants (3-6 years old, n=4), young adults (20-40 years old, n=4) and aged adults (60-71 years old, n=4). Cultured keratinocytes are a valuable model for expression screening in epidermal function, as they retain some features of the tissue they are extracted from, especially in aging and the senescence phenotype [11].

Table 1. Human microRNAs significantly modulated ($p < 0.05$ FC > 1.5) between at least 2 of the 3 groups of samples analyzed.

microRNA	Aged vs Child		Adult vs Child		Aged vs Adult	
	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value
hsa-miR-1260b	-1,87	0,0125				
hsa-miR-134-5p			4,69	0,025		
hsa-miR-138-1-3p	2,22	0,027				
hsa-miR-181a-2-3p	1,61	0,0199				
hsa-miR-181b-5p	1,54	0,0199				
hsa-miR-181d-5p	2,40	0,021	2,18	0,022		
hsa-miR-187-3p			7,27	0,016		
hsa-miR-193b-5p	1,62	0,037				
hsa-miR-1972	2,37	0,015	2,74	0,0033		
hsa-miR-200c-5p	2,20	0,0154	2,07	0,013		
hsa-miR-222-5p			4,77	0,0058		
hsa-miR-2277-3p	-2,15	0,0256				
hsa-miR-30a-3p	6,78	0,009	5,96	0,00411		

hsa-miR-30a-5p	4,65	0,007	4,4	0,0041		
hsa-miR-30c-2-3p	5,19	0,023	5,44	0,00547		
hsa-miR-30c-5p	1,92	0,01	1,78	0,0127		
hsa-miR-31-3p			1,6	0,0237		
hsa-miR-3136-5p					-1,56	0,034
hsa-miR-3195	-2,43	0,027				
hsa-miR-3197	-2,26	0,017				
hsa-miR-365a-5p	2,65	0,0074	1,88	0,021		
hsa-miR-378a-3p			-1,56	0,0111		
hsa-miR-378a-5p			-2,07	0,0177		
hsa-miR-378g			-1,53	0,0247		
hsa-miR-3911	1,92	0,04				
hsa-miR-4298	1,59	0,02088	1,54	0,0196		
hsa-miR-4443	-3,65	0,004	-2,27	0,0187		
hsa-miR-4461	1,88	0,0173				
hsa-miR-4505	-2,05	0,012				
hsa-miR-4507	-1,59	0,0157				
hsa-miR-4521			1,69	0,0119		
hsa-miR-4665-5p	-1,75	0,027				
hsa-miR-4669	2,35	0,017				
hsa-miR-485-3p	1,91	0,0161				
hsa-miR-494-3p			1,84	0,00194		
hsa-miR-543			1,89	0,006		
hsa-miR-671-3p	1,95	0,0036			1,69	0,0198
hsa-miR-671-5p	1,81	0,0389				
hsa-miR-6754-3p			-2,13	0,016		
hsa-miR-6765-5p	-1,71	0,0346				
hsa-miR-6778-5p			1,63	0,0407		
hsa-miR-6779-5p			-1,5	0,0362		
hsa-miR-6785-5p	-2,04	0,026			-1,56	0,0127
hsa-miR-6787-5p					-1,72	0,027
hsa-miR-6802-5p	-1,77	0,028			-1,56	0,01149
hsa-miR-6802-5p					-1,51	0,0114
hsa-miR-6812-5p	1,68	0,0355	1,59	0,044		
hsa-miR-6819-5p			1,5	0,0162		
hsa-miR-6824-5p					-2	0,012
hsa-miR-6831-5p	1,83	0,014	1,69	0,019		
hsa-miR-6845-5p					-1,78	0,0352
hsa-miR-6870-5p					-1,51	0,0123
hsa-miR-6893-5p			2,19	0,0377		
hsa-miR-7150	-1,84	0,029				
hsa-miR-7162-3p	1,93	0,049				

hsa-miR-7847-3p	1,64	0,03			
hsa-miR-8060	2,43	0,014		2,06	0,025
hsa-miR-934	-1,73	8,48E-05			
hsa-miR-99a-5p			-1,58	0,025	
hsa-miR-99b-5p	1,58	0,0286			

The fold changes (FC) indicated in this table correspond to the mean FC between the 2 groups of 4 samples. Empty squares correspond to non-significant modulation between the 2 groups of samples. The p-values correspond to multiple t-test with a FDR (False Discovery Rate) of 5%.

Aged: keratinocytes from 60-71 years skin samples; Adult: keratinocytes from 20-40 years skin samples; Child: keratinocytes from 3-6 years skin samples.

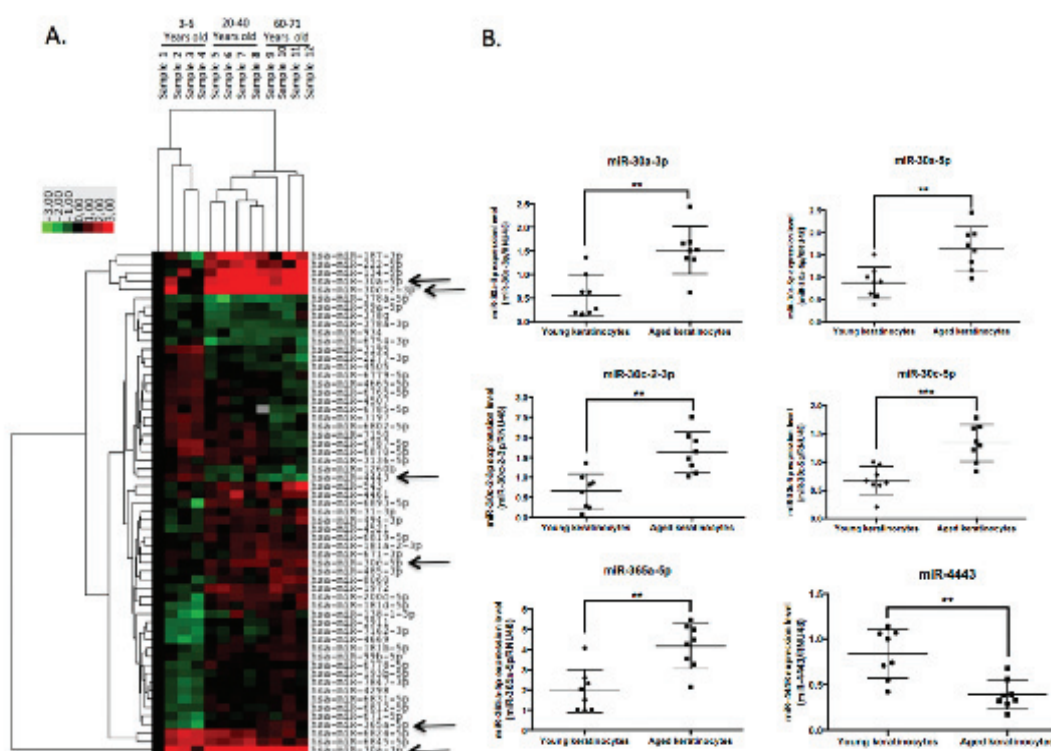


Figure 1. A large-scale expression screen identifies microRNAs modulated by aging in human keratinocytes. (A) Hierarchical clustering of miRNA differentially expressed in keratinocytes from four infants (3-6 years), four young adult (20-40 years) or four aged adults (60-71 years). Green color corresponds to underexpression and red color to overexpression. The data are normalized to the first infant sample. (B) QPCR Validation of 6 modulated microRNAs indicated by arrows in the clustering data: miR-30a-3p, miR-30a-5p, miR-30c-2-3p, miR-30c-5p, miR-365a-5p and miR-4443 expression levels were analyzed by QPCR in 8 independent cultures of keratinocytes from young and aged donors. Results are mean \pm SD from three independent samples. **P<0,01, ***P<0,001.

A mRNA microarray screening identified 60 miRNAs significantly modulated ($p < 0.05$, fold change > 1.5) between at least 2 of the 3 sample groups analyzed

(Table 1 and Figure 1A). Some of these age-associated miRNAs have been previously shown to be induced in senescent or aged keratinocytes such as miR-138, miR-

181a and miR-181b [10], strengthening the relevance of our model. Most of the modulated microRNAs were expressed differentially between the youngest group (3-6 years) and the 2 adult groups, suggesting a specific microRNA pattern in keratinocytes prepared from child skin. Six modulated microRNAs were then selected for real-time PCR validation, which confirmed significant induction of miR-30a-3p and -5p, miR-30c-5p and miR-30c2-3p and miR-365a-5p in keratinocytes from aged skin, whereas miR-4443 was significantly reduced in the aged sample (Figure 1B).

miR-30a-3p and miR-30a-5p are induced in aged epidermis

We then focused on miR-30a, both strands of which are induced in keratinocytes from aged skin. We first checked that the modulation observed in the initial

screening was not gender-related: we confirmed the overexpression of miR-30a-3p and miR-30a-5p in 3 samples of keratinocytes from adult male skin (30-50 years old) compared to keratinocytes from child foreskin (Figure 2A). To further confirm the impact of aging on miR-30a expression, independently of parameters such as the anatomic location or gender of the skin biopsy used to prepare the keratinocytes, miR-30a-3p and -5p expression was analyzed in RNA samples from long-term culture of skin equivalents mimicking chronological aging [12]. There was progressive increase in both miR-30a strands during culture, with a significant difference between D35 and D100 for both miR-30a-3p and -5p (Figure 2B). Finally, miR-30a expression in human skin was addressed by *in situ* hybridization of miR-30a-3p and -5p probes: there was clear induction of miR-30a-5p and -3p in aged skin, with staining throughout the epidermis. The expression

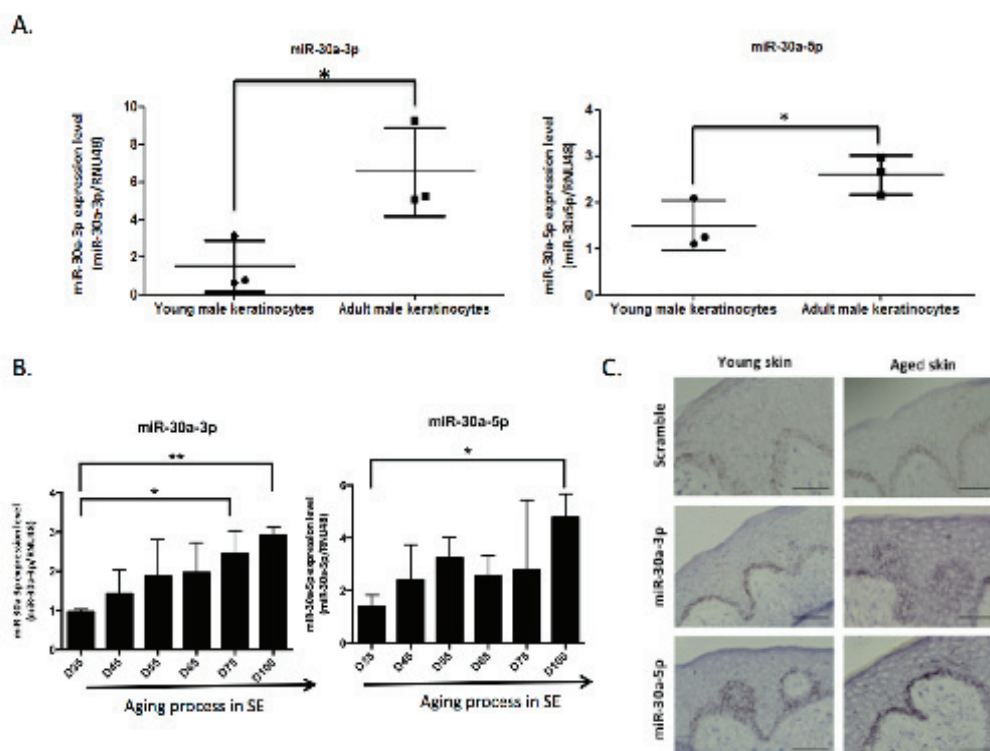


Figure 2. MiR-30a expression level during aging. The expression levels of miR-30a-3p and miR-30a-5p were evaluated by QPCR in (A) keratinocytes from infant and adult male donors and (B) skin equivalent (SE) model mimicking aging with a long time of culture: MiR-30a expression was monitored along the aging process from day 35 (D35) to day 100 (D100) of culture. For QPCR: results are mean +/- SD from three independent samples. *P< 0,05, **P<0,01. (C) The expression levels and the localization of miR-30a-3p and miR-30a-5p were evaluated by *in situ* hybridization in young and aged skin. Scale bar = 50 μ m. Representative pictures were shown.

of miR-30a-3p was faint in young skin (Figure 2C), reflecting the lower expression of the -3p compared to the 5p strand observed in cultured keratinocytes on quantitative PCR (Figure S1). We also confirmed miR-30a-3p induction in aged epidermis by QPCR (Figure S2). Taken together, these results support aged-related induction of miR-30a-3p and miR-30a-5p in cultured keratinocytes and epidermal tissue.

miR-30a over-expression impairs epidermal differentiation

We then investigated the function of miR-30a in keratinocytes. The human miR-30a gene was cloned into a lentiviral based-vector, allowing stable over-expression of both miR-30a-3p and miR-30a-5p after infection of primary human keratinocytes and stimulation by doxy-

cycline. Transduced keratinocytes were then used to generate 3D-reconstructed epidermis, which is a more realistic model of differentiation than monolayer culture. After 3 days' immersed culture, transduced keratinocytes with the miR-30a or the control vector were placed at the air/liquid interface for 14 days and transgene expression was continuously stimulated by doxycycline treatment. *In situ* hybridization confirmed strong induction of miR-30a-3p and -5p in the whole epidermal tissue (Figure 3A). The level of miR-30a-3p and -5p expression was also monitored by QPCR, and showed a mean 10-15-fold increased induction for both strands (Figure S3). Although epidermis thickness was not impacted (data not shown), examination of HES-stained tissue sections revealed an abnormal epidermis in miR-30a-overexpressing tissue, with parakeratosis, big round cells in suprabasal layers and absence of

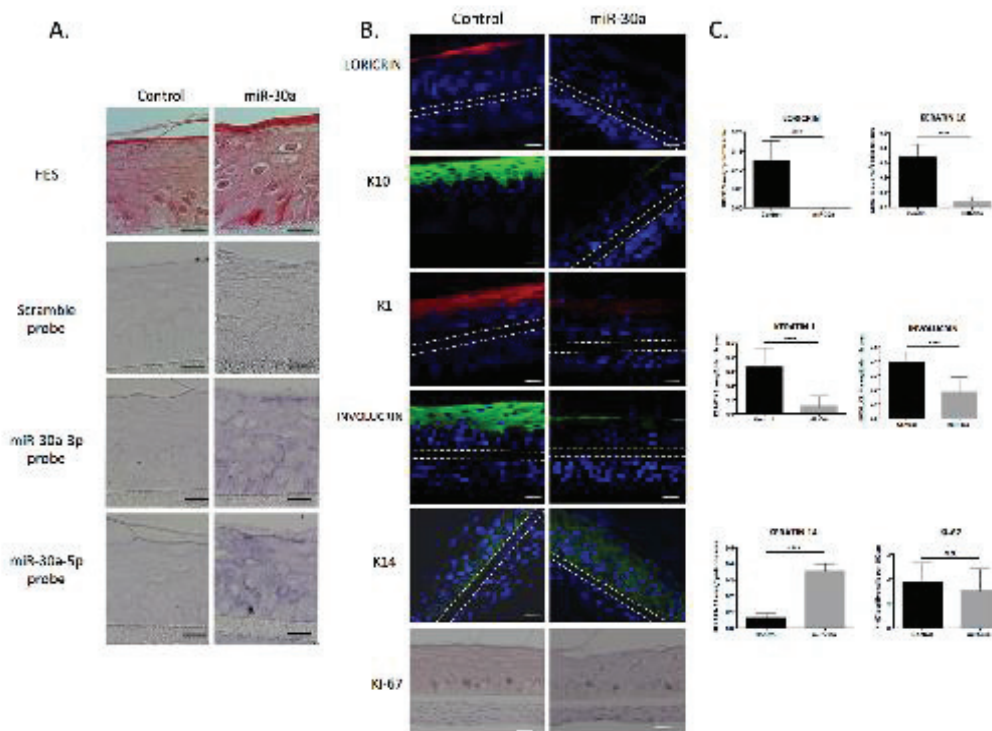


Figure 3. Characterization of reconstructed epidermis overexpressing miR-30a. Reconstructed epidermis (REs) were generated from keratinocytes transduced with the miR-30a lentiviral construction and treated by doxycycline to activate miR-30a expression. (A) Evaluation of the morphology of the REs by HES staining and confirmation of the miR-30a overexpression by *in situ* hybridization in control and miR-30a RE. (B) Immunofluorescent staining of differentiation markers (LORICRIN, K10, K1, INVOLUCRIN and K14) and immunohistochemical staining of proliferation marker (KI67) in control and miR-30a overexpressing REs. Counterstaining was performed with DAPI and the polycarbonate membrane is indicated by dotted lines. (C) Quantification of the LORICRIN, K10, K1, INVOLUCRIN and K14 labeled area in the REs and evaluation of the number of KI67-positive cells. Results are mean \pm SD from three independent samples. ***P<0,0001. ns : non-significant. Scale bar = 25 μ m. Representative photographs of 3 independent replicates were shown.

granular layer (Figure 3A). Immunofluorescence staining of several early (K1, K10) and late (INVOLUCRIN,

LORICRIN) differentiation markers confirmed that the differentiation process was severely impaired, with

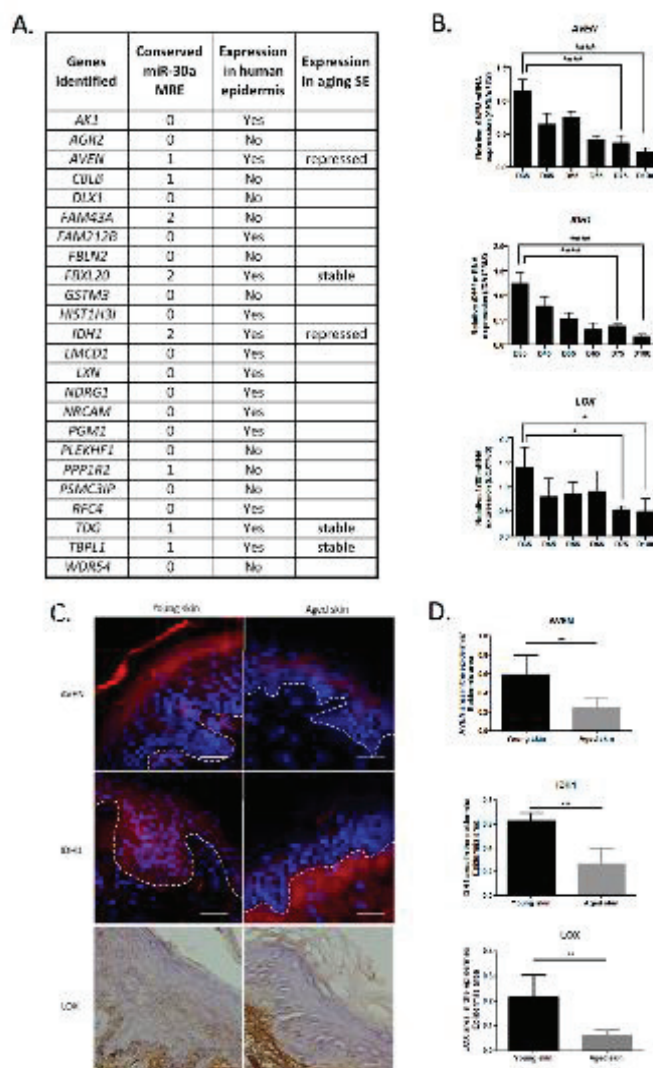


Figure 4. Identification of potential miR-30a targets in human epidermis. (A) A list of genes potentially targeted by miR-30a according to transcriptome data available in the GEO database. The number of conserved miR-30a MRE is indicated for each gene. The potential expression of these genes in human epidermis (according to the Human Protein Atlas database) is indicated. Five genes exhibiting a least one miR-30a conserved MRE and expressed in human epidermis, were analyzed by QPCR in RNA samples from skin equivalent (SE) model mimicking aging. The expression profile is indicated for these 5 genes. **(B)** The expression levels of AVEN, IDH1 and LOX were evaluated by QPCR in RNA samples from SEs mimicking aging with a long time of culture from day 35 (D35) to day 100 (D100). Results are mean \pm SD from three independent samples. * $P < 0,05$, **** $P < 0,0001$. **(C)** Expression of AVEN, IDH1 or LOX in young or old human skin sections assessed by immunofluorescence for AVEN and IDH1 and by immunohistochemistry for LOX. **(D)** Quantification of the AVEN, IDH1 and LOX labeled area in the epidermis from young or old human skin sections. Results are mean \pm SD from three independent samples. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$.

absence of staining for the granular marker LORICRIN and strongly reduced expression of K1, K10 and INVOLUCRIN. On the contrary, basal keratin K14 was expressed in almost all the miR-30a-over-expressing epidermis (Figure 3B and 3C) indicating that the differentiation process was repressed and that immature nucleated keratinocytes were still present in the suprabasal layers. Finally, keratinocyte proliferation was assessed by Ki67 immunohistochemical analysis: proliferative cells were restricted to the basal layers in both control and miR-30a-overexpressing epidermis, with no significant difference (Figure 3B and 3C). The results clearly showed that the epidermal differentiation program was impaired in miR-30a-overexpressing

tissue, whereas the proliferation process was not modified.

Identification of miR-30a gene targets in human epidermis

To decipher the molecular networks controlled by miR-30a in epidermis, we investigated potential gene targets. Transcriptome data already deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database on NCBI identified 5 transcriptome projects in which miR-30a expression was modulated (overexpression or silencing) in cultured cells. The potential targets (transcripts repressed after miR-30a overexpression or induced after

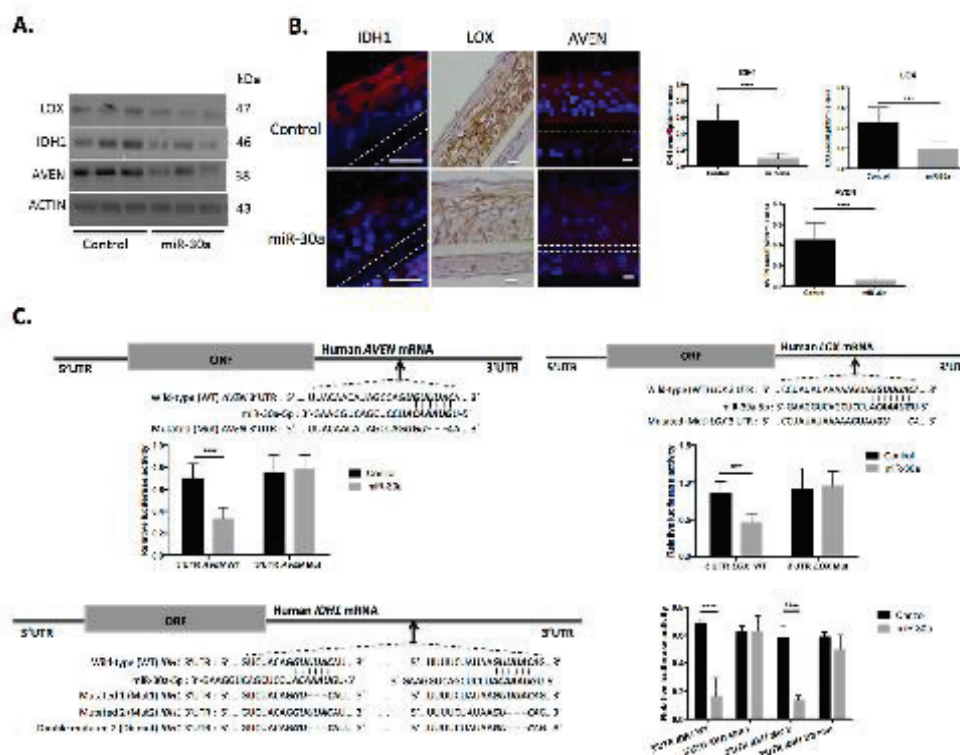


Figure 5. AVEN, IDH1 and LOX are direct targets of miR-30a in keratinocytes. (A) The expression levels of AVEN, IDH1 and LOX proteins were evaluated by western blotting in cultured keratinocytes transduced by the miR-30a lentivirus construction after doxycycline treatment. (B) Immuno-fluorescent staining of AVEN and IDH1 and immunohistochemical staining of LOX in reconstructed epidermis overexpressing or not miR-30a after doxycycline treatment. Counterstaining was performed with DAPI and polycarbonate membrane position is indicated by a dotted line. Representative photographs of 3 independent replicates were shown. Scale bar = 25 μm. Right panels: quantification of the IDH1, LOX or AVEN labeled area in the REs. Results are mean +/- SD from three independent samples. ****P<0,0001, ***P<0,001 (C) The alignment of miR-30a putative binding sites in human AVEN, IDH1 or LOX 3'-UTR region have been schematized to show complementary pairing of miR-30a with AVEN, IDH1 or LOX wild-type (WT) and mutant (Mut) 3'-UTR constructs. Transduced keratinocytes were transfected with WT or Mut reporter constructs. Luciferase intensities were normalized to β-galactosidase level. Results are mean +/- SD from three independent samples. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

miR-30a silencing), identified in at least 2 of the 5 transcriptomes, were selected for further analysis. Twenty-four genes were thus identified, 14 of which were potentially expressed in human epidermis according to the Human Protein Atlas (HPA) database and 8 of which exhibited conserved miR-30a response element (MRE) in their 3'-UTR (Figure 4A). We therefore selected 5 genes (*AVEN*, *FBXL20*, *IDH1*, *TDG*, *TBPL1*) with at least 1 conserved miR-30a MRE and potentially expressed in the epidermis according to the HPA database. Each of these was then tested on RNA samples from long-term culture of skin equivalents mimicking chronological aging. There was a strong decrease in *AVEN* and *IDH1* transcript expression in the late phase of culture, suggesting that these 2 genes might be repressed in aged epidermis (Figure 4B). We also observed that *IDH1*, *AVEN* and *LOX* were repressed at the mRNA and protein level in keratinocytes from aged skin (Figure S4). We then selected *AVEN*, encoding a caspase inhibitor, and *IDH1* encoding the isocitrate dehydrogenase 1, as putative miR-30a targets potentially involved in human epidermis aging. The study also focused on *LOX*, encoding a lysyl oxidase known to be involved in keratinocyte differentiation [13] and to be directly regulated by miR-30a in cancer cells [14]. Expression analysis of the *LOX* transcript in the skin equivalent model of aging showed significant decrease in aged tissues (Figure 4B). Finally, we analyzed the expression of the 3 miR-30a targets *LOX*, *IDH1* and *AVEN* in aged human skin and observed a global reduction in the levels of these proteins in aged epidermis, especially for *IDH1* and *AVEN* (Figure 4C and 4D). For *IDH1*, a stronger expression was observed in the dermis of aged skin (Figure 4C) suggesting a possible redistribution of the protein in the aged skin.

The study then focused on *IDH1*, *LOX* and *AVEN*, 3 genes potentially targeted by miR-30a and repressed in aged epidermis. To confirm regulation by miR-30a, protein expression in miR-30a-over-expressing keratinocytes (Figure 5A) and in reconstructed epidermises with overexpression of miR-30a was studied (Figure 5B): expression of all 3 proteins was strongly reduced in cultured keratinocytes and reconstructed epidermis. To demonstrate direct regulation of *LOX*, *AVEN* and *IDH1* by miR-30a, their 3' UTR sequence, containing at least 1 specific miR-30a MRE, was cloned into a luciferase reporter plasmid. The plasmids were transfected in human keratinocytes previously transduced by the miR-30a lentivirus, and luciferase expression was monitored in the context of miR-30a over-expression. There was a significant reduction in luciferase activity for the 3'-UTR-*AVEN* WT, 3' UTR-*LOX* WT and 3'-UTR-*IDH1* WT after over-expression of miR-30a (Figure 5C). Reporter plasmids harboring a modified form of the 3' UTR for these 3 genes were also constructed, with

mutations of the conserved miR-30a MRE (see Figure 5C for the description of WT and mutated 3' UTR sequences). With mutated forms of the 3'-UTR-*AVEN* and 3' UTR-*LOX*, the effect of miR-30a over-expression on luciferase expression was completely abolished (Figure 5C, top panels). For the 3'-UTR of *IDH1*, the two conserved MREs mutated separately or simultaneously: there was loss of the miR-30a effect on luciferase activity only when the first MRE was mutated (Figure 5C, bottom panels). These data confirmed the specificity of miR-30a's action on these 3 targets by direct binding on specific DNA sequence elements. Finally, we demonstrated that miR-30a directly targets *LOX*, *IDH1* and *AVEN* genes by specific binding on their 3'UTR.

miR-30a regulates barrier function and keratinocytes apoptosis in human epidermis

We demonstrated that miR-30a over-expression impaired expression of keratinocyte differentiation markers in our model of reconstructed epidermis (RE) (Figure 3). Based on these data, we explored the functional consequences of this over-expression on the barrier function. Two complementary tests were performed in control and miR-30a epidermis: trans-epidermal water loss (TEWL) measurement to assess inside-out permeability and a Lucifer yellow assay to evaluate the outside-in permeability of the barrier. There were significant increases in TEWL (Figure 6A) and Lucifer yellow penetration (Figure 6B) in miR-30a-overexpressing tissue, suggesting impaired barrier function. We also demonstrated that miR-30a targeted *AVEN*, a gene encoding an apoptosis inhibitor. We therefore explored apoptosis level in control and miR-30a-over-expressing epidermis: apoptotic cell abundance was strongly increased in miR-30a-positive tissue (Figure 6C). Overall, these results indicated that miR-30a overexpression impairs epidermal barrier functionality and increases keratinocyte apoptosis, two defects observed in human aged skin.

DISCUSSION

In this study, we performed an expression screen in cultured human keratinocytes from young or aged skin to identify age-dependent microRNAs. Since keratinocytes were extracted from skin with various anatomical locations, we cannot exclude that anatomical differences might impact microRNA expression. However, we confirmed miR-30a induction with aging in a well-recognized *in vitro* model of reconstructed skin mimicking chronological aging [12] where the parameter of anatomic localization is completely abolished. We therefore consider that the main parameter responsible for miR-30a induction in epidermis is the chronological age of the tissue.

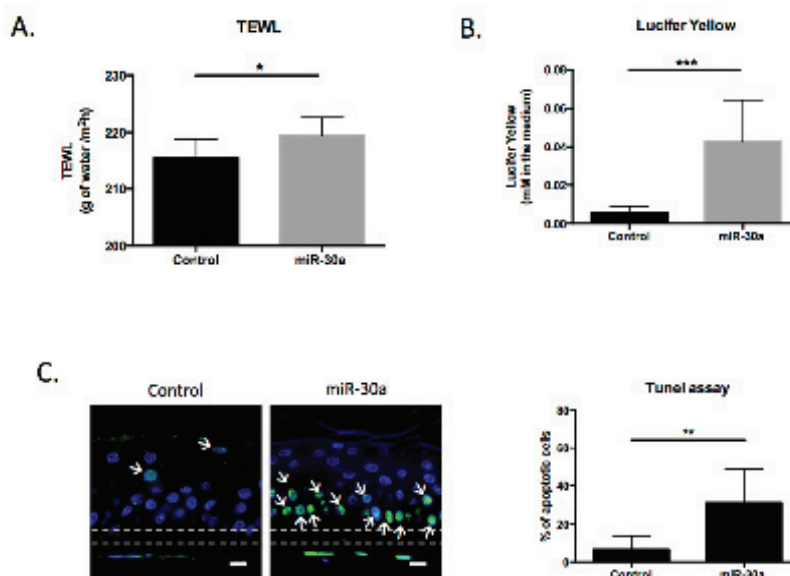


Figure 6. MiR-30a overexpression decreases the functionality of reconstructed epidermis (REs). (A) Trans-epidermal water loss (TEWL) was measured for control or miR-30a overexpressing REs after doxycyclin treatment (B) Outside-in permeability was evaluated using the Lucifer Yellow assay for control or miR-30a overexpressing REs after doxycyclin treatment (C) Apoptosis TUNEL assay for control or miR-30a overexpressing REs after doxycyclin treatment. The apoptotic cells are labeled in green and indicated with white arrows. Scale bar = 25 μ m. The Quantification of the % of apoptotic cells appears on the graph. Results are mean \pm SD from three independent samples. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

We show here for the first time that miR-30a is an aged-dependent microRNA able to impair differentiation and induce apoptosis in human keratinocytes. MiR-30a has been intensively studied in cancer, where it plays a complex and dual role as oncogene or onco-suppressor depending on the type of cancer (for a review: [15].) MiR-30a also participates in a wide range of biological processes in normal cells, including osteogenic and chondrogenic differentiation [16, 17], neuronal development [18], epithelial-to-mesenchymal transition [19], autophagy [20] and auto-immune response regulation [21]. However, the role of miR-30a in the epidermis remains largely unexplored. Only one paper published to date presented data about miR-30a in keratinocytes: the authors suggested that miR-30a could be regulated by transcription factor P63 and be involved in the onset of differentiation in monolayer cultures of human keratinocytes [22]. Unfortunately, the present culture model was unable to confirm a link between miR-30a and P63 (data not shown), although this could be an important mechanism in the regulation of epidermal homeostasis. The present study is also the first to report miR-30a induction by chronological aging, although

a few papers have shown a link between miR-30a expression and cellular senescence, especially in fibroblasts [23] and cord-blood stem-cells [24]. We also observed miR-30a induction in replicative senescent keratinocytes (Figure S5); in our hands, however, over-expression of miR-30a in keratinocytes did not induce senescence, suggesting that miR-30a induction is a consequence but not a cause of cellular senescence in keratinocytes (data not shown).

We demonstrated that 1) miR-30a-5p and -3p are induced in aged epidermis, 2) miR-30a directly targets the *LOX*, *IDH1* and *AVEN* genes, and 3) MiR-30a is able to impair epidermal differentiation and to activate apoptosis when over-expressed in keratinocytes grown in 3-dimensional organotypic culture. It is therefore very tempting to explain miR-30a effects in keratinocytes in terms of repression of its targets, especially *LOX* and *AVEN*. The *LOX* gene encodes lysyl oxidase, an extracellular enzyme involved in the maturation of connective tissue [25]. It has been also shown that *LOX* is expressed in human keratinocytes and is able to regulate keratinocyte differentiation independently of its

main enzymatic activity [13]. More precisely, silencing LOX by RNA interference strongly impaired terminal differentiation in a reconstructed-epidermis model [13], mimicking the effect of miR-30a overexpression observed in the present study. It can therefore be hypothesized that the negative effect of miR-30a on epidermal differentiation could, at least partly, be linked to LOX repression.

The *AVEN* gene encodes a caspase inhibitor that plays an anti-apoptotic role by interacting with Bcl-XL and Apaf-1 [26]. The role of AVEN in epidermis has been poorly studied. We demonstrated here that AVEN is expressed in human epidermis, is repressed in aged skin and is also down-regulated in RE over-expressing miR-30a and exhibiting a high concentration of apoptotic cells. Taken together, these results suggest that miR-30a-mediated silencing of anti-apoptotic protein AVEN is involved in the apoptosis burst observed in our 3D-cultured keratinocytes. Contrary to LOX and AVEN, the role of IDH1 in the phenotype is not so obvious. *IDH1* encodes isocitrate dehydrogenase, a cytosolic enzyme that catalyzes oxidative decarboxylation of isocitrate to α -ketoglutarate, an important source of NADPH. IDH1 thus plays a key role in anti-oxidative cell protection by maintaining the oxido-reduction potential [27]. IDH1 down-regulation during the early stages of skin tumorigenesis is strongly correlated with tumor promotion [28]; moreover, IDH1 mutations are frequently found in melanoma and various other cancers, including leukemia and glioma, and contribute to metastasis by altering cellular metabolism [29-31]. It has been shown that overexpression of a mutated form of IDH1 in neural stem-cells leads to differentiation defects and increased apoptosis susceptibility [32]. It is therefore possible that down-regulation of IDH1 by miR-30a induces a similar effect in cultured keratinocytes. In the present study, IDH1 was strongly repressed in aged human epidermis (Figure 4) but also in cultured human keratinocytes from aged individuals (data not shown). IDH1 repression in aged epidermis could therefore contribute to several physiological defects observed in aging tissue, including differentiation defects and increased sensitivity to oxidative stress. Altered IDH1 expression in aged tissues and individuals, already observed in *C. Elegans* [33], may therefore be a general hallmark of aging. However, IDH1 induction in the dermis of old skin (Figure 4C) might also evocate multiple and perhaps opposite functions in the skin during aging.

The present study used 3D organotypic primary keratinocyte culture to mimic human epidermis and to study the functional consequences of miR-30a over-expression. There was a strong increase in apoptotic cell rates in the various layers of the REs and an impairment

of epidermal differentiation, correlated with less efficient barrier function. These features, obtained in a simple model of 3D-culture, resemble some aspects of *in situ* epidermis in the elderly. Impairment of epidermal barrier function in aged skin is a recognized functional defect that has been quantitatively documented by several authors, demonstrating that some skin barrier function parameters, such as lipid production and skin surface pH, correlate with age [34-36]. Moreover, it has been shown that the differentiation program is disturbed in aged skin, with reduced expression of various differentiation markers, including loricrin and involucrin [12, 37], two proteins strongly reduced in miR-30a-overexpressing epidermis equivalents. Finally, aged skin shows increased TUNEL index, with positive cells detected not only in the differentiated terminal layers but also below the granular layer, indicating apoptosis rather than terminal differentiation [38]. The phenotype of the epidermis equivalents obtained with miR-30a-overexpressing keratinocytes can therefore be taken to exhibit some important features of skin aging, and it may be suggested that miR-30a induction in epidermis during aging may be implicated in certain deleterious aspects of aged tissue. MiR-30a thus appears to be a possible target for skin anti-aging strategies using genetic or cosmetic approaches.

METHODS

Human skin samples

Normal human skin tissue explants were obtained from the surgical discard of anonymous healthy patients with informed consent of adult donors or children's parents in accordance with ethical guidelines (French Bioethics law of 2004) and declared to the French research ministry (Declaration no. DC-2008-162 delivered to the Cell and Tissue Bank of Hospices Civils de Lyon). Young (<5 years), adult (19-40 years) and aged (>60 years) human primary keratinocytes (HPK) were isolated with trypsin (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and dispase (Dispase II; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), respectively from child foreskin and abdominal or mammary skin biopsies obtained from plastic surgery. Human primary keratinocytes, isolated as described elsewhere [39] were cultured in KGM2 medium (Promocell, Heidelberg, Germany) as previously described [3] and used at early passage (passage 2 or 3) in the subsequent experiments. All keratinocytes were passed in the exponential phase of growth.

RNA isolation and real-time quantitative PCR

Total RNA was isolated using a mirVana™ miRNA Isolation Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific,

Vilnius, Lithuania) according to the manufacturer's instructions.

To study miRNA expression profiles, miRNA was reverse-transcribed into cDNA using a TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) and analyzed on real-time qPCR using a TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) on an AriaMx Realtime PCR system (Agilent Genomics, Santa Clara, CA, USA). Results were normalized to RNU48 snoRNA expression level.

To study mRNA expression profiles, mRNA was reverse-transcribed into cDNA using a PrimeScript™ RT reagent kit (Takara, Shiga, Japan) and analyzed on real-time qPCR using a SYBR® Premix ExTaqII (Takara, Shiga, Japan) on the same instrument. Results were normalized to 18S rRNA expression level. Results were obtained from independent experiments using keratinocytes from 3 different donors. Relative quantification was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ quantification method. The primers are listed in the Supplementary Materials and Methods file.

Microarray analysis

MicroRNA expression profiles keratinocytes from young (<5 years), adult (19-40 years) and aged skin (>60 years) were analyzed using a whole human genome microarray containing 30,434 probes (GeneChip™ miRNA 4.0 Array; Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). RNA amplification, microarray hybridization and scanning, data normalization and analysis were performed at the ProfileXpert genome facility (Lyon, France) as previously described [40]. Significantly modulated microRNAs were selected by fold change ≥ 1.5 and pvalue ≤ 0.05 (multiple unpaired t-test, FDR = 5%). The microarray data have been deposited into the Gene Expression Omnibus database at NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and are available with GEO accession number GSE101493.

Protein extraction and western blotting

Protein extraction and immunoblotting on nitrocellulose membrane were performed as previously described [41]. The membrane was incubated overnight at 4°C in TBS-T with primary antibody specific to IDH1 (Cell Signaling Technology, Danvers, USA #D2H1, 1/1000), LOX (home-made antibody, 1/250), AVEN (Sigma, St-Louis, USA #HPA020863, 1/100) or ACTIN (Millipore, Billerica, USA #MAB 1501 Clone C4, 1/5000). The membrane was then washed 3 times in TBS-T and incubated with secondary antibody for 1 hour at room temperature. The peroxidase-conjugated

secondary antibodies were goat anti-mouse IgG and goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Proteins were detected using an enhanced chemiluminescence system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the signal was detected by the Fusion Fx system (Vilber Lourmat, Collégien, France).

Plasmid construction, lentiviral production and cell infection

The genomic DNA sequence containing the hsa-miR-30a precursor was amplified with the following primers: 5'- CCGAATTCCTTGAAGTCCGAGGCAGTA (forward) and 5'- CCGAATTCTACAGAATCGTTGC CTGCAC (reverse). This sequence was cloned into pEN_TTmcs (Addgene #25755, Cambridge, MA, USA) between two EcoRI restriction sites. A control plasmid was constructed with an empty pen_TTmcs. Then, miR-30a or control pen_TTmcs was recombined into pSLIK-Venus (Addgene #25734) using Gateway LR Clonase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. All cloned products were sequenced before lentiviral production. Lentiviral vector particles were produced by the vector facility at SFR BioSciences Gerland-Lyon Sud (Lyon, France) as previously described [42].

HPKs were infected at a MOI of 10 and treated with 1 µg/ml doxycycline (Sigma, St-Louis, MO, USA) to induce miR-30a overexpression. For RE production, infected HPKs were treated with 0.1 µg/ml doxycycline. We had previously checked that this low concentration of doxycycline was able to activate miR-30a expression but had no deleterious effect on keratinocytes proliferation and stratification in REs and SEs organotypic models.

Identification of miR-30a targets and luciferase assays

The Gene Expression Omnibus (GEO) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) was used to identify putative targets of miR-30a by comparison of 5 transcriptomes performed on cells after miR-30a modulation (Accession numbers: GSE12908, GSE16569, GSE29921, GSE36565, GSE41607). Genes identified by at least 2 of the 5 transcriptomes were selected for further analysis. The Human Protein Atlas database [43] was then used to select predicted target genes encoding proteins expressed in human epidermis. A final search for conserved miR-30a MicroRNA Recognition Elements (MRE) in the 3'UTR of the selected genes was performed using TargetScan 7.1 (www.targetscan.org).

A 3'-UTR sequence of AVEN (194 pb), IDH1 (240 pb) or LOX (306 pb) containing the candidate miR-30a

Vilnius, Lithuania) according to the manufacturer's instructions.

To study miRNA expression profiles, miRNA was reverse-transcribed into cDNA using a TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) and analyzed on real-time qPCR using a TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) on an AriaMx Realtime PCR system (Agilent Genomics, Santa Clara, CA, USA). Results were normalized to RNU48 snoRNA expression level.

To study mRNA expression profiles, mRNA was reverse-transcribed into cDNA using a PrimeScript™ RT reagent kit (Takara, Shiga, Japan) and analyzed on real-time qPCR using a SYBR® Premix ExTaqII (Takara, Shiga, Japan) on the same instrument. Results were normalized to 18S rRNA expression level. Results were obtained from independent experiments using keratinocytes from 3 different donors. Relative quantification was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ quantification method. The primers are listed in the Supplementary Materials and Methods file.

Microarray analysis

MicroRNA expression profiles keratinocytes from young (<5 years), adult (19-40 years) and aged skin (>60 years) were analyzed using a whole human genome microarray containing 30,434 probes (GeneChip™ miRNA 4.0 Array; Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). RNA amplification, microarray hybridization and scanning, data normalization and analysis were performed at the ProfileXpert genome facility (Lyon, France) as previously described [40]. Significantly modulated microRNAs were selected by fold change ≥ 1.5 and pvalue ≤ 0.05 (multiple unpaired t-test, FDR = 5%). The microarray data have been deposited into the Gene Expression Omnibus database at NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and are available with GEO accession number GSE101493.

Protein extraction and western blotting

Protein extraction and immunoblotting on nitrocellulose membrane were performed as previously described [41]. The membrane was incubated overnight at 4°C in TBS-T with primary antibody specific to IDH1 (Cell Signaling Technology, Danvers, USA #D2H1, 1/1000), LOX (home-made antibody, 1/250), AVEN (Sigma, St-Louis, USA #HPA020863, 1/100) or ACTIN (Millipore, Billerica, USA #MAB 1501 Clone C4, 1/5000). The membrane was then washed 3 times in TBS-T and incubated with secondary antibody for 1 hour at room temperature. The peroxidase-conjugated

secondary antibodies were goat anti-mouse IgG and goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Proteins were detected using an enhanced chemiluminescence system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the signal was detected by the Fusion Fx system (Vilber Lourmat, Collégien, France).

Plasmid construction, lentiviral production and cell infection

The genomic DNA sequence containing the hsa-miR-30a precursor was amplified with the following primers: 5'- CCGAATTCCTTGAAGTCCGAGGCAGTA (forward) and 5'- CCGAATTCTACAGAATCGTTGC CTGCAC (reverse). This sequence was cloned into pEN_TTmcs (Addgene #25755, Cambridge, MA, USA) between two EcoRI restriction sites. A control plasmid was constructed with an empty pen_TTmcs. Then, miR-30a or control pen_TTmcs was recombined into pSLIK-Venus (Addgene #25734) using Gateway LR Clonase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. All cloned products were sequenced before lentiviral production. Lentiviral vector particles were produced by the vector facility at SFR BioSciences Gerland-Lyon Sud (Lyon, France) as previously described [42].

HPKs were infected at a MOI of 10 and treated with 1 µg/ml doxycycline (Sigma, St-Louis, MO, USA) to induce miR-30a overexpression. For RE production, infected HPKs were treated with 0.1 µg/ml doxycycline. We had previously checked that this low concentration of doxycycline was able to activate miR-30a expression but had no deleterious effect on keratinocytes proliferation and stratification in REs and SEs organotypic models.

Identification of miR-30a targets and luciferase assays

The Gene Expression Omnibus (GEO) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) was used to identify putative targets of miR-30a by comparison of 5 transcriptomes performed on cells after miR-30a modulation (Accession numbers: GSE12908, GSE16569, GSE29921, GSE36565, GSE41607). Genes identified by at least 2 of the 5 transcriptomes were selected for further analysis. The Human Protein Atlas database [43] was then used to select predicted target genes encoding proteins expressed in human epidermis. A final search for conserved miR-30a MicroRNA Recognition Elements (MRE) in the 3'UTR of the selected genes was performed using TargetScan 7.1 (www.targetscan.org).

A 3'-UTR sequence of AVEN (194 pb), IDH1 (240 pb) or LOX (306 pb) containing the candidate miR-30a

binding sites was amplified by PCR from human genomic DNA. 3'UTR sequences of LOX and AVEN contained 1 candidate miR-30a conserved binding site and the 3'UTR sequence of IDH1 contained 2. The primers used for this amplification are listed in the Supplementary Materials and Methods file.

After TA-cloning to allow net cuts to restricted sites, the PCR product was cloned into the HindIII and SacI restriction sites downstream of the open reading frame of luciferase in the pMIR-REPORT vector (Ambion, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to generate AVEN-3'UTR, IDH1-3'UTR or LOX-3'UTR reporter.

A 3 bp deletion in the GTTACA miR-30a binding site was created by site-directed mutagenesis using the QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), with the X-3'UTR reporter vectors as templates and the primers listed in the Supplementary Materials and Methods section. This generated the mut-X-3'UTR reporter vector. All cloned products were sequenced before use.

Luciferase assays were performed on young primary keratinocytes infected by pSLIK Venus control or pSLIK Venus miR-30a using the Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions. Transient transfection of 500ng pMIR report-3'UTR AVEN, IDH1 or LOX or their mutants and 100ng pMIR β-galactosidase was carried out in duplicate using JetPei reagent (Polyplus, Illkirch, France). Forty-eight hours after transfection and miR-30a overexpression, luciferase and β-galactosidase activity was measured. The luciferase and beta-galactosidase activity were measured by luminescence in a microplate reader Sinfinito M10000, Tecan, Mannedorf, Switzerland). Three independent biological replicates were performed.

In vitro 3D human skin equivalents (SE) culture

SE cultures were prepared as described previously [44]. Briefly, fibroblasts from young donors were seeded at a final density of 250 000 cells/cm² onto a dermal substrate (DS) made of chitosan-cross-linked collagen-glycosaminoglycan matrix [45]. This DS was grown in fibroblast medium supplemented with 50 mg/mL L-ascorbic acid (Sigma) and 10 ng/ml of EGF at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, and the medium was changed every day for 21 days. For the preparation of SE, keratinocytes from young donor were seeded onto the DS on day 21. These submerged SEs were cultured for 7 days in keratinocyte medium and then raised at the air-liquid interface and cultured in a simplified kera-

tinocyte medium containing DMEM supplemented with 10% FCS, 10 ng/mL EGF, 0.12 IU/mL insulin, 0.4 mg/mL hydrocortisone, and antibiotics. Samples were harvested after 35, 45, 55, 65, 75 and 100 days of total cell culture for histology, immunohistochemistry and genes expression studies as described [12]. For each cell culture condition and analysis, SEs were produced in triplicate.

Reconstructed epidermis (RE) production

RE preparation was adapted from Le Provost et al., 2010 [13]. Briefly, 3.10⁴ fibroblasts were seeded on the outer face of the polycarbonate membrane of cell culture inserts (Millipore, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). They were cultured for 2 days in DMEM/F12 supplemented with 10% fetal serum bovine (Gibco, Thermofischer, Waltham, MA, USA) and penicillin/streptomycin (Sigma, St-Louis, MO, USA). Then, 3.10⁵ keratinocytes from 3 different young donors and infected by pSLIK Venus control or pSLIK Venus miR-30a were seeded on the inner face of cell culture inserts and cultured for 3 days in DMEM/F12 supplemented with 5% fetal bovine serum (Fetal Clone II; Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 0.2 ng/ml EGF (Gibco, Thermofischer, Waltham, MA, USA), 0.4 μg/ml hydrocortisone (Sigma, St-Louis, MO, USA), 5 μg/ml insulin (Sigma, St-Louis, USA), 8 ng/ml cholera toxin (Sigma, St-Louis, MO, USA), 2.10⁻¹¹ M Tri-iodothyronine (Sigma, St-Louis, MO, USA), 24 μg/ml adenine (Sigma, St-Louis, MO, USA) and penicillin/streptomycin. To induce stratification and differentiation, keratinocytes were placed at the air/liquid interface and cultured for another 2 days in the same medium, except that EGF and adenine were omitted, the final calcium chloride (Sigma, St-Louis, USA) concentration was adjusted to 2mM, 50 μg/ml vitamin C and 0.1 μg/ml doxycycline were added. Cells were then cultured for another 12 days in the same medium, except that the fetal bovine serum concentration was reduced to 1%. During the immersion phase, the culture medium was changed every day. Three independent biological replicates were performed for each condition.

Functional evaluation of barrier function

At the end of RE preparation, REs were held at room temperature without culture plate covers for 1 hour to remove any residual humidity. Then, trans-epidermal water loss (TEWL) was measured on Biox Aquaflex (Biox Systems Ltd, Bishop's Stortford, UK) according to the manufacturer's instructions. Three independent technical replicates were performed for each RE (3 REs per condition).

At the end of preparation, 200 µl of 1 mM Lucifer yellow (Sigma, St-Louis, MO, USA) was added on the RE surface. After incubation at 37°C for 6 hours, the Lucifer yellow concentration in the culture medium was measured by fluorescence in a microplate reader (Infinite M1000, Tecan, Männedorf, Switzerland) with excitation at 425 nm and emission at 550 nm. Three independent technical replicates were performed for each RE (3 REs per condition).

Apoptosis TUNEL assay

A Click-iT® Plus TUNEL Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) was used to assess apoptotic cell rates, according to the manufacturer's instructions.

Histology and immunofluorescence microscopy

RE samples were fixed in Zinc Formal-Fixx™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 24 hours at 4°C, embedded in paraffin and then cut into 5 µm sections. After dewaxing and rehydration, tissue sections were either stained with HES to check morphology or permeabilized and blocked by 1% bovine albumin serum (BSA) + 10% goat serum + 0.3M glycine in PBS-T for 1 hour at room temperature. Sections were then incubated with primary antibody diluted in PBS + 0.1% goat serum overnight at 4°C: INVOLUCRIN (Sigma, St-Louis, MO, USA #I-9018, 1/200), K10 (Dako, Agilent, Santa Clara, CA, USA #M7002, 1/50), K1 (Covance, Princeton, NJ, USA #PRB-149P, 1/1,000), LORICRIN (Covance, Princeton, NJ, USA #PRB-145P, 1/1000), K14 (Novocastra, Leica, Nanterre, France #NCL-LL002, 1/200), AVEN (Sigma, St Louis, MO, USA #HPA020863, 1/100), IDH1 (Cell Signaling Technology, Danvers, USA #D2H1, 1/1,000). Secondary Alexa-488 and Alexa-546-conjugated anti-mouse or anti-rabbit (Molecular Probes, Eugene, Or, USA) was incubated 1 hour at room temperature. Nuclear counterstaining using DAPI was carried out. Sections were then mounted in Permafluor™ Aqueous Mounting Medium (LabVision, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Negative controls were performed by omitting the primary antibody.

To study LOX expression, tissue sections were etched and fixed in Bouin's fixative (Microm Microtech, Francheville, France) and then LOX expression was detected as previously described [46]. Ki-67 expression was detected as previously described [12]. Image acquisition was performed using a Nikon microscope (Nikon TE300, Champigny-sur-Marne, France) with a coolsnap fx CCD camera (Photometrics, Tucson, AZ, USA) with MetaVue software (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA, USA).

In situ hybridization of miR-30a

The assay was performed on young or aged skin and on RE paraffin sections as described previously [47]. On skin paraffin sections, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-30a-5p and scramble probes (Exiqon, Qiagen, Woburn, MA, USA) were used at 40 nM. On RE sections, these probes were used at 100nM. A LNA U6 positive control was used at 1 nM. The anti-peroxydase reaction was run for 24h at 30°C.

Image analysis

Image analysis was performed using ImageJ software. The parameters of interested were Ki-67 nucleus positive cells and the surface area of K14, K1, K10, INVOLUCRIN, LORICRIN, LOX, IDH1 and AVEN. Quantifications were performed as previously described [12]. Data were normalized either by basement membrane length or by epidermal area.

Statistical analysis

All data are represented as means for at least 3 independent experiments. Statistical significance was calculated by a two-tailed Student's t-test for unpaired samples to compare 2 groups and by one-way analysis of variance (ANOVA) to compare 3 or more groups. All statistical analyses were performed using Prism (version 6.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). All results are expressed as mean ± SD. Mean differences were considered to be significant when P<0.05. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 (ns = non-significant).

Abbreviations

UV (Ultra Violet), QPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction), SE (Skin Equivalent), RE (Reconstructed epidermis), HES (Hematoxylin Eosin Saffron), MRE (MicroRNA Responding Element), TEWL (Trans-Epidermal Water Loss), MOI (Multiplicity Of Infection), SD (Standard Deviation), HPK (Human Primary Keratinocytes).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Gisèle Froment, Didier Nègre and Caroline Costa from the lentivectors production facility SFR Biosciences Gerland Lyon Sud (UMS3444/US8). We thank Naima El Kholti from LBTT-Primatiss facility (Lyon) for her expertise in histology. We also thank Nicolas Gadot from Plateforme de Recherche Anatomopathologique (Centre Léon Bérard, Lyon) for his help in analyzing reconstructed epidermis. The

support provided by the ProfileXpert genome facility (www.profilexpert.fr) for microarray analysis is greatly acknowledged. We thank Dr Romain Debret (CNRS-LBTI Lyon) for critical reading of this manuscript and Dr Clavel (Clinique du Tonkin, Villeurbanne, France) for his help in collecting skin biopsies.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors disclose no potential conflicts of interest.

FUNDING

CM was supported by a PhD grant (Allocation Doctorale de Recherche – ARC 2014) from The Auvergne- Rhône-Alpes region.

REFERENCES

1. Debaq-Chainiaux F, Leduc C, Verbeke A, Toussaint O. UV, stress and aging. *Dermatoendocrinol.* 2012; 4:236–40. <https://doi.org/10.4161/derm.23652>
2. Masse I, Barbolat-Boutrand L, Kharbili ME, Berthier-Vergnes O, Aubert D, Lamartine J. GATA3 inhibits proliferation and induces expression of both early and late differentiation markers in keratinocytes of the human epidermis. *Arch Dermatol Res.* 2014; 306:201–08. <https://doi.org/10.1007/s00403-013-1435-5>
3. Masse I, Barbolat-Boutrand L, Molina M, Berthier-Vergnes O, Joly-Tonetti N, Martin MT, Caron de Fromentel C, Kanitakis J, Lamartine J. Functional interplay between p63 and p53 controls RUNX1 function in the transition from proliferation to differentiation in human keratinocytes. *Cell Death Dis.* 2012; 3:e318. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.62>
4. Wu N, Rollin J, Masse I, Lamartine J, Gidrol X. p63 regulates human keratinocyte proliferation via MYC-regulated gene network and differentiation commitment through cell adhesion-related gene network. *J Biol Chem.* 2012; 287:5627–38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.328120>
5. Keyes WM, Wu Y, Vogel H, Guo X, Lowe SW, Mills AA. p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging. *Genes Dev.* 2005; 19:1986–99. <https://doi.org/10.1101/gad.342305>
6. Kretz M, Siprashvili Z, Chu C, Webster DE, Zehnder A, Qu K, Lee CS, Flockhart RJ, Groff AF, Chow J, Johnston D, Kim GE, Spitale RC, et al. Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR. *Nature.* 2013; 493:231–35. <https://doi.org/10.1038/nature11661>
7. Jackson SJ, Zhang Z, Feng D, Flagg M, O’Loughlin E, Wang D, Stokes N, Fuchs E, Yi R. Rapid and widespread suppression of self-renewal by microRNA-203 during epidermal differentiation. *Development.* 2013; 140:1882–91. <https://doi.org/10.1242/dev.089649>
8. Barbolat-Boutrand L, Joly-Tonetti N, Dos Santos M, Metral E, Boher A, Masse I, Berthier-Vergnes O, Bertolino P, Damour O, Lamartine J. MicroRNA-23b-3p regulates human keratinocyte differentiation through repression of TGIF1 and activation of the TGF- β -SMAD2 signalling pathway. *Exp Dermatol.* 2017; 26:51–57. <https://doi.org/10.1111/exd.13119>
9. Mudhasani R, Zhu Z, Hutvagner G, Eischen CM, Lyle S, Hall LL, Lawrence JB, Imbalzano AN, Jones SN. Loss of miRNA biogenesis induces p19Arf-p53 signaling and senescence in primary cells. *J Cell Biol.* 2008; 181:1055–63. <https://doi.org/10.1083/jcb.200802105>
10. Rivetti di Val Cervo P, Lena AM, Nicoloso M, Rossi S, Mancini M, Zhou H, Saintigny G, Dellambra E, Odoriso T, Mahé C, Calin GA, Candi E, Melino G. p63-microRNA feedback in keratinocyte senescence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109:1133–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112257109>
11. Soroka Y, Ma’or Z, Leshem Y, Verochovsky L, Neuman R, Brégégère FM, Milner Y. Aged keratinocyte phenotyping: morphology, biochemical markers and effects of Dead Sea minerals. *Exp Gerontol.* 2008; 43:947–57. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.08.003>
12. Dos Santos M, Metral E, Boher A, Rousselle P, Thepot A, Damour O. In vitro 3-D model based on extending time of culture for studying chronological epidermis aging. *Matrix Biol.* 2015; 47:85–97. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.03.009>
13. Le Provost GS, Debret R, Cenizo V, Aimond G, Pez F, Kaniewski B, André V, Sommer P. Lysyl oxidase silencing impairs keratinocyte differentiation in a reconstructed-epidermis model. *Exp Dermatol.* 2010; 19:1080–87. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01135.x>
14. Boufraqueh M, Nilubol N, Zhang L, Gara SK, Sadowski SM, Mehta A, He M, Davis S, Dreiling J, Copland JA, Smallridge RC, Quezado MM, Kebebew E. miR30a inhibits LOX expression and anaplastic thyroid cancer progression. *Cancer Res.* 2015; 75:367–77. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2304>
15. Yang X, Chen Y, Chen L. The Versatile Role of microRNA-30a in Human Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2017; 41:1616–32. <https://doi.org/10.1159/000471111>

16. Zhang R, Weng Y, Li B, Jiang Y, Yan S, He F, Chen X, Deng F, Wang J, Shi Q. BMP9-induced osteogenic differentiation is partially inhibited by miR-30a in the mesenchymal stem cell line C3H10T1/2. *J Mol Histol.* 2015; 46:399–407. <https://doi.org/10.1007/s10735-015-9628-1>
17. Tian Y, Guo R, Shi B, Chen L, Yang L, Fu Q. MicroRNA-30a promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells through inhibiting Delta-like 4 expression. *Life Sci.* 2016; 148:220–28. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.031>
18. Mellios N, Huang HS, Grigorenko A, Rogaev E, Akbarian S. A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex. *Hum Mol Genet.* 2008; 17:3030–42. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn201>
19. Peng R, Zhou L, Zhou Y, Zhao Y, Li Q, Ni D, Hu Y, Long Y, Liu J, Lyu Z, Mao Z, Yuan Y, Huang L, et al. MiR-30a Inhibits the Epithelial–Mesenchymal Transition of Podocytes through Downregulation of NFATc3. *Int J Mol Sci.* 2015; 16:24032–47. <https://doi.org/10.3390/ijms161024032>
20. Pan W, Zhong Y, Cheng C, Liu B, Wang L, Li A, Xiong L, Liu S. MiR-30-regulated autophagy mediates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy. *PLoS One.* 2013; 8:e53950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053950>
21. Liu Y, Dong J, Mu R, Gao Y, Tan X, Li Y, Li Z, Yang G. MicroRNA-30a promotes B cell hyperactivity in patients with systemic lupus erythematosus by direct interaction with Lyn. *Arthritis Rheum.* 2013; 65:1603–11. <https://doi.org/10.1002/art.37912>
22. Wu N, Sulpice E, Obeid P, Benzina S, Kermarrec F, Combe S, Gidrol X. The miR-17 family links p63 protein to MAPK signaling to promote the onset of human keratinocyte differentiation. *PLoS One.* 2012; 7:e45761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045761>
23. Martinez I, Cazalla D, Almstead LL, Steitz JA, DiMaio D. miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108:522–27. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017346108>
24. Lee S, Jung JW, Park SB, Roh K, Lee SY, Kim JH, Kang SK, Kang KS. Histone deacetylase regulates high mobility group A2-targeting microRNAs in human cord blood-derived multipotent stem cell aging. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68:325–36. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0457-9>
25. Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem.* 2003; 88:660–72. <https://doi.org/10.1002/jcb.10413>
26. Chau BN, Cheng EH, Kerr DA, Hardwick JM. Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1. *Mol Cell.* 2000; 6:31–40. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(05\)00021-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(05)00021-3)
27. Lee SM, Koh HJ, Park DC, Song BJ, Huh TL, Park JW. Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32:1185–96. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00815-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00815-8)
28. Robbins D, Wittwer JA, Codarin S, Circu ML, Aw TY, Huang TT, Van Remmen H, Richardson A, Wang DB, Witt SN, Klein RL, Zhao Y. Isocitrate dehydrogenase 1 is downregulated during early skin tumorigenesis which can be inhibited by overexpression of manganese superoxide dismutase. *Cancer Sci.* 2012; 103:1429–33. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02317.x>
29. Shibata T, Kokubu A, Miyamoto M, Sasajima Y, Yamazaki N. Mutant IDH1 confers an in vivo growth in a melanoma cell line with BRAF mutation. *Am J Pathol.* 2011; 178:1395–402. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.011>
30. Bleeker FE, Lamba S, Leenstra S, Troost D, Hulsebos T, Vandertop WP, Frattini M, Molinari F, Knowles M, Cerrato A, Rodolfo M, Scarpa A, Felicioni L, et al. IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Hum Mutat.* 2009; 30:7–11. <https://doi.org/10.1002/humu.20937>
31. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 2011; 28:177–83. <https://doi.org/10.1007/s10014-011-0029-1>
32. Rosiak K, Smolarz M, Stec WJ, Peciak J, Grzela D, Winięcka-Klimek M, Stoczynska-Fidelus E, Krynska B, Piaskowski S, Rieske P. IDH1R132H in Neural Stem Cells: Differentiation Impaired by Increased Apoptosis. *PLoS One.* 2016; 11:e0154726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154726>
33. Copes N, Edwards C, Chaput D, Saifee M, Barjuca I, Nelson D, Paraggio A, Saad P, Lipps D, Stevens SM Jr, Bradshaw PC. Metabolome and proteome changes with aging in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol.* 2015; 72:67–84. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.09.013>
34. Luebberding S, Krueger N, Kerscher M. Age-related changes in skin barrier function - quantitative evaluation of 150 female subjects. *Int J Cosmet Sci.* 2013; 35:183–90. <https://doi.org/10.1111/ics.12024>

35. Thune P, Nilsen T, Hanstad IK, Gustavsen T, Lövig Dahl H. The water barrier function of the skin in relation to the water content of stratum corneum, pH and skin lipids. The effect of alkaline soap and syndet on dry skin in elderly, non-atopic patients. *Acta Derm Venereol.* 1988; 68:277–83.
36. Minematsu T, Yamamoto Y, Nagase T, Naito A, Takehara K, Iizaka S, Komagata K, Huang L, Nakagami G, Akase T, Oe M, Yoshimura K, Ishizuka T, et al. Aging enhances maceration-induced ultrastructural alteration of the epidermis and impairment of skin barrier function. *J Dermatol Sci.* 2011; 62:160–68. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.03.005>
37. Rinnerthaler M, Duschl J, Steinbacher P, Salzmann M, Bischof J, Schuller M, Wimmer H, Peer T, Bauer JW, Richter K. Age-related changes in the composition of the cornified envelope in human skin. *Exp Dermatol.* 2013; 22:329–35. <https://doi.org/10.1111/exd.12135>
38. Gilhar A, Ullmann Y, Karry R, Shalaginov R, Assy B, Serafimovich S, Kalish RS. Ageing of human epidermis: the role of apoptosis, Fas and telomerase. *Br J Dermatol.* 2004; 150:56–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.05715.x>
39. Franco N, Lamartine J, Frouin V, Le Minter P, Petat C, Leplat JJ, Libert F, Gidrol X, Martin MT. Low-dose exposure to gamma rays induces specific gene regulations in normal human keratinocytes. *Radiat Res.* 2005; 163:623–35. <https://doi.org/10.1667/RR3391>
40. Roche M, Wierinckx A, Croze S, Rey C, Legras-Lachuer C, Morel AP, Fusco A, Raverot G, Trouillas J, Lachuer J. Deregulation of miR-183 and KIAA0101 in Aggressive and Malignant Pituitary Tumors. *Front Med (Lausanne).* 2015; 2:54. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00054>
41. Agaesse G, Barbolat-Boutrand L, Sulpice E, Bhajun R, El Kharbili M, Berthier-Vergnes O, Degoul F, de la Fouchardiere A, Berger E, Voeltzel T, Lamartine J, Gidrol X, Masse I. A large-scale RNAi screen identifies LCMR1 as a critical regulator of Tspan8-mediated melanoma invasion. *Oncogene.* 2017; 36:5084. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.195>
42. Fusil F, Calattini S, Amirache F, Mancip J, Costa C, Robbins JB, Douam F, Lavillette D, Law M, Defrance T, Verhoeyen E, Cosset FL. A Lentiviral Vector Allowing Physiologically Regulated Membrane-anchored and Secreted Antibody Expression Depending on B-cell Maturation Status. *Mol Ther.* 2015; 23:1734–47. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.148>
43. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015; 347:1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
44. Black AF, Bouez C, Perrier E, Schlotmann K, Chapuis F, Damour O. Optimization and characterization of an engineered human skin equivalent. *Tissue Eng.* 2005; 11:723–33. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.723>
45. Shahabeddin L, Berthod F, Damour O, Collombel C. Characterization of skin reconstructed on a chitosan-cross-linked collagen-glycosaminoglycan matrix. *Skin Pharmacol.* 1990; 3:107–14. <https://doi.org/10.1159/000210857>
46. Noblesse E, Cenizo V, Bouez C, Borel A, Gleyzal C, Peyrol S, Jacob MP, Sommer P, Damour O. Lysyl oxidase-like and lysyl oxidase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers. *J Invest Dermatol.* 2004; 122:621–30. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22330.x>
47. Jørgensen S, Baker A, Møller S, Nielsen BS. Robust one-day in situ hybridization protocol for detection of microRNAs in paraffin samples using LNA probes. *Methods.* 2010; 52:375–81. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.07.002>

SUPPLEMENTARY MATERIAL

SUPPLEMENTARY FIGURES

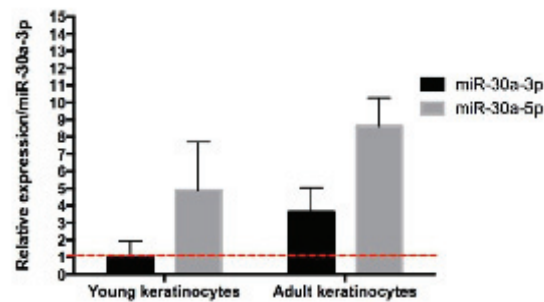


Figure S1. Relative expression of miR-30a-3p and miR-30a-5p in human keratinocytes. MiR-30a-3p and miR-30a-5p expression levels were measured by q-PCR on cultured keratinocytes from young and aged donors. Data were calculated using miR-30a-3p expression levels as a reference. Results are mean +/- SD from three independent samples.

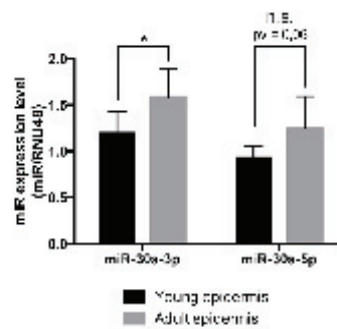


Figure S2. Relative expression of miR-30a-3p and miR-30a-5p in young and aged epidermis. MiR-30a-3p and miR-30a-5p expression levels were measured by q-PCR on epidermis RNA samples from young and aged donors. Data were calculated using miR-30a-5p expression levels as a reference. Results are mean +/- SD from three independent samples. *P<0,05.

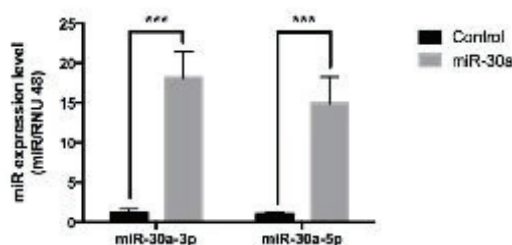


Figure 53. MiR-30a-3p and miR-30a-5p level in REs overexpressing miR-30a. Keratinocytes were infected with lentiviral vector particules of pSLIK-Venus control or pSLIK-Venus miR-30a, treated by doxycyclin and then used to generate reconstructed epidermis. MiR-30a-3p and miR-30a-5p expression levels were measured on total REs RNA sample by quantitative-PCR. Results are mean +/- SD from three independent samples. ***P<0,001.

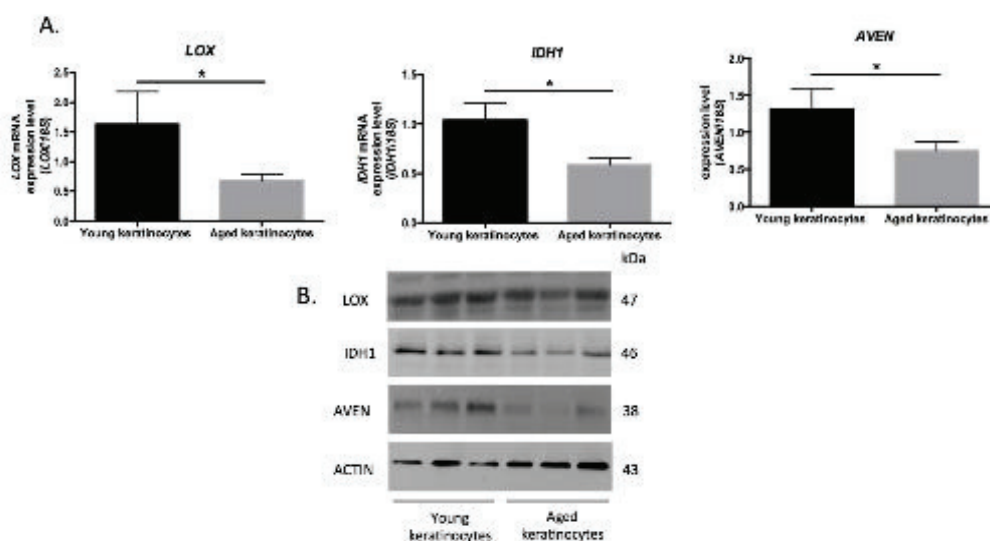


Figure 54. LOX, IDH1 and AVEN expression in keratinocytes from young and aged skin. (A) The expression level of AVEN, IDH1 and LOX transcripts were evaluated by qPCR in RNA samples from keratinocytes prepared from young or aged skin. Results are mean +/- SD from 8 independent samples. *P< 0,05. (B) The expression levels of AVEN, IDH1 and LOX proteins were evaluated by western blotting in cultured keratinocytes prepared from young or aged skin. Actin was used as a loading control.

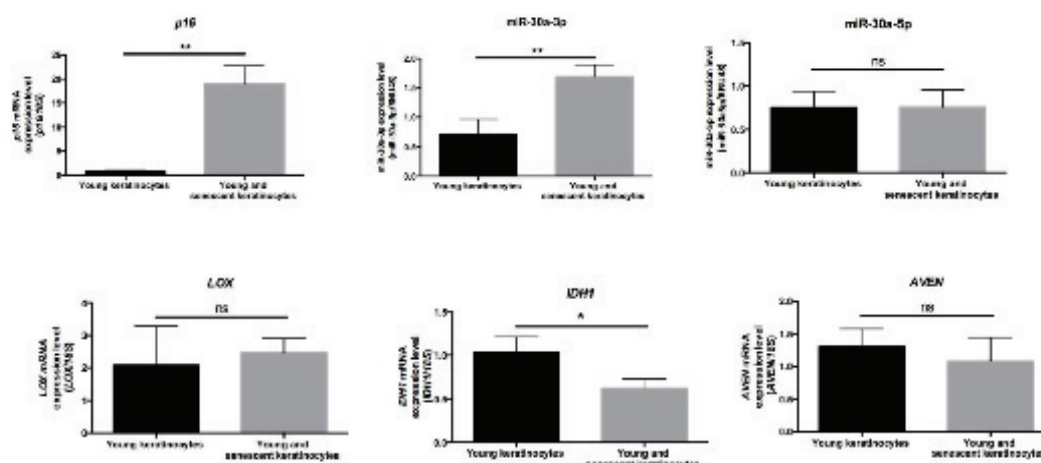


Figure 55. P16, miR-30a-3p, miR-30a-5p, LOX, IDH1 and AVEN expression in normal and replicative senescent keratinocytes from young skin The expression level of miR-30a-3p, miR-30a-5p, AVEN, IDH1 and LOX transcripts were evaluated by qPCR in RNA samples from keratinocytes prepared from young skin at early passage (passage 2) and replicative senescent keratinocytes (passage 6). P16 was used as a marker of senescence. Results are mean \pm SD from three independent samples. * $P < 0,05$. ** $P < 0,01$. ns : non significant.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

List of primers used for QPCR

Gene	Gene ID	Primer	Primer Sequence
AVEN	57099	Reverse 5'	GCCAAGCTTGCATGCCTTGTTGCATCTA-3'
		Forward 5'	ATGAGCTCGCAGCTTGTTCATTGTTT-3'
IDH1	3417	Reverse 5'	GCCAAGCTTCATGTTACAAAAGGTGGCAAT-3'
		Forward 5'	ATGAGCTCTCAAAGCTCAGGCCAAA-3'
LOX	4015	Reverse 5'	TTGGTCGGCTGGTAAGAAAT-3'
		Forward 5'	GGATACGGCACTGGCTACTTC-3'
18S	100008588	Reverse 5'	CGATGCGGCGGCGTTATT-3'
		Forward 5'	CCTGGTGGTGCCCTTCCGT-3'

List of primers used for the amplification of the target genes 3'-UTR

Primers	Restriction enzyme	Sequences
3' UTR AVEN forward	SacI	5'-ATgagctcGCAGCTTGTTCATTGTTT-3'
3' UTR AVEN reverse	HindIII	5'-GCCaagcttGCATGCCTTGTTGCATCTA-3'
3' UTR IDH1 forward	SacI	5'-ATgagctcTCAAAGCTCAGGCCAAA-3'
3' UTR IDH1 reverse	HindIII	5'-GCCaagcttCATGTTACAAAAGGTGGCAAT-3'
3' UTR LOX forward	SacI	5'-ATgagctcATGGACACATCTGGTGCTGA-3'
3' UTR LOX reverse	HindIII	5'-GCCaagcttCTGCCCATGGGAAAGATAAA-3'

List of primers used for the mutagenesis of the potential miR-30a MRE

Primers	Sequences
mutAVEN forward	5'-CAACATAGCCAGTGTGTCAGCATAGCAGATGC-3'
mut AVEN reverse	5'-GCATCTGCTATGCTGACACTGGCTATGTTG-3'
mut IDH1 f- site 1	5' GGTAAGTACTAGGCTACAGGTCATTTTTCTGTGTTACAC-3'
mut IDH1 r- site 1	5'-GTGTAACACAGAAAAATGACCTGTAGACCTAGTTACC-3'
mut IDH1 f- site 2	5'-GAGTTTATCTTTTCTATAAGTCAGCCTTTTTCTTATATATAC-3'
mut IDH1 r- site 2	5'-GTATATATAAGAAAAAGGCTGACTTATAGAAAAGATAAACTC-3'
mut LOX forward	5'-CCCTATATAAAAAAGTATGTCATTTAAAAAATTAGTAG-3'
mut LOX reverse	5'-CTACTAATTTTTTAAATGACATACTTTTTTATATAGGG-3'

CHAPITRE N°2

ETUDE DE L'EFFICACITE « ANTI-AGE » DU SELENIUM

Ce projet, financé par Labcatal, fait suite à la collaboration préalable avec le CEA de Grenoble. L'objectif était d'évaluer l'effet photoprotecteur d'un apport sélénié (sous forme de Sélénite de Sodium Oligosol) sur des kératinocytes primaires issus des peaux normales jeunes et âgées. L'utilisation d'outils innovants (puces à activité enzymatique développées et brevetées par le CEA de Grenoble) a permis une analyse fine des mécanismes cellulaires et moléculaires de ces kératinocytes. Les résultats obtenus ont montrés que i) la supplémentation en sélénite de sodium augmentait globalement les capacités de réparation de l'ADN pour les kératinocytes jeunes ; ii) l'effet protecteur du sélénite de sodium contre les UVA, rayonnements responsables du photovieillissement, est dose et âge dépendant (30nM nécessaire pour protéger les kératinocytes jeunes par rapport à 240nM pour les kératinocytes âgés).

Il nous a été demandé de démontrer si l'effet protecteur du sélénium sur le photovieillissement était transposable au vieillissement chronologique en utilisant des modèles de peaux reconstruites *in vitro*, modèle plus proche de la peau native.

Dans ce contexte, après avoir sélectionné 30nM comme étant la concentration optimale dans nos conditions de culture, nous avons aussi observé une forte induction de la prolifération des kératinocytes par le sélénium ainsi qu'un potentiel clonogénique augmenté. En effet, le sélénium permet d'enrichir la culture de 50% en holoclones, clones générés par les kératinocytes souches de l'épiderme, et enfin de retarder leur entrée en sénescence réplivative. Sur les peaux reconstruites, le sélénium permet de préserver l'homéostasie épidermique au cours d'une culture prolongée mimant le vieillissement. L'épiderme présente alors un nombre de cellules prolifératives exprimant Ki67 et CK15 deux fois plus important associé à une diminution de moitié du nombre de cellules sénescents exprimant p16INK4a.

Grâce à l'expertise de Docteur Patricia Rousselle sur la jonction dermo-épidermique et les propriétés d'adhésion des kératinocytes, nous avons pu identifier que le sélénium préserve les kératinocytes souches grâce à une meilleure adhésion des kératinocytes à la lame basale par enrichissement des intégrines $\alpha 6$ et $\beta 1$.

Nos résultats ouvrent des perspectives pour Labcatal quant à l'utilisation du sélénium, sous sa forme sélénite de sodium, pour ses vertus anti sénescence de l'épiderme cutané.

La **FIGURE 44** résume les différentes étapes du protocole qui ont permis à aboutir d'une part à la sélection de la concentration idéale de sélénium pour les cellules cutanées, dans nos conditions de culture, et d'autre part à l'analyse du mécanisme d'action du sélénium sur des cellules en culture monocouche et dans un modèle de peau reconstruite mimant le vieillissement.

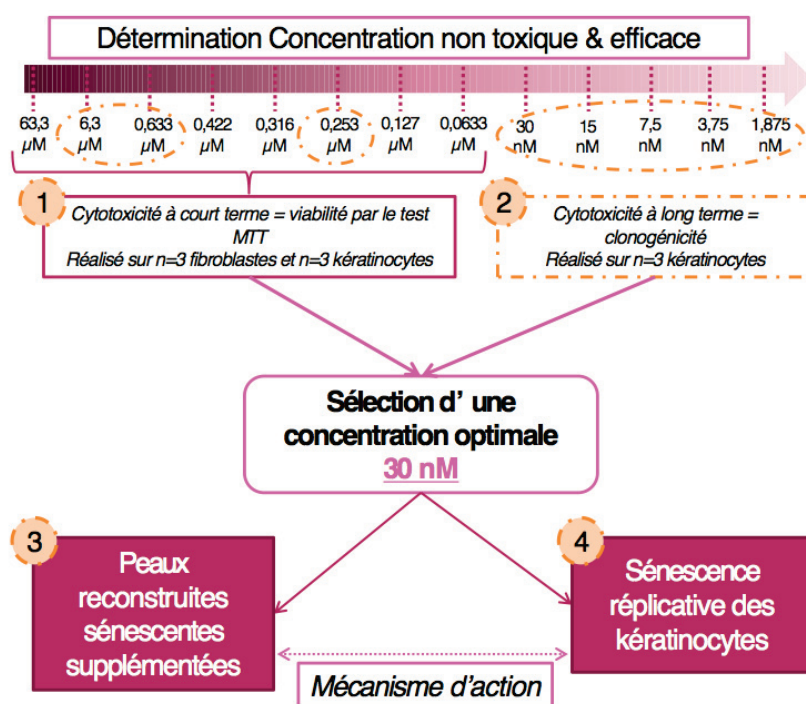


Figure 43: schéma récapitulatif des étapes nécessaires à l'analyse de l'impact du sélénium sur les cellules souches cutanées

I. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION NON TOXIQUE ET EFFICACE

A. ÉTAPE N°1: CYTOTOXICITE A COURT TERME : TEST AU MTT

Le test MTT est un test colorimétrique permettant d'évaluer la viabilité cellulaire via la mesure du métabolisme des cellules. Il est ici utilisé afin d'établir la gamme de concentration de sélénium non toxique pour les fibroblastes et les kératinocytes. Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium), qui sera réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. Cette réaction

forme du formazan, précipité violet dont la quantité formée est directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Le précipité violet est alors dissout par de l'isopropanol acidifié ou du DMSO suivi d'un dosage spectrophotométrique de la densité optique (DO) à 560 nm.

Le pourcentage de viabilité cellulaire est calculé de la sorte :

% viabilité = [(DO des cellules traitées au sélénium – DO du milieu de culture sans cellule)/(DO du contrôle correspondant à 100% de cellules – DO du milieu de culture sans cellule)] * 100

Le sélénium est ajouté au milieu de culture lorsque les cellules, cultivées en plaque 6 puits à densité usuelle, sont à 50-60% de confluence. La viabilité cellulaire est évaluée après 72h d'incubation suivant l'ajout de sélénium. Pour cela, on ajoute dans chaque puit 200µL de solution de MTT préparée extemporanément à une concentration de 5 mg/mL. Les plaques sont incubées 2 à 3h à 37°C et 5% de CO₂, puis les précipités de formazan sont solubilisés avec 2 mL de DMSO ou d'isopropanol acide. Pour finir, 4 prélèvements de 150 µL pour chaque condition sont transférés dans une plaque 96 puits pour permettre la lecture de l'absorbance à 560 nm.

B. ÉTAPE N°2: CYTOTOXICITE A LONG TERME : CLONOGENICITE

Le test clonogénique nous permet ici de tester l'influence des concentrations de sélénium durant une exposition plus longue (10 à 14jours) et sur des kératinocytes ensemencés à densité clonale. Le sélénium aux concentrations choisies dilué extemporanément dans le milieu de culture des kératinocytes est ajouté dès le premier changement de milieu et jusqu'à l'arrêt des cultures. Les kératinocytes proviennent de donneurs différents et donc d'âges variés mais ils ont été utilisés au même passage.

II. INFLUENCE DE LA SUPPLEMENTATION A 30 nM DE PEAUX RECONSTRUITES SENESCENTES

Les peaux reconstruites ont été préparées comme décrit précédemment avec des fibroblastes néonataux et des kératinocytes néonataux dont le temps de culture a été allongé jusqu'à 60 jours afin de mimer la sénescence selon la *FIGURE 45*.

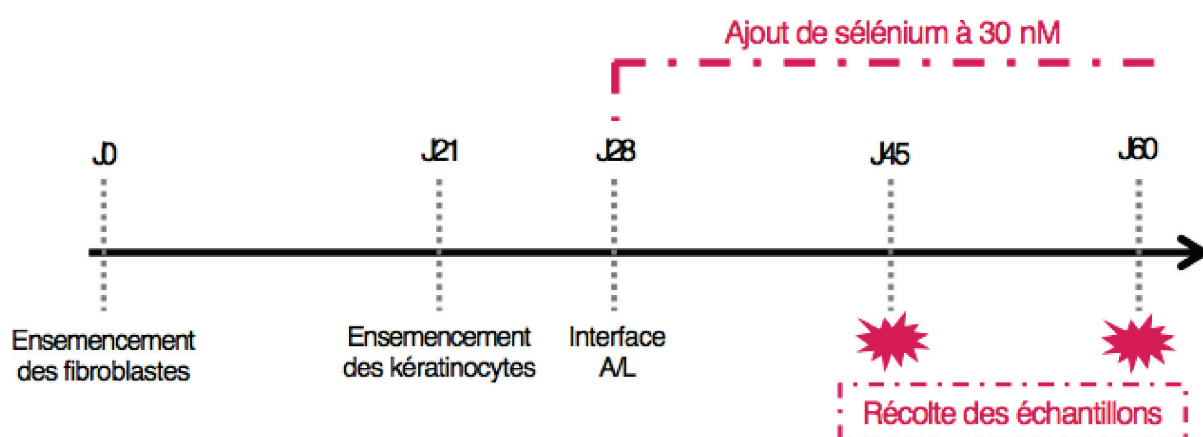


Figure 44: cinétique de culture des peaux reconstruites supplémentées à 30nM de sélénium et suivi des temps de récolte des échantillons

Deux populations de peaux ont été séparées au passage à l'interface air/liquide :

- Les peaux contrôles
- Les peaux supplémentées avec 30nM de sélénium à chaque changement de milieu jusqu'à inclusion des échantillons à J45 et J60 correspondant à 17 jours et 32 jours de supplémentation respectivement.

III. INFLUENCE DE LA SUPPLEMENTATION A 30nM DE SELENIUM SUR LA SENESCENCE REPLICATIVE DE KERATINOCYTES PRIMAIRES

Pour l'analyse de la sénescence réplivative, les cellules de chaque donneur ont été séparées en deux groupes dès l'extraction: un groupe qui sera supplémenté tout au long de la culture et un groupe contrôle. La supplémentation est réalisée dès l'ensemencement des kératinocytes à l'extraction, via les couches nourricières préparées au préalable en présence de sélénium. La supplémentation persiste tout au long des passages (*FIGURE 46*).

Le CFU/CFE ainsi que le doublement de population a été effectué à chaque passage pour chaque population cellulaire, et pour 3 donneurs différents.

En parallèle et à chaque passage, les capacités d'adhésion des kératinocytes primaires sont évaluées. Pour cela, des plaques de culture multipuits ont été préalablement coatées par la laminine 3.3.2 (2µg/ml), par le collagène IV (10µg/ml) ou par la poly-D-lysine. Après saturation des puits avec de la BSA à 1%, les cellules sont détachées et ensemencées à 30 000 cellules/puit en milieu sans sérum contenant ou non 30 nM de sélénium. Après une incubation de 30 min à 1h, les cellules non adhérentes sont lavées au PBS 1X et la mesure de l'adhésion est évaluée après fixation des cellules et coloration au cristal violet à 0.1%. L'absorbance est lue par spectrophotométrie à 570 nm

Chaque point de dosage provient de triplicata de mesure et les résultats obtenus sont normalisés par les capacités d'adhésion des cellules à la poly-D-lysine.

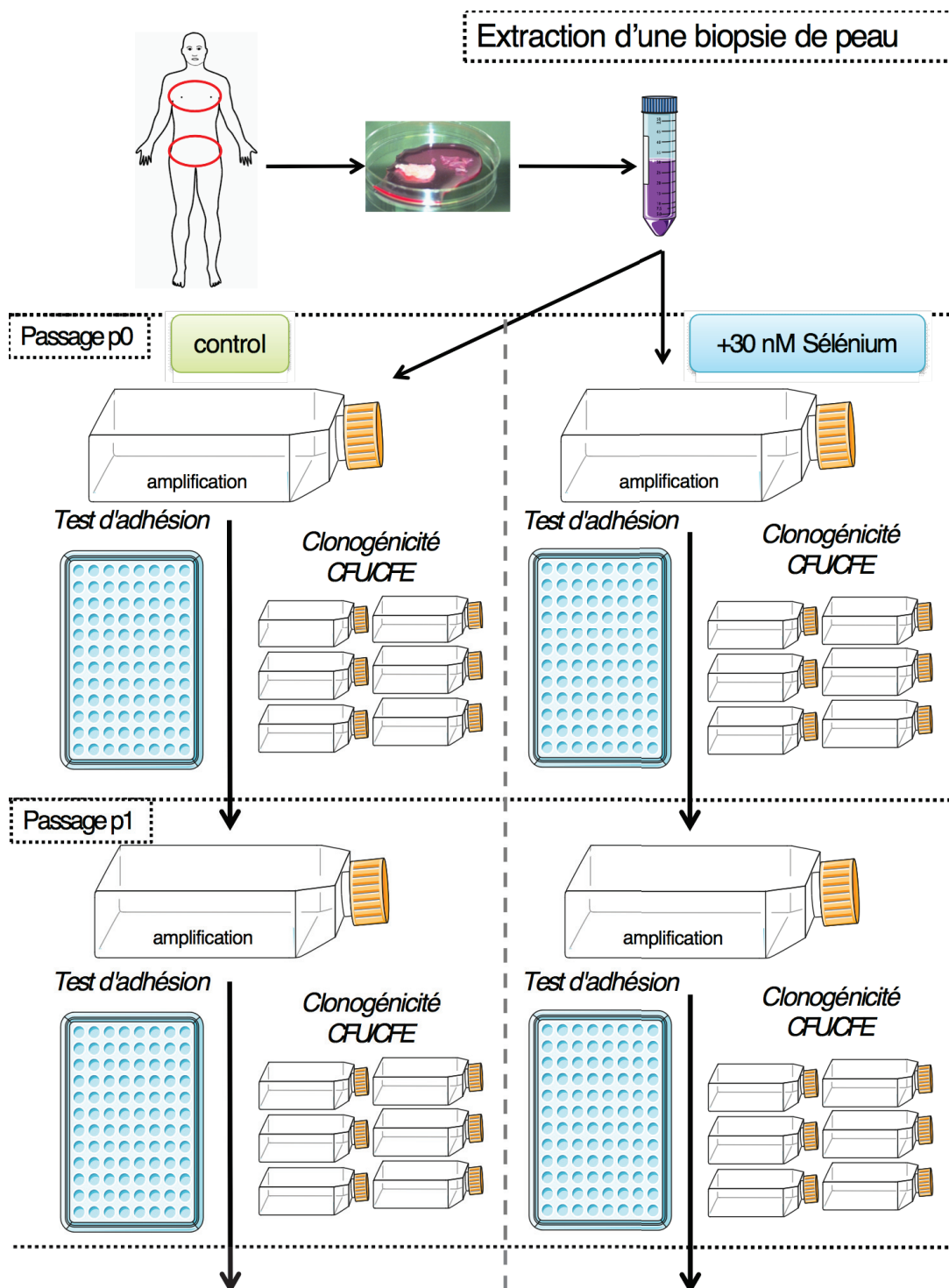


Figure 45: schéma expérimental des étapes pour l'analyse de la senescence répliative des kératinocytes primaires supplémentés ou non à 30 nM de sélénium

IV. PRESENTATION DES RESULTATS

www.aging-us.com

AGING 2017, Vol. 9, Advance

Research Paper

Selenium preserves keratinocyte stemness and delays senescence by maintaining epidermal adhesion

Lara Jobeili^{1,3}, Patricia Rousselle², David Béal^{4,5}, Eric Blouin⁶, Anne-Marie Roussel⁴, Odile Damour^{1,2}, Walid Rachidi^{4,5}

¹Cell and Tissue Bank of Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

²Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique, UMR 5305, CNRS, University Lyon 1, Lyon, France

³CarMeN Laboratory, INSERM U-1060, INRA USC-1235, Lyon 1 University, Lyon, France

⁴Grenoble Alpes University, Grenoble, France

⁵CEA, INAC, SyMMES, Grenoble, France

⁶Labcatat Pharmaceuticals, Montrouge, France

Correspondence to: Walid Rachidi; email: walid.rachidi@univ-grenoble-alpes.fr

Keywords: selenium, replicative life span, skin aging, adhesion, keratinocytes stem cells

Received: August 22, 2017 Accepted: November 2, 2017 Published: November 25, 2017

Copyright: Jobeili et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Skin is constantly exposed to environmental factors such as pollutants, chemicals and ultra violet radiation (UV), which can induce premature skin aging and increase the risk of skin cancer. One strategy to reduce the effect of oxidative stress produced by environmental exposure is the application of antioxidant molecules. Among the endogenous antioxidants, selenoproteins play a key role in antioxidant defense and in maintaining a reduced cellular environment. Selenium, essential for the activity of selenoproteins, is a trace element that is not synthesized by organisms and must be supplied by diet or supplementation. The aim of this study is to evaluate the effect of Selenium supplementation on skin aging, especially on keratinocytes, the main cells of the epidermis. Our results demonstrate for the first time to our knowledge, the major role of Selenium on the replicative life span of keratinocytes and on aging skin. Selenium protects keratinocyte stem cells (KSCs) against senescence via preservation of their stemness phenotype through adhesion to the basement membrane. Additionally, Selenium supplementation maintains the homeostasis of skin during chronological aging in our senescent skin equivalent model. Controlled supplementation with Selenium could be a new strategy to protect skin against aging.

INTRODUCTION

The skin, like every organ and tissue of the human body, is prone to aging. However, the skin aging process is affected by both intrinsic and extrinsic factors. Skin is composed of a pluristratified epidermis firmly anchored to the dermis through a complex structure, the dermal epidermal junction (DEJ). Aging impacts both the epidermal and dermal parts of the skin,

with a progressive loss of homeostasis, especially in the balance between proliferation and differentiation of the epidermis [1] and in the loss of interaction between the dermis and epidermis via disorganization of the DEJ [2]. Keratinocytes are the main cells of the epidermis and exist at various differentiation states from the basal layer, which is the only proliferative layer, to the non-living layer, the stratum corneum. Keratinocyte stem cells (KSCs) are necessary to ensure constant renewal

of the epidermis throughout life. They are maintained and protected as stem cells in a microenvironment called a “niche” and are strongly anchored to the DEJ through $\beta 1$ and $\alpha 6$ integrin binding to type IV collagen and laminin 332, respectively, the main components of the basement membrane [3,4]. To differentiate, KSCs break their interactions with the basement membrane and migrate to the suprabasal layers of the epidermis. KSCs interactions with the DEJ are therefore crucial for stemness, homeostasis, and skin structural integrity.

To date, photoaging is more studied than chronological aging because skin is constantly exposed to several oxidative environmental stressors (e.g., ultra violet radiation (UVA and UVB), natural ionizing radiation, pollutants, and chemicals) that contribute to pre-mature skin aging signs such as pigmentary stains, deep wrinkles, and an increased risk of skin cancer [5,6]. Thus, enhancement of the endogenous and/or exogenous antioxidant defenses could be a beneficial strategy to fight the effects of photoaging. Among the endogenous antioxidants, selenoproteins, which require the essential trace element Selenium for their activity, are the most important enzymes that participate in the protection of the entire organism against oxidative stress, with skin as the special target [7,8]. Several groups have shown that Selenium supplementation protect keratinocytes [9,10,11] melanocytes [12] and fibroblasts [13,14] from UV-induced cell death and DNA damage. Few articles have reported the importance of Selenium and selenoproteins on skin homeostasis in animals or humans. As described by Bates *et al.*, Selenium-deficient rats display a slower growth rate and sparse hair growth [15]. Additionally, the case of a young child with severe Selenium deficiency due to long-term parenteral nutrition was highlighted. This young child had dry skin and erythematous changes associated with cardiomyopathy [16]. An oral supplementation with Selenium resulted in a complete disappearance of the lesions and defects. These two studies reported cutaneous manifestations of Selenium deficiency. Sengupta *et al.* went further by implementing stable inactivation of selenoproteins in K14-expressing epidermal cells in a mouse model [17]. This led to abnormalities in skin, such as a decrease in epidermal thickness, wrinkle formation and epidermal detachment focally along the DEJ. Moreover, keratinocytes extracted from those mice showed an altered morphology and a lack of adhesion under standard culture conditions. These results demonstrate a link between selenoprotein expression and the maintenance of skin homeostasis. Moreover, it has been reported that replicative senescence of human fibroblast WI38 cells is controlled by Selenium levels and that this senescence selectively modulates selenoprotein expression [18]. Selenoproteins, especially seleno-

protein H, are important in genomic integrity and the preservation of cells from senescence [19]. The correlations among serum Selenium concentration, activity of selenoproteins, age, and longevity have been described, with a decrease in serum Selenium with age in healthy subjects, especially those over 60 years old [20]. In addition, low serum Selenium level is an important predictor of shortened longevity in elderly patients [20,21]. These studies indicate an increased requirement of Selenium supplementation in elderly persons.

The objective of this study was to investigate the effect of Selenium supplementation on chronological aging. First, we selected the lowest dose shown to have a positive effect on keratinocyte viability and clonogenic potential over replicative life span. Second, we tested the impact of Selenium supplementation in a 3D skin aging model [22,23] during an extended culture time [24]. This research focuses on the impact of Selenium on skin aging and highlights that Selenium can preserve KSCs in vitro via activation of adhesive properties throughout the cells’ replicative life span and delay senescence of the epidermis in an extended live-culture skin model.

RESULTS

Effect of Sodium Selenite supplementation on keratinocyte viability and clonogenic potential

The effects of different concentrations of NaSe on cell viability were assessed using an MTT test on fibroblasts and keratinocytes (Figure 1A and B, respectively). Concerning fibroblasts, the first concentration that shows no significant toxicity is 0.0633 μM . The highest concentration tested (63.3 μM) is highly cytotoxic with 2% cell viability, but between 6.3 μM and 0.127 μM , cell viability ranges from 76% to 94% (** $p < 0.001$). Concerning keratinocytes, they are more sensitive to the strong dose of NaSe, and at 63.3 μM there is no cell viability. Additionally, between 6.3 μM and 0.316 μM , the cell viability ranges from 40% to 94% (** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$, respectively). Then, the effect of 0.253 μM and 0.127 μM of NaSe allows cell viability of approximately 98%, and the cytotoxic effect is not significant. One hundred percent viability is reached with the lowest dose (0.0633 μM). Interestingly, keratinocytes are also more resistant to the low dose of NaSe compared to fibroblasts.

Then, we performed a clonogenic assay with three selected concentrations of NaSe: 6.3 μM , 0.253 μM and 0.0633 μM . With a long-term exposure of low-density keratinocytes to NaSe, the results are comparable to short-term exposure. No clones are observed with 6.3

μM , confirming the toxic concentration, whereas for both concentrations (0.253 μM and 0.0633 μM), we observed a significant increase in the number of holoclones compared to the control condition (Figure 1C). The number of holoclones allows for the calculation of CFE (colony forming efficiency), clearly demonstrating that NaSe can improve the CFE ratio of keratinocytes from 1.5 to 2 times (Figure 1D $**p<0.01$ and $*p<0.05$).

Those results prompted us to explore lower concentrations of NaSe to obtain the lowest dose possible to maximize the effect on keratinocytes. We selected 8 concentrations in a range of from 0.633 μM to 1.875 nM.

Figure 2 shows the CFE results obtained after the treatment of keratinocytes from 3 independent donors with these selected concentrations. Because of the well-

known inter-individual variation and strong variation of CFE, the results are expressed as the ratio of the treated keratinocyte CFE to the control keratinocyte CFE. The ratio is significantly increased in the range from 0.253 μM to 30 nM. Regardless of the donor, the concentration of 30 nM NaSe leads to the highest CFE ratio of 1.563 ± 0.255 ($***p<0.001$).

Since this concentration improves the capacities of keratinocytes to give rise to holoclones, 30 nM NaSe was selected for constant supplementation of the culture medium for all the following experiments.

Sodium selenite supplementation delays the replicative senescence

The proliferative capacity of primary keratinocytes measured via subculture of the cumulative population doubling (PD; Table A in Figure 3) demonstrates in all

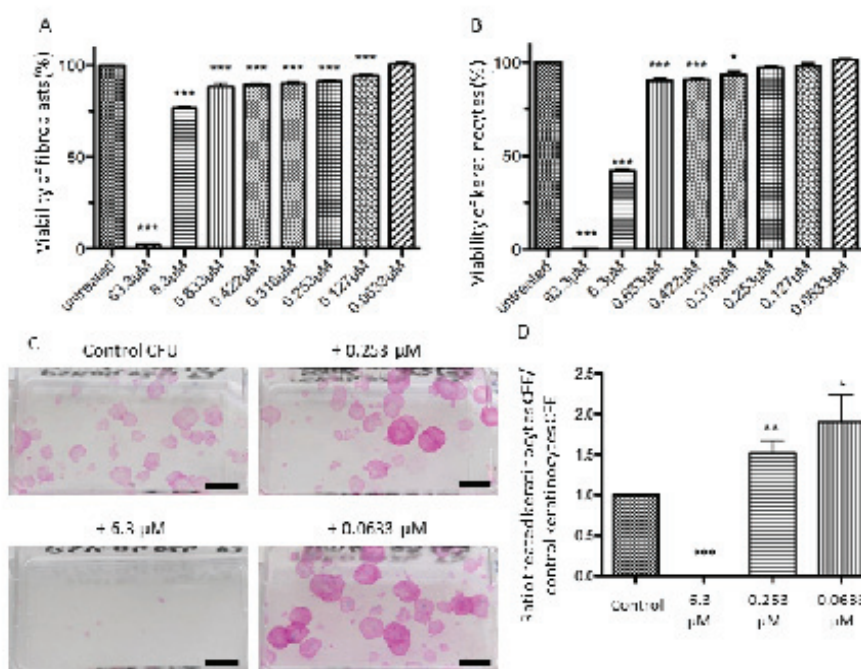


Figure 1. Influence of selenium on cell viability and proliferation. Effects on cell viability after application of a range of NaSe concentrations during 72 h for (A) fibroblasts and (B) keratinocytes. Viability is calculated as the “(mean of treated cells–mean of blank) / (mean of untreated cells–mean of blank)” \pm SD (n=3 donors and n=12 measurements per conditions). The stars illustrate statistical differences between 100 % and mean of experimental points. Effects of 3 Selenium concentrations on clonogenic potential of keratinocytes from 3 donors after 12 days of supplementation. (C) Representative aspect of the colonies at different concentrations versus the control, (n=3; scale bar=1cm) and (D) CFE ratio are calculated to avoid inter-individual heterogeneity of CFE. $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$.

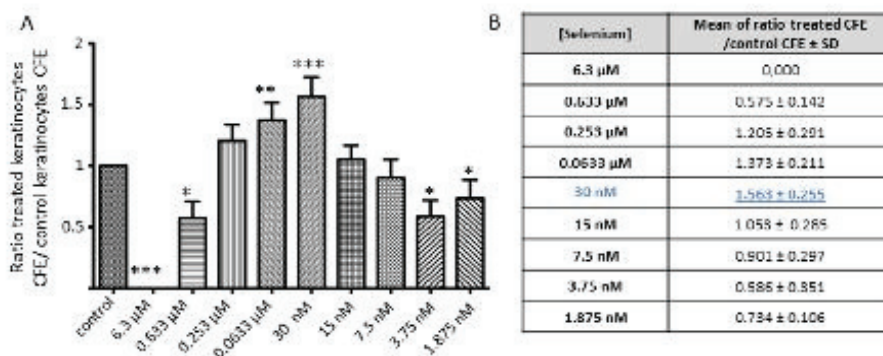
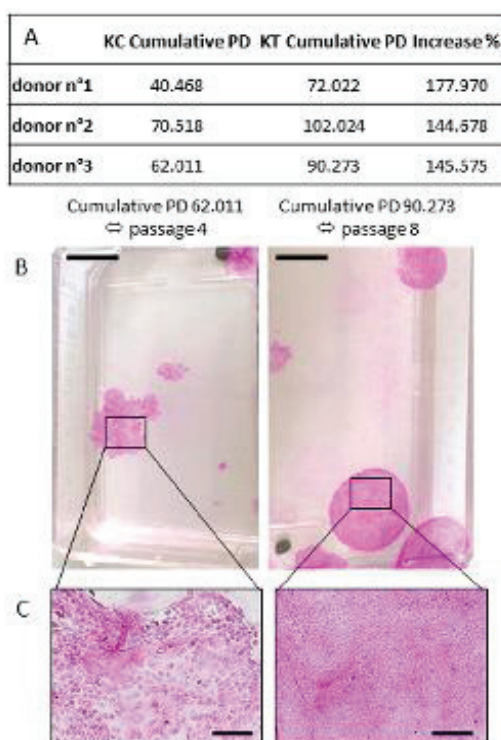


Figure 2. Effect of a low dose of Selenium on keratinocyte clonogenic potential. (A) Average of the CFE ratio after treatment (KT CFE) versus control KC CFE (KT CFE/KC CFE) obtained after 12 days of Selenium application over a range of concentrations from 6.3 μM to 1.875 nM, and (B) results are expressed as the mean ± SD of 3 donors (n=3). CFE ratios are calculated to avoid inter-individual heterogeneity of CFE. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.



cases that NaSe supplementation extended the replicative lifespan of human keratinocytes. Regardless of the donor, the cumulative PD that leads to holoclones appears to always increase by $156.074 \pm 14.597\%$ after 30 nM NaSe supplementation. NaSe treatment supports the presence of holoclones at least until passage 8 despite the donor (corresponding to 88.106 ± 15.118 cumulative PD), whereas in the control group, the holoclones are absent since passage 4 (corresponding to 57.666 ± 15.489 cumulative PD). Associated with the proliferative phenotype of the non-supplemented culture, the morphological aspects of the colonies are dramatically changed, as shown by a loss of smooth shape and a decrease in size, and are composed of differentiated keratinocytes with senescence morphology (Figure 3B and C, left panel).

Figure 3. Influence of Selenium on replicative senescence. (A) Cumulative population doubling corresponds to the sum of population doubling over subculture passages until the last passage with holoclones. The percent increase is calculated as (KT Cumulative PD/KC Cumulative PD) × 100 (KT: treated keratinocytes; KC: control keratinocytes). CFE was calculated at each passage over replicative life span where keratinocytes are still able to produce holoclones. (B) Example of colony morphology corresponding to the last cumulative PD/passages with holoclones. (Scale bar = 1cm) (C) Representative morphology of supplemented keratinocytes (small, cohesive and cobblestone keratinocytes) or control keratinocytes (senescence-associated phenotype with differentiated cells) at a late passage. Representative photographs are shown (scale bar=500 μm; n=3 donors).

Sodium selenite supplementation activates adhesion to type IV collagen and laminin 332 of human primary keratinocytes

Figure 4 demonstrates that NaSe supplementation improves keratinocyte adhesion during the replicative life span. Regardless of the donor, the passage and the adhesion markers, type IV collagen and laminin 332, which are ligands of $\beta 1$ integrin and $\alpha 6$ integrin, respectively, the percentage of adhered keratinocytes is significantly increased from 110% to 200% when they are supplemented with NaSe compared to control keratinocytes. Indeed, the increase in adhesion tends to be higher in terms of laminin 332 (157.4% \pm 22.9) than in terms of type IV collagen (133.1% \pm 12.4). Finally, the adhesion seems to be maximal in the first passages (p1 and p2) and decreases as the subculture continues.

Sodium selenite supplementation results in delayed skin equivalent senescence

The histological images of SEs cultured for 45 and 60 days clearly demonstrate that the thickness of the epithelium decreases as the time of culture without treatment increases. A long-term application (17 and 32 days) of 30 nM NaSe supports an SE with a thicker epidermis compared to the control with preservation of terminal differentiation and a decrease in the stratum corneum (Figure 5). At day 45, we can observe a significant increase (108%; * $p < 0.05$) in the epidermis thickness, calculated as 200 μ m for the treated SE versus 185 μ m for the control SE, and at day 60 we observe an increase of 121% (** $p < 0.01$) in the epidermis thickness, calculated as 112 μ m for the treated SE versus 92 μ m for the control SE. Moreover,

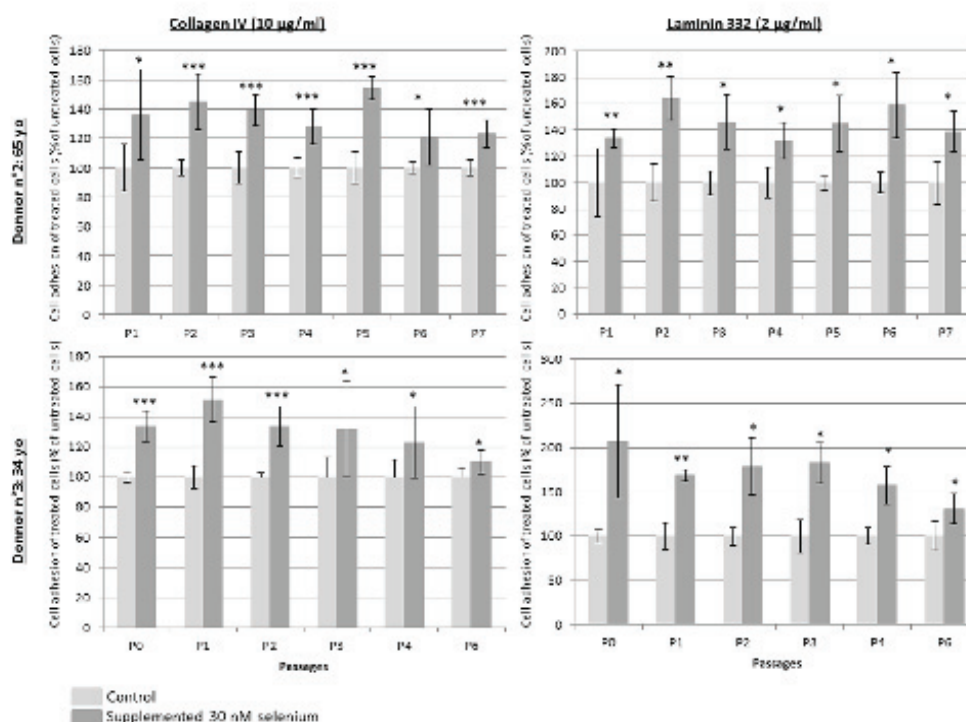


Figure 4. Keratinocyte relative adhesion to type IV collagen or laminin 332 during replicative senescence. Keratinocytes from 2 donors over subculture passages with or without SeNa supplementation and seeding at each passage on pre-coated wells with 10 μ g/ml type IV collagen (on the left) or with 2 μ g/ml laminin 332 (on the right). Results are the mean of n=3 measurements \pm SD normalized to the mean of adhesion obtain from poly-D-lysine coated plates. * $p < 0.025$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0002$.

the thickness decreases occur with the time of culture in both the treated and control groups.

Regardless of the time of culture (45 or 60 days), NaSe supplementation allows for the maintenance of SE homeostasis. Therefore, to clarify, Figure 5 D, E, F and G presents the representative results at day 60, which is the time when the senescence is higher. Figure 5D de-

monstrates a significant increase of 3.2 times in the number of basal keratinocytes expressing the proliferating marker Ki67, which is responsible of epithelium thickness, after NaSe treatment. If we consider the expression of cytokeratin 15 (Figure 5E), a marker of KSCs, the distribution appears to be conserved in the basal layer in both groups. However, the relative intensity of labeling is increased by 2 time

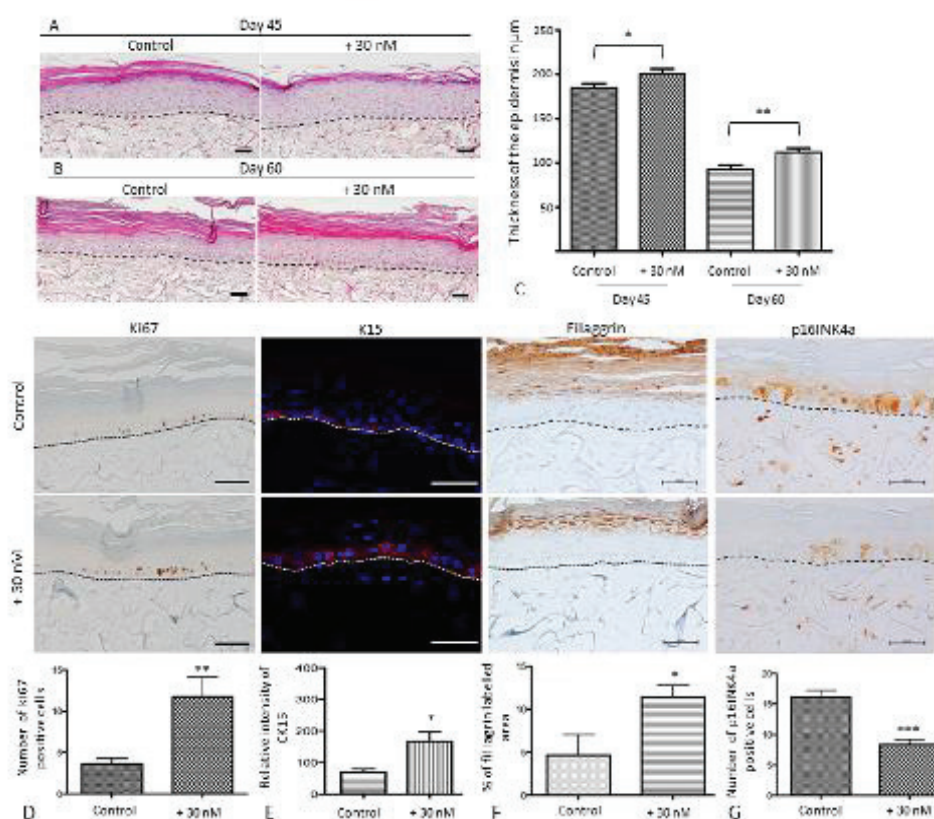


Figure 5. Sodium selenite supplementation improves skin equivalent quality during in vitro senescence and characterization of the balance between proliferation and differentiation of SEs during aging at day 60. Skin equivalents are generated from young keratinocyte and fibroblast donors and cultivated for 45 or 60 days to mimic skin aging [24]. The morphological aspects of SEs that were treated (+30 nM) or not (control) at (A) day 45 (D45) corresponding to 17 days of application and (B) day 60 (D60) corresponding to 32 days of application. Scale bar = 100 µm (C) Quantification of the thickness using ImageJ software is expressed in µm as a distance between from the basal layer of the epidermis to the stratum granulosum excepted for the stratum corneum. (D) Immunohistochemical staining of Ki67 in treated (+30 nM) or not (control) SEs and the average number of Ki67-expressing cells (scale bar = 500 µm). (E) Immunofluorescence staining of Cytokeratin 15 in treated (+30 nM) or not (control) SEs and the quantification of pixel intensity in relative units. (F) Immunohistochemical staining of filaggrin in SEs that were treated (+30 nM) or not (control) and quantification of labeled area in the living epidermis (scale bar = 500 µm). (G) Immunohistochemical staining of p16INK4a expression in SEs that were treated (+30 nM) or not (control) and quantification of the number of p16INK4a expressing cells (scale bar = 100 µm). The dermo-epidermal junction is indicated by a dotted line. Results are mean ± SD of 3 independent fields obtained from 3 independent samples. Representative photographs are shown. *p<0.05, **p<0.01.

in the treated SE compared to the control SE (200 RU and 100 RU, respectively; * $p < 0.05$). These data confirm that NaSe is able to maintain the proliferative capacity of KSCs to ensure the renewal of the epidermis and the maintenance of its thickness during skin aging.

Concerning the late differentiation marker (Figure 5F), the filaggrin expressing area in living epidermis (define as all the layers of the epidermis excepted for the stratum corneum) is 2.5 times higher in the treated SE versus the control SE (approximately 4.6% versus 11.4%, respectively; * $p < 0.05$). These results demonstrate that NaSe preserves the homeostasis of the epidermis with a balance between proliferation and differentiation, with a thicker living epithelium.

Finally, in our SE a p16INK4a is detected in both nuclear and cytoplasmic part of the cells (Figure 5G). NaSe decreases senescence due to long-term culture because the number of cells expressing p16INK4a, a senescence marker, is decreased by 2 times in the treated SE compared to the control SE (** $p < 0.01$). All these data allow us to confirm our hypothesis that NaSe treatment delays SE senescence.

Focusing on adhesion markers, NaSe supplementation during SE development induces the increase of $\beta 1$ and $\alpha 6$ integrin patterns (Figure 6). The $\alpha 6$ integrin expression appears to be increased by 1.6 times in the treated SE than in the control SE (180.3 ± 65.8 and 101.9 ± 31.5 , respectively; ** $p < 0.01$). In the same

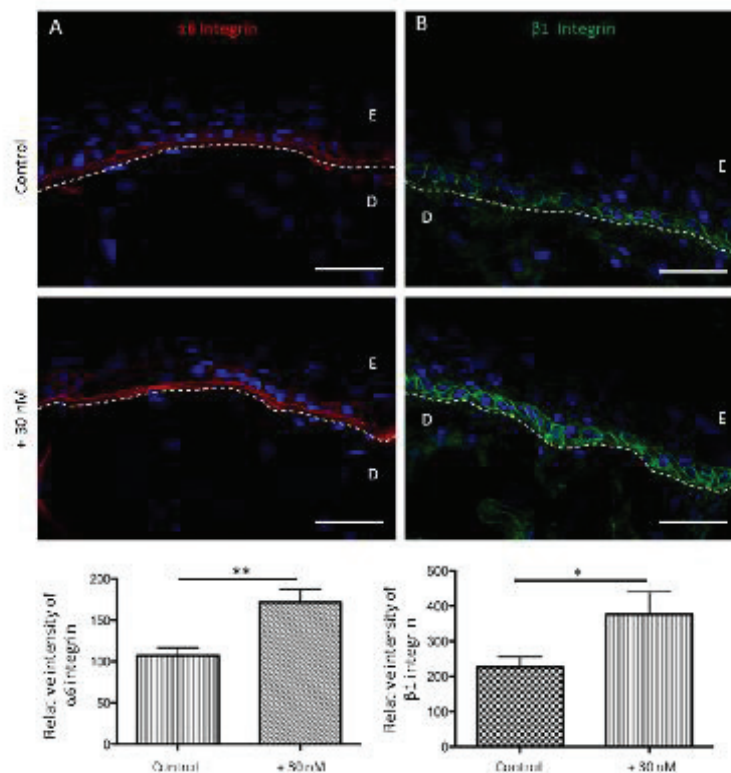


Figure 6. Sodium selenite allows the preservation of keratinocyte adhesion receptors for the basal layer in SEs during aging at day 60. (A) Immunofluorescence staining of $\alpha 6$ integrin in SEs that were treated (+30 nM) or not (control), and the quantification is expressed in pixel intensity (relative unit). (B) Immunofluorescence staining of $\beta 1$ integrin in SEs that were treated (+30 nM) or not (control), and the quantification is expressed in pixel intensity (relative unit). Results are the mean \pm SD of 5 independent fields from 3 independent samples. Representative photographs are shown; scale bar = 50 μ m; E: epidermis; D: dermis. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

manner, $\beta 1$ integrin expression is increased by 1.8 times in the treated SE compared to the control SE (376.4 ± 202.2 and 225.9 ± 94.3 , respectively; $*p < 0.05$).

DISCUSSION

Our results show for the first time that a low-dose Selenium supplement has beneficial effects on keratinocyte stemness and delays skin aging. We selected the optimal concentration to include this trace element in our culture condition. In the first experiment, due to inter-individual variation, the $0.253 \mu\text{M}$ concentration gave only a tendency to increase the CFE. So, we go further in low concentration and selected this concentration of 30 nM , already used by other teams as a photoprotective agent or to delay replicative senescence of human fibroblasts [18]. A portion of our results highlights the positive effect of Selenium on the proliferative properties of keratinocytes and their capacity to give rise to holoclones in culture and their ability to enhance their replicative life span in a monolayer culture. First, we observed that supplementation of keratinocytes during culture enhances the proportion of holoclones. Holoclones in culture represent the KSC population. KSCs are quiescent or low-cycling cells that ensure epidermal renewal over the lifetime. The high interfollicular KSCs anchorage to the basement membrane, corresponding to the follicular niche protects them from apoptosis, proliferation, differentiation and oxidative stress [1,25]. Their proliferative capacities can be activated by external stimuli. This niche can be defined as a micro-environment in which growth factors modulate adhesive interactions, cell cycle regulation and inter-cellular signaling. At this level, integrins and their ligands play a key role in cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) communication and the regulation and maintenance of KSC phenotypes [26–28]. Integrin ligands such as laminins and collagens are the major constituents of the human KSC niche [29]. Some studies are based on selecting a human KSC population by using integrins, showing the importance of integrins in the characterization of KSCs [30,31].

Second, we also observed that Selenium increases the replicative life span of primary keratinocytes from various donors of different ages. This confirms that Selenium supplementation is active despite the donors' differences in genetic background, health conditions, nutrition and age. Here, we note that the capacity of keratinocytes to give rise to holoclones is delayed with Selenium supplementation over subculture passages. It has been described in WI-38 fibroblasts that Selenium at 30 nM can delay replicative senescence [18] through ROS production and oxidative stress. In fact, in a Selenium-depleted culture condition, there is an

increase in oxidative stress and the ability to induce replicative senescence via p16, p21 and p53 signaling pathways. This effect can be reversed by the addition of Selenium with the consequence a decrease in ROS and oxidative stress and a delay of replicative senescence. We show that Selenium preserves the keratinocyte stem cell pool and their regenerative potential against replicative senescence in a monolayer culture condition via activation of the adhesive properties of supplemented keratinocytes over subculture. In fact, the proportion of keratinocytes adhering to laminin 332 and type IV collagen is improved from $133.1 \pm 12.4\%$ to $157.4 \pm 22.9\%$, respectively, regardless of the passage (from p0 to p6). Both of these proteins, ligand of $\beta 1$ and $\alpha 6$ integrin, are involved in the DEJ of skin and in the follicular KSC niche [32,33]. Therefore, we can suggest that in our model, maintenance of holoclones in a monolayer culture during the replicative life span is due to the activation of keratinocyte adhesion to collagen type IV and laminin 332 due to an enrichment of $\beta 1$ - and $\alpha 6$ integrin-expressing KSCs [27,28].

In this study, we also aimed to be closer to aging using a dermo-epidermal model, which is more physiologically accurate than a monolayer culture. Indeed, it led to a pluristratified and differentiated epidermis firmly anchored on a living dermis through a DEJ. Our data confirm the impact of Selenium using our SE model over an extended culture time, mimicking chronological skin aging [24]. Indeed, this 3D model based on extending time of culture recapitulates several biochemical and morphological modifications associated with chronological skin aging such as decreased proliferation and differentiation, modifications of DEJ and increased P16INK4a expression which is a good biomarker for cell senescence. Investigating the balance between proliferation and differentiation, we highlight that Selenium has a strong beneficial effect on chronological skin aging. As in normal skin aging, our control SE presents signs of aging with culture, as shown by a decrease in epidermal thickness that is linked to a decrease in proliferating cells, an increase in senescence-associated marker p16INK4a [34–36] and a loss of homeostasis. For the treated SE, the conservation of keratinocyte proliferation allows a thicker epidermis over time and a better differentiation, which is followed by filaggrin expression. Simultaneously, the protein p16INK4a (located in both nuclear and cytoplasmic part of the cells as previously describe [37]) appears to be less expressed when the SEs are protected by Selenium. Selenium pre-treatment may decrease p16INK4a expression by its ability to alter post-translational modifications as DNA methylation. Indeed, selenium has been shown to alter promoter DNA demethylation [38], histone deacetylase [39] and kinase activities [40].

Note that p16INK4a CpG island methylation is associated with its transcriptional silencing [41].

On the other hand, selenium beneficial effect on chronological skin aging might be due to the activating effect of Selenium on the adhesion of keratinocytes to the basement membrane, as shown by the over expression of $\beta 1$ and $\alpha 6$ integrin in the treated SE. Integrin expression is impaired during skin aging [42], but with Selenium supplementation, the expression pattern is maintained. Our results demonstrate that Selenium protects KSCs by preserving integrins and consequently the capacity for epidermal renewal. All together, these data strongly support our hypothesis that Selenium supplementation acts with a significant protective effect against chronological skin aging. These results are in agreement with those suggesting a close interplay between Selenium and healthy aging [21], since serum Selenium has been related to the longevity of the human population [20].

Altogether, our results suggest that the benefits of Selenium could be due to an enhancement in the adhesive properties of KSCs in a monolayer culture and reconstructed tissue that could allow KSC preservation through replicative senescence and skin aging. We propose that Selenium could be a good “anti-aging” agent and could be used to protect skin from chronological aging and the decrease of keratinocytes stemness of lifetime.

MATERIALS AND METHODS

Tissue harvest

Normal human skin tissue explants were obtained from the surgical discard of anonymous healthy patients with informed consent in accordance with ethical guidelines and declared to the French research ministry (Declaration no. DC-2008-162 delivered to the Cell and Tissue Bank of Hospices Civils de Lyon).

Fibroblast and Keratinocyte cultures

Fibroblasts were grown in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), antibiotics (20 mg/mL gentamicin (Panpharma, Fougères, France), 100 IU/mL penicillin (Panpharma), and 1 mg/mL amphotericin B (Panpharma). Keratinocytes were grown on a feeder layer of irradiated human fibroblasts pre-seeded at 4000 cell/cm², as previously described [23,43], in a mixture of 3:1 DMEM and Ham’s F12 (Invitrogen, Carlsbad, USA), respectively, supplemented with 10% FCS, 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF; R&D systems, Minneapolis, MN, USA), 0.12 IU/mL insulin (Lilly,

Saint-Cloud, France), 0.4 mg/mL hydrocortisone (UpJohn, St Quentin en Yvelines, France), 5 mg/mL triiodo-L-thyronine (Sigma, St Quentin Fallavier, France), 24.3 mg/mL adenine (Sigma), isoproterenol (Isuprel, Hospira France, Meudon, France) and antibiotics as above. For each cell type, the medium was changed every 2 days until confluence was reached. At confluency, cells were re-suspended with trypsin-EDTA 0.05% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) and used for the in vitro 3D model or the colony forming unit and toxicity assays.

Cytotoxicity assay

Keratinocytes or fibroblasts were seeded in 6 -well plates and grown until 80% confluency. Then, NaSe, provide by Labcatal Pharmaceuticals as pharmaceutical liquid solution in sterile water, was diluted in keratinocyte or fibroblast cultures at a concentration ranging from 63.3 μ M to 0.0633 μ M for 72 h. After incubation, a solution of tetrazolium dye MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) in phosphate buffered saline (PBS) at 1 mg/ml was added to the supernatant of the cells for 2 h. The formazan precipitate was solubilized using dimethyl sulfoxide and transferred to 96-well plates to measure absorbance at 560 nm using a spectrophotometer. For each concentration, 3 wells and 12 measurements per well were obtained for 3 independent donors. Viability is calculated as the “(mean of treated cells–mean of blank) / (mean of untreated cells–mean of blank)” \pm SD (n=3 donors and n=12 measurements per conditions). The stars illustrate statistical differences between untreated condition (100%) and mean of experimental points.

Clonogenic assay

Colony forming efficiency (CFE) was evaluated with a large-scale treatment of low-dose NaSe at concentrations ranging from 6.3 μ M to 1.875 nM. Keratinocytes were seeded at clonal density, 10 to 20 cells/cm², onto a feeder layer and cultivated for 10 to 14 days. Three flasks were fixed and colored using rhodamine B (Sigma) at 0.01 g/mL in 4% para-formaldehyde for 30 min. The CFE was calculated according to Barrandon et al. [43] as CFE = CFU (meroclonal + holoclonal number) \times 100/(cellular seeding density). In our manuscript the term “holoclonal” was used to refer to large (\geq 5 mm) and homogeneous clones with regular and smooth contours whereas meroclonal are intermediate sized, heterogeneous and display contours. For the populating doubling calculation, cells from 3 flasks were re-suspended by a trypsin treatment and used for cell

numeration. Population doubling was determined as $PD = \ln(\text{number of harvested cells}/\text{number of cells seeded})/\ln 2$ (with \ln for natural logarithm). For the analysis of the extended life span, cells from each donor were separated into two groups: treated (KT) or control (KC). The supplementations began at the seeding of the primary culture (just after keratinocytes extraction) and persisted throughout along passages. CFU/CFE was performed at each passage both for KC and KT. The experiments were performed on six independent donors: 3 for the low-dose scale of NaSe and 3 for the extended life span ($n=6$ flasks for each condition).

Adhesion assay

Because KSCs are characterized by their strong adhesion to the ECM in “niches” through $\beta 1$ and $\alpha 6$ integrins [28], we tested the keratinocyte adhesion to their respective ligands, laminin 332 and type IV collagen, the main components of DEJs [44]. For that, multi-well tissue culture plates (Costar, Dutscher, Brumath, France) were coated with the indicated concentrations of laminin 332 [45] or collagen IV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) substrates by overnight adsorption at 4°C. Cells were detached by incubation with trypsin and rinsed in serum-free medium prior to the experiment. After saturating the wells with 1% BSA, the plates were used immediately for cell adhesion assays (30 000 cells/well) in serum-free medium containing selenium or not at the concentration used for cell culture. The same amount of cells was also plated on poly-D-lysine coated plates (Biocoat Cell Environments, 6 wells per condition) to evaluate the maximal cell attachment capacity as previously described [46]. After 30 min to 1 h, non-adherent cells were washed with PBS, and the extent of adhesion was determined after fixation of adherent cells, followed by staining with 0.1% crystal violet and absorbance measurements at 570 nm. A blank value corresponding to BSA-coated wells was subtracted. In all experiments, each assay point was derived from triplicate measurements (three wells per assay point) and each adhesion score was normalized to the mean of adhesion obtained from poly-D-lysine coated plates.

In vitro 3D human skin equivalent (SE) culture

SE cultures were prepared as described previously [23]; fibroblasts from young donors were seeded at a final density of 250 000 cells/cm² onto a dermal substrate made of chitosan-cross-linked collagen-glycosaminoglycan matrix [47]. This SE was grown in fibroblast medium supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L-ascorbic acid (Sigma) and 10 ng/ml of EGF at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, and the medium was changed every day for

21 days. For the preparation of SE from keratinocytes, keratinocytes from young donor were seeded onto the SE on day 21. These submerged SEs were cultured for 7 days in keratinocyte medium and then raised at the air-liquid interface and cultured in a simplified keratinocyte medium containing DMEM supplemented with 10% FCS, 10 ng/mL EGF, 0.12 IU/mL insulin, 0.4 mg/mL hydrocortisone, and antibiotics for 17 days or 32 days. The NaSe was added extemporaneously to the culture medium for a final concentration of 30 nM. Samples were systematically harvested after 45 and 60 days of total cell culture and were immediately fixed in neutral buffered formalin 4% (Alphapath, Madaison, France) for 24 h then embedded in paraffin or directly in OCT compound (Euromedex, Strasbourg, France). For each cell culture condition and analysis, SEs were produced in triplicate.

Histology and immunohistological (IH) analyses

Paraffin-embedded formalin-fixed samples were cut into 5- μm sections. After dewaxing and rehydration, sections were stained with hematoxylin phloxine saffron (HPS staining). For immunohistochemistry, after heat-mediated antigen retrieval treatment, tissue sections were incubated in 5% H₂O₂/3% normal goat serum (NGS; Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) to inactivate endogenous peroxidases. Non-specific binding was blocked in PBS containing 4% bovine serum albumin (BSA, Sigma, St Quentin Fallavier, France) and 5% NGS. Sections were then incubated with the following primary antibodies (Table 1) diluted in PBS/4% BSA/5% NGS overnight at 4°C.

After incubation for 1 h with a peroxidase-conjugated secondary antibody (EnVision, Dakocytomation, Glostrup, Denmark), the antigen was detected with 3,3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride as the substrate. Tissue sections were subsequently counterstained using Harris hematoxylin (25%, Sigma). For immunofluorescence, labeling was performed on air-dried 5- μm cryosections. Air-dried cryosections were incubated with mono-clonal-mouse primary antibodies overnight at 4°C. Then, sections were incubated with secondary Alexa 488- or 568-conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, USA) for 1 h at room temperature. Nuclear counterstaining using Hoechst stain was carried out according to a routine protocol. Image acquisition was performed using an Eclipse 50i microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France) for light microscopy and a Zeiss LSM 510 confocal laser scanning microscope for fluorescence.

Antibodies used and operating conditions are displayed in Table 1.

Table 1. Primary antibodies.

Clone	Class	Specificity	Origin	Dilution Used
MIB-1	Mouse IgG1	Ki-67	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:50
LKb15	Mouse IgG2a	Cytokeratin 15	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	1:200
E6H4	Mouse IgG2a	P16INK4A	Ventana Medical systems, USA	
15C10	Mouse IgG1	Filaggrin	Novocastra Laboratories	1:25
PSD2	Mouse IgG1	Integrin β 1	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg, Germany	1:500
NIK-GoH3	Rat IgG2a	Integrin α 6	Millipore	1:500

Image analysis and processing

Image processing and analysis were performed using the software Image J with the MBF plugin for microscopy (<http://www.macbiophotonics.ca/imagej/>, Research Service Branch, US National Institute of Health, United States).

The living epidermal thickness, consider as all layers from basal layer to stratum granulosum excepted the stratum corneum, was measured as the distance between the basement membrane to the stratum corneum and expressed in μ m on at least 20 fields per sample. Ki67 and P16INK4a epidermal positive cells were automatically separated from the background and, counted. Data are expressed in number of positive cells per epidermal field.

The results are express as the surface area of filaggrin, and the relative expression for cytokeratin 15, integrin α 6 and β 1. Positively stained-tissue areas were automatically detected and segmented from other pixels and automatically measured. Data were normalized by the area of living epidermis for filaggrin expression, and by the length of basement membrane for cytokeratin 15, integrin α 6 and β 1. Measurements are performed on at least 3 different fields of 3 different SE per experimental condition.

Statistical analysis

For all data, the statistical significance was assessed using Mann Whitney test with the software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), and statistically significant differences are indicated by asterisks as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ (or otherwise indicated on the figure, depending on the experiment).

Abbreviations

CFE: colony forming efficiency; CFU: colony forming unit; CPD: cumulative population doubling; ECM: extra

cellular matrix; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; KSCs: keratinocyte stem cells; NaSe: sodium selenite; OCT: optimum cutting temperature; PBS: phosphate buffered saline; PD: population doubling; SE: skin equivalent.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Lara Jobeili performed experiments, analyzed the data, and wrote the paper. Patricia Rousselle performed adhesion experiments and analyzed the data. Walid Rachidi and Odile Damour designed the study, analyzed data, and wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We grateful Eric Blouin from Labcatal Pharmaceuticals for providing the "Oligosol" and Anne Marie Roussel for critical review of the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors state no conflicts of interest.

FUNDING

Lara Jobeili was a PhD student supported by a grant from Labcatal Pharmaceuticals to HCL. Patricia Rousselle contribution was founded by ANR grant No. ANR-13-RPIB-0003-01. Walid Rachidi contribution was founded by CEA through DFR-Impulsion project.

REFERENCES

1. Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells: properties, markers, and location. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97:13473–75. <https://doi.org/10.1073/pnas.250380097>
2. Giangreco A, Goldie SJ, Failla V, Saintigny G, Watt FM. Human skin aging is associated with reduced expression of the stem cell markers β 1 integrin and MCSP. *J Invest Dermatol*. 2010; 130:604–08.

- <https://doi.org/10.1038/jid.2009.297>
3. Chen S, Lewallen M, Xie T. Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. *Development*. 2013; 140:255–65. <https://doi.org/10.1242/dev.083139>
 4. Watt FM. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol.* 1998; 353:831–37. <https://doi.org/10.1098/rstb.1998.0247>
 5. Naylor EC, Watson RE, Sherratt MJ. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*. 2011; 69:249–56. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.04.011>
 6. Afanas'ev IB. Signaling by reactive oxygen and nitrogen species in skin diseases. *Curr Drug Metab.* 2010; 11:409–14. <https://doi.org/10.2174/138920010791526060>
 7. Lu J, Holmgren A. Selenoproteins. *J Biol Chem.* 2009; 284:723–27. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800045200>
 8. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci.* 2001; 57:1825–35. <https://doi.org/10.1007/PL00000664>
 9. Rafferty TS, McKenzie RC, Hunter JA, Howie AF, Arthur JR, Nicol F, Beckett GJ. Differential expression of selenoproteins by human skin cells and protection by selenium from UVB-radiation-induced cell death. *Biochem J.* 1998; 332:231–36. <https://doi.org/10.1042/bj3320231>
 10. Leccia MT, Richard MJ, Joanny-Crisci F, Beani JC. UV-A1 cytotoxicity and antioxidant defence in keratinocytes and fibroblasts. *Eur J Dermatol.* 1998; 8:478–82.
 11. Stewart MS, Cameron GS, Pence BC. Antioxidant nutrients protect against UVB-induced oxidative damage to DNA of mouse keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol.* 1996; 106: 1086–89. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12339344>
 12. Rafferty TS, McKenzie RC, Hunter JA, Howie AF, Arthur JR, Nicol F, Beckett GJ. Differential expression of selenoproteins by human skin cells and protection by selenium from UVB-radiation-induced cell death. *Biochem J.* 1998; 332:231–36. <https://doi.org/10.1042/bj3320231>
 13. Moysan A, Morlière P, Marquis I, Richard A, Dubertret L. Effects of selenium on UVA-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts. *Skin Pharmacol.* 1995; 8:139–48. <https://doi.org/10.1159/000211337>
 14. Emonet-Piccardi N, Richard MJ, Ravanat JL, Signorini N, Cadet J, Béani JC. Protective effects of antioxidants against UVA-induced DNA damage in human skin fibroblasts in culture. *Free Radic Res.* 1998; 29:307–13. <https://doi.org/10.1080/10715769800300341>
 15. Bates JM, Spate VL, Morris JS, St Germain DL, Galton VA. Effects of selenium deficiency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid hormone economy in the rat during development. *Endocrinology.* 2000; 141:2490–500. <https://doi.org/10.1210/endo.141.7.7571>
 16. Kanekura T, Yotsumoto S, Maeno N, Kamenosono A, Saruwatari H, Uchino Y, Mera Y, Kanzaki T. Selenium deficiency: report of a case. *Clin Exp Dermatol.* 2005; 30:346–48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2005.01746.x>
 17. Sengupta A, Lichti UF, Carlson BA, Ryscavage AO, Gladyshev VN, Yuspa SH, Hatfield DL. Selenoproteins are essential for proper keratinocyte function and skin development. *PLoS One.* 2010; 5:e12249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012249>
 18. Legrain Y, Touat-Hamici Z, Chavatte L. Interplay between selenium levels, selenoprotein expression, and replicative senescence in WI-38 human fibroblasts. *J Biol Chem.* 2014; 289:6299–310. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.526863>
 19. Wu RT, Cao L, Chen BP, Cheng WH. Selenoprotein H suppresses cellular senescence through genome maintenance and redox regulation. *J Biol Chem.* 2014; 289:34378–88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.611970>
 20. Akbaraly NT, Arnaud J, Hinger-Favier I, Gourlet V, Roussel AM, Berr C. Selenium and mortality in the elderly: results from the EVA study. *Clin Chem.* 2005; 51:2117–23. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.055301>
 21. Ray AL, Semba RD, Walston J, Ferrucci L, Cappola AR, Ricks MO, Xue QL, Fried LP. Low serum selenium and total carotenoids predict mortality among older women living in the community: the women's health and aging studies. *J Nutr.* 2006; 136:172–76.
 22. Augustin C, Collombel C, Damour O. Use of Dermal Equivalent and Skin Equivalent Models for in Vitro Cutaneous Irritation Testing of Cosmetic Products: Comparison with in Vivo Human Data. *J Toxicol Cutaneous Ocul Toxicol.* 1998; 17:5–17. <https://doi.org/10.3109/15569529809049300>
 23. Black AF, Bouez C, Perrier E, Schlotmann K, Chapuis F, Damour O. Optimization and characterization of an engineered human skin equivalent. *Tissue Eng.* 2005; 11:723–33. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.723>
 24. Dos Santos M, Metral E, Boher A, Rousselle P, Thepot A, Damour O. In vitro 3-D model based on extending time of culture for studying chronological epidermis

- aging. *Matrix Biol.* 2015; 47:85–97.
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.03.009>
25. Cotsarelis G, Kaur P, Dhouailly D, Hengge U, Bickenbach J. Epithelial stem cells in the skin: definition, markers, localization and functions. *Exp Dermatol.* 1999; 8:80–88.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.1999.tb00351.x>
 26. Li A, Simmons PJ, Kaur P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:3902–07. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3902>
 27. Jones PH, Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell.* 1993; 73:713–24.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90251-K](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90251-K)
 28. Watt FM, Jones PH. Expression and function of the keratinocyte integrins. *Dev Suppl.* 1993 (Suppl);185–92.
 29. Watt FM, Fujiwara H. Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3:a005124.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005124>
 30. Giangreco A, Qin M, Pinter JE, Watt FM. Epidermal stem cells are retained in vivo throughout skin aging. *Aging Cell.* 2008; 7:250–59.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00372.x>
 31. Morgner J, Ghatak S, Jakobi T, Dieterich C, Aumailley M, Wickström SA. Integrin-linked kinase regulates the niche of quiescent epidermal stem cells. *Nat Commun.* 2015; 6:8198.
<https://doi.org/10.1038/ncomms9198>
 32. Burgeson RE, Christiano AM. The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol.* 1997; 9:651–58.
[https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80118-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80118-4)
 33. Ghohestani RF, Li K, Rousselle P, Uitto J. Molecular organization of the cutaneous basement membrane zone. *Clin Dermatol.* 2001; 19:551–62.
[https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(00\)00175-9](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(00)00175-9)
 34. Waaij ME, Parish WE, Strongitharm BH, van Heemst D, Slagboom PE, de Craen AJ, Sedivy JM, Westendorp RG, Gunn DA, Maier AB. The number of p16INK4a positive cells in human skin reflects biological age. *Aging Cell.* 2012; 11:722–25.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00837.x>
 35. Waaij ME, Gunn DA, Adams PD, Pawlikowski JS, Griffiths CE, van Heemst D, Slagboom PE, Westendorp RG, Maier AB. P16INK4a Positive Cells in Human Skin Are Indicative of Local Elastic Fiber Morphology, Facial Wrinkling, and Perceived Age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2016; 71:1022–28.
<https://doi.org/10.1093/gerona/glv114>
 36. Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, Bartek J, Scharffetter-Kochanek K, Jansen-Dürr P, Wlaschek M. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell.* 2006; 5:379–89.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00231.x>
 37. Adamus J, Aho S, Meldrum H, Bosko C, Lee JM. p16INK4A influences the aging phenotype in the living skin equivalent. *J Invest Dermatol.* 2014; 134:1131–33. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.468>
 38. Speckmann B, Schulz S, Hiller F, Hesse D, Schumacher F, Kleuser B, Geisel J, Obeid R, Grune T, Kipp AP. Selenium increases hepatic DNA methylation and modulates one-carbon metabolism in the liver of mice. *J Nutr Biochem.* 2017; 48:112–19.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.07.002>
 39. Xiang N, Zhao R, Song G, Zhong W. Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells. *Carcinogenesis.* 2008; 29:2175–81.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgn179>
 40. Zeng H. Selenite and selenomethionine promote HL-60 cell cycle progression. *J Nutr.* 2002; 132:674–79.
 41. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med.* 1995; 1:686–92.
<https://doi.org/10.1038/nm0795-686>
 42. Makrantonaki E, Zouboulis CC. Molecular mechanisms of skin aging: state of the art. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1119:40–50.
<https://doi.org/10.1196/annals.1404.027>
 43. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84:2302–06. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.8.2302>
 44. Nishiyama T, Amano S, Tsunenaga M, Kadoya K, Takeda A, Adachi E, Burgeson RE. The importance of laminin 5 in the dermal-epidermal basement membrane. *J Dermatol Sci.* 2000 (Suppl 1); 24:S51–59. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(00\)00142-0](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(00)00142-0)
 45. Rousselle P, Lunstrum GP, Keene DR, Burgeson RE. Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J Cell Biol.* 1991; 114:567–76.
<https://doi.org/10.1083/jcb.114.3.567>
 46. Carulli S, Beck K, Dayan G, Boulesteix S, Lortat-Jacob H, Rousselle P. Cell surface proteoglycans syndecan-1 and -4 bind overlapping but distinct sites in laminin α3 LG45 protein domain. *J Biol Chem.* 2012;

287:12204–16.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.300061>

47. Shahabeddin L, Berthod F, Damour O, Collombel C. Characterization of skin reconstructed on a chitosan-cross-linked collagen-glycosaminoglycan matrix. *Skin Pharmacol.* 1990; 3:107–14.
<https://doi.org/10.1159/000210857> x

CHAPITRE N°3

RESULTATS COMPLEMENTAIRES EN COURS DE FINALISATION

**Compensatory response to the decrease of fibroblast number induced by chronological aging
by a decrease in elastolysis in a SE model**

Lara Jobeili¹, Teramura Takhasi², Eiji Naru³, K. Kaji², Romain Debret⁴, Odile Damour³, Jérôme Lamartine⁴.

¹Cell and Tissue Bank of Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

²KOSE corporation, Japan

⁴Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique, UMR 5305, CNRS, University Lyon 1, Lyon, France

INTRODUCTION

Aging is a slow, continuous and irreversible process that causes structural changes in all organs and tissues. The first signs of aging visible on the skin are a decrease in thickness, changes in color, texture, transparency, firmness with appearance of wrinkles (1). The chronology and the intensity of appearance of these cutaneous alterations are variable according to the individual, the anatomical sites considered, genetic, ethnic and environmental factors (2). In the dermis, although representing 3-4% of ECM compared to 90% of collagen, elastic tissue is crucial. Indeed, it gives the skin its elasticity, with a passive recovery capacity without energy.

The structure of an elastic fiber is complex and requires multiple actors. It's a macro molecular complexe of an elastin core, composed by assembly and crosslinking of tropoelastin, deposited on microfibrils. The elastic fibers form a continuous, anastomosed and highly organized network. It's possible to distinguish three types of elastic fibers, firstly oxytalan fibers perpendicular to the DEJ, then elaunine fibers parallel to the DEJ and deeper the mature fibers highly anastomose.

Tropoelastine is soluble, globular and secreted in the extra cellular space to be firstly reticulated by lysyl oxidases (LOX) and especially by lysyl oxidase like 1 (LOXL1) and secondary deposited onto microfibrils rich in fibrillin 1 and the final macromolecular complex is insoluble and

resistant to degradation. Several proteins are associated to this assembly as decorin fibulin 1, 2 and 5 emilin and LTBP (3). Elastin is one of the most sustainable macromolecules of the body; it is almost not renewed during human life with a half-life estimated at 70 years (4,5).

Elastin is mainly studied in skin aging outside its physiological behavior. Indeed, elastin structure is rich in chromophore amino acid and this makes elastin particularly sensitive to UV radiation. Proteolytic enzymes, such as matrix metalloproteinases (MMP) are activated by UV radiation leading to an increase in proteolytic activity and therefore to an increase in the degradation of elastin. Accumulation of elastotic material, as altered, unorganized, and nonfunctional fibers constitutes solar elastosis. Excepted from the sun exposure degradation, the elastic tissue is poorly degraded and the effect of chronological aging on elastin is not well studied and described (6). At birth, each individual is endowed with an immature "elastic pool" that appears mature around 25 years old. Indeed, by TEM at this stage it is possible to distinguish microfibrils completely covered with amorphous elastin. With chronological aging, the elastic tissue does not vary excessively in quantity, but the fibers are altered by racemization and calcification (7) and then lose their functionality. This physiological degradation, although minimal, results in the release of elastin peptides and chemokines called matrikines (8).

Our reconstructed skin model is based on dermo-epidermal ensemble and was the first to highlight the formation of functional elastic fibers *in vitro* and their colocalisation with LOXL1 (9–12). Morphologically, this model allows the formation of oxytalan fibers perpendicular to the JDE, the elaunin fibers follow by co-expression of fibrillin and elastin (11) and mature fibers. A decrease in elastic tissue and LOX was observed in skin equivalent prepared from neonatal fibroblasts (10), young (19 years) or adults (42–49 years) (13,14), but no studies investigate evolution in later ages.

In this manner, we reconstructed skin equivalent using a support free self-assemble model with fibroblasts from 3 different adults donors (22–36 years old) and senior (72 years old). Among all fibroblasts we used to produce skin equivalent, some were derived from the same Japanese donor at 36 and 72 years old. This donor was also in excellent health and protected from the sun, and these fibroblasts are powerful for analysis chronological aging and avoid inter

individual variations. With those fibroblasts, this model allows us to reproduce the effects of chronological aging really closely and it's a good model to follow the evolution of elastogenesis in chronological aging. Skin equivalent were prepared as previously describe, with 3 weeks of fibroblasts culture to obtain a living dermal equivalent before seeding keratinocytes follow by another 4 weeks of culture to obtain epidermis homeostasis. The evolution of the thickness of the dermis and the composition of the ECM with age were analyzed by immuno histochemistry with evaluation of their expression per fibroblasts unit.

To validate our model, the first observation is the impact of age on the dermis with a decrease of thickness and of number of fibroblasts. Our results showed that collagens deposition and degradation in the dermis are not impacted by chronological aging in our skin equivalent model. Interestingly, our results also show a completely different behavior for elastic fibers deposition and degradation. For the first time we show that, with chronological aging and despite the decrease of fibroblasts in the dermis, the deposition of elastin is not impaired by a decrease of proteolytic degradation.

It would therefore seems that the dermal fibroblasts are able of progressive adaptations over time to compensate for the drastic reduction of fibroblasts number in order to limit the loss of dermal substance observed with age.

MATERIAL & METHODS

Tissue harvest and fibroblasts primary culture

Human fibroblasts from the skin of one individual volunteer collected at different ages were extracted as describe else were (15). Normal human skin tissue explants were obtained from the surgical discard of anonymous healthy patients with informed consent in accordance with ethical guidelines and declared to the French research ministry (Declaration no. DC-2008-162 delivered to the Cell and Tissue Bank of Hospices Civils de Lyon).

Fibroblast and Keratinocyte monolayer cultures

Fibroblasts were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), antibiotics (20 mg/mL gentamicin (Panpharma, Fougères, France), 100 IU/mL penicillin (Panpharma), and 1 mg/mL amphotericin B (Panpharma). Keratinocytes were grown on a feeder layer of irradiated human fibroblasts pre-seeded at 4000 cell/cm², as previously described [23,43], in a mixture of 3:1 DMEM and Ham's F12 (Invitrogen, Carlsbad, USA), respectively, supplemented with 10% FCS, 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF; R&D systems, Minneapolis, MN, USA), 0.12 IU/mL insulin (Lilly, Saint-Cloud, France), 0.4 mg/mL hydrocortisone (UpJohn, St Quentin en Yvelines, France), 5 mg/mL triiodo-L-thyronine (Sigma, St Quentin Fallavier, France), 24.3 mg/mL adenine (Sigma), isoproterenol (Isuprel, Hospira France, Meudon, France) and antibiotics as above. For each cell type, the medium was changed every 2 days until confluence was reached. At confluency, cells were re-suspended with trypsin-EDTA 0.05% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) and used for the in vitro 3D model.

Scaffold free skin equivalent (SFSE) preparation and culture

Dermal equivalents (DE) are prepared after amplification of monolayer fibroblasts during 7days. Cells are seeded onto a culture insert (Corning) and cultivated during 21 days in fibroblasts culture medium supplemented with 50 mg/mL L-ascorbic acid and 10 ng/ml of EGF at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Then keratinocytes from young donor were seeded on the top of the DE and cultured during 7 days in immersed condition in keratinocyte culture medium supplemented with 50 mg/mL L-ascorbic acid and 10ng/ml of EGF at 37°C in a 5% CO₂

atmosphere. Finally the samples were raised at air-liquid interface for 7 or 14 days to promote the epidermis differentiation. At day 49 (14 days of differentiation) SE were harvested and fixed in formol and OCT (Sakura) for respectively histology and immunohistology, in RNA Later (Sigma) for qPCR. 9 samples per conditions were harvested and prepared to have n=3 for each fixation.

Histology and immunohistological (IH) analyses

Paraffin-embedded formalin-fixed samples were cut into 5- μ m sections. After dewaxing and rehydration, sections were stained with hematoxylin phloxine and saffron. For immunohistochemistry, after heat-mediated antigen retrieval treatment, tissue sections were incubated in 5% H₂O₂ in PBS to inactivate endogenous peroxidases. Non-specific binding was blocked in PBS containing 4% bovine serum albumin (BSA, Sigma, St Quentin Fallavier, France). Sections were then incubated with the following primary antibodies (Table 1) diluted in PBS/4% BSA overnight at 4°C. After incubation for 1h with a peroxidase-conjugated secondary antibody (EnVision, Dakocytomation, Glostrup, Denmark), the antigen was detected with 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride as the substrate. Tissue sections were subsequently counterstained using Harris hematoxylin (25%, Sigma). For immunofluorescence, labeling was performed on air-dried 5- μ m cryosections. Air-dried cryosections were incubated with monoclonal primary antibodies overnight at 4°C. Then, sections were incubated with secondary Alexa 488 or 568 conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, USA) for 1 h at room temperature. Nuclear counter-staining using Hoechst was carried out according to a routine protocol. Image acquisition was performed using an Eclipse 50i microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France) for light microscopy and a Zeiss LSM 510 confocal laser scanning microscope for fluorescence.

Table of antibodies

Clone	Class	Specificity	Origin	Dilution Used
MIB-1	Mouse IgG1	Ki-67	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:50
15C10	Mouse IgG1	Filaggrin	Novocastra Laboratories	1:25
/	Rabbit IgG	Loricin		
E6H4	Mouse IgG2a	P16INK4A	Ventana Medical systems, USA	
	Rabbit	Type I collagen	Novocastra Laboratories	1:500
8D1-8C7	Mouse IgG1k	Type III collagen	Novocastra Laboratories	1:250
PHM-12	IgG1	Type IV collagen	Novocastra Laboratories	1:50
11C13	Mouse IgG1k	Fibrillin -1	Neo Markers	1:100
/	Rabbit	Elastin	Novocastra Laboratories	1:100
EPR4025	IgG	LOX	Abcam	1:300
		LOXL1		
α SMA-1	Mouse IgG2a	α -SMA	Novocastra Laboratories	1:1000

Image processing

Image processing and analysis were performed using Image J-based Fiji software (16).

The living epidermal thickness, considered as all layers from basal layer to stratum granulosum excepted the stratum corneum, was measured as the distance between the basement membrane to the stratum corneum and expressed in μm . For the dermis thickness, the distance from the bottom of the dermis to the dermo epidermal junction was measured and expressed in μm . Ki67 epidermal positive cells were automatically separated from the background and, counted. Data are expressed in number of positive cells per epidermal field. For nuclear staining (ki67), the number of positive nuclei was counted and normalized by the length of the dermal epidermal thickness. The results, expressed as the surface area of filaggrin and loricrine positively stained-tissue areas were automatically detected and segmented from other pixels and measured. Data were normalized by the area of living epidermis. For analysis of extra cellular matrix of the dermis, fluorescent positive area (Type I, III, IV collagen, fibrilline 1, elastin, α -SMA, LOX and LOXL1) was automatically detected and segmented from other pixels and measured. Data were normalized by the number of fibroblasts nucleus present in the dermis. All measurements were performed 9 times (3 different fields of 3 different SE) per experimental condition.

Zymography

Conditioned media from reconstructed skin or fibroblasts cultures were harvested after 48h. Samples were eluted with non-reducing Laemmli buffer and separated through a 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel containing 0.1% (w/v) gelatin as substrate. Following electrophoresis, the gels were washed in 2.5% (v/v) Triton X-100 for 1h at room temperature; further incubated at 37°C for 24h in 50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, 200 mM NaCl (pH 7.6); stained with Coomassie blue G-250 (0.1% w/v); and destained in ethanol/acetic acid/water (20/10/70; vol/vol/vol). Gelatinolytic activities of latent (95 kDa) MMP-9, latent (72 kDa) and activated (64 kDa) MMP-2 were evidenced as white zones of lysis indicating gelatin degrading activity. A conditioned medium from HT1080 fibrosarcoma cell line was used as control.

Densitometric analysis of the bands corresponding to MMP activities was performed using Image J-based Fiji software (16).

Statistical analysis

For all data, the statistical significance was assessed using Mann Whitney test with the software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), and statistically significant differences are indicated by asterisks as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

RESULTS

Influence of fibroblasts age on skin equivalent structure

Skin equivalent are prepared with fibroblasts from 3 elderly donors (72 years) versus 3 adult donors (22 and 36 years) and epidermised with keratinocytes from two different young donors (3 years and 22 years). At day 49, all skins equivalents present a pluristratified and differentiated epidermis with a balance between basal keratinocyte proliferation and terminal differentiation. The homeostasis of the epidermis is follow and confirms by immunohistochemistry labeling of the proliferation marker Ki-67 in the basal layer and the expression of terminal differentiation markers filaggrin and loricrin in the suprabasal layers. A representative example is presented in Figure 1.

Whatever the donors, we note a significant decrease of the thickness of dermal equivalent (figure 2A) and the dermis of skin equivalent (Figure 2B) prepared with young and old fibroblasts. At day 21 of culture, dermal equivalent prepared with old fibroblasts present a decrease of thickness compared to dermal equivalent prepared with young fibroblasts associated to a decrease in the number of fibroblasts. After 49 days of culture, the thickness of the dermis with old fibroblasts is significantly decrease compared to the thickness of the dermis with young fibroblasts (** $p < 0.001$; $283.008 \pm 64.052 \mu\text{m}$ to $140.383 \pm 53.645 \mu\text{m}$). This is also associated to a decrease in the number of fibroblasts of skin equivalent (** $p < 0.001$; 66 ± 9 to 36 ± 12) despite that fibroblasts were seeded initially at the same density (Figure 2A-B).

Considering the expression of the senescence marker p16INK4a (Figure 2C) in the epidermis of reconstructed skin no difference was observed. In contrast, the dermis of skin equivalent showed a proportion of senescent fibroblasts expressing p16INK4a significantly higher (** $p < 0.001$; 3.83 ± 0.735 versus 11.41 ± 3.04).

In order to limit the impact of interindividual variations in the analysis of dermal evolution during chronological aging, we chose to focus our analysis on the skin equivalent prepared with fibroblasts from the same donor at 36 and 72 years old.

Composition of the dermis according to the age of fibroblasts

The impact of fibroblast age on the expression of the main macromolecules of the dermis was evaluated after immunofluorescence staining. Quantification of the intensity of type I, III and IV collagen, related to the number of dermal fibroblast, showed no significant difference between skin equivalent prepared with old fibroblasts and young fibroblasts (Figure 3). On the other hand, some proteins involved in elastic fibers quantify in relative intensity related to the number of dermal fibroblast increases significantly in skin equivalent prepared with old fibroblasts compared to skin equivalent prepared by young fibroblasts. (Figure 3)

We looked at fibrillin 1 and it's increase of 174.24% in skin equivalent prepared with old fibroblasts (Figure 4; **, 72.52 ± 33.38 UR versus 126.36 ± 29.38 UR); at elastin expression and it's increase of 325.34 % in skin equivalent prepared with old fibroblasts (Figure 4; **, 2.17 ± 1.91 UR versus 7.06 ± 4.80 UR); at LOX expression and it's increase of 173.33% in skin equivalent prepared with old fibroblasts (Figure 4; **, $2\ 869.32 \pm 513.56$ UR versus $4\ 973.27 \pm 1\ 344.63$ UR); LOXL1, known to more specifically cross-link tropoelastin, is also increase of 362.45% (Figure 4; ***, 250.83 ± 84.60 UR versus 909.15 ± 248.11 UR). All this component of elastin fibers are significantly increased in skin equivalent prepared with old fibroblasts.

In fact, the percentage of myofibroblasts expressing α -SMA (Figure 4) is increased very significantly in the skin equivalent prepared with old fibroblasts compared to skin equivalent prepared with young fibroblasts (***, $66,594 \pm 12,510\%$ versus $6,047 \pm 3,023\%$).

Analysis of Elastic Tissue Degradation according to Age

Because elastic tissue is constantly remodeling by metalloproteinases, we explore their expression and activity by ELISA method in the culture media of the skin equivalent. The results show no significant difference in MMP1 expression with age (***, 22.4 ± 1.7 ng/ml versus 61.6 ± 1.2 ng/ml). At the opposite, MMP2 is significantly decreased in skin equivalent prepared with old fibroblasts compared to those with young fibroblasts (***, 13.147 ± 0.280 ng/ml versus 162.293 ± 4.713 ng/ml) (Figure XX). We also explore the inhibitors of metalloproteinases TIMP1 and TIMP2, and they are significantly decreased in skin equivalent prepared with old fibroblasts compared to those with young fibroblasts (***, 12.815 ± 0.095 ng/ml versus 8.285 ± 0.167 ng/ml for TIMP1 and ***, 19.697 ± 0.334 ng/ml versus 3.464 ± 0.085 ng/ml for TIMP2).

In order to confirm that our increase of elastic tissue is directly linked to a decrease of elastolytic metalloproteinases, we looked at their activity by zymography. Conditioned media from 42-day and 48-day skin equivalents were subjected to zymography analysis (Figure 5). The enzymes migrated with apparent molecular weights of 92 kDa, 72 kDa, and 64 kDa, characteristic of the latent MMP-9 (proMMP-9), the latent MMP-2 (proMMP-2), and the active MMP-2 isoforms, respectively. Gelatinolytic activity of each isoform was measured by densitometric analysis of the bands (Figure 5). Latent forms of MMP-9 were decreased by 50% and 30% in reconstructed skins using the aged ASF4-6L2 cells after respectively 42 or 48 days of culture when compared to the younger ASF4-1 cells. The latent form of MMP-2 was decreased by two-thirds in 42-day culture and by 50% in 48-day culture, while the active form remained at similar low levels in all conditions. Considering that ASF4-6L2 cells demonstrated a lower cell density (by approximately two folds) than ASF4-1 cells in the dermal part of reconstructed skins, we assessed the gelatinolytic activities of these two cells cultured as monolayers (Figure 5). In these conditions, only the latent form of MMP-2 was detected in conditioned media of the two cell strains. The densitometric analysis indicated a 25% decrease in 4-6L2 cells (Figure 5). Altogether, these results demonstrated a decrease of the global gelatinolytic activity in skin equivalent prepared with aged cells ASF4-6L2 compared to skin equivalent prepared with young cells ASF4-1. The decrease of proMMP-2 secretion level by the aged fibroblasts was accompanied by an indirect effect of these cells on the proMMP-9 secretion by keratinocytes.

Discussion

Compared to *in vivo* human skin, aging induces in our skin equivalent a decrease in dermal thickness with the age of fibroblasts. Our results show that this decrease is related to a loss of the number of fibroblasts in the dermis. If the expression of collagen I, III and IV in the dermis does not vary significantly with age of fibroblasts, the expression of fibrillin 1 and elastin appears unexpectedly increased and accompanied with a decrease in elastolysis shown by decreased MMP-9 concentration by ELISA and proteolytic activity by gel zymography.

With the fibroblasts from a unique donor provide, we were able to really approach the effect of chronological aging without interindividual variations between the adult stage at 36-year-old and the senior stage at 72-year-old. Indeed, before 25 years old, elastogenesis is still active and elastic tissue is not completely mature. During life time, the elastic tissue is not renews ((3–5). In our culture condition, since the reconstruction of the dermis alone, we have demonstrated a drastic decrease in the thickness of the dermal equivalent prepared with old fibroblasts compared to those with young fibroblasts (***, 140 μ m versus 340 μ m) associated with a decrease in the number of fibroblasts present in the dermis (***, 30.6 \pm 3.6 versus 10.11 \pm 1.2). At the skin equivalent homeostasis (49 days of culture), this difference in thickness of the dermis persists (***, 283.008 \pm 64.052 μ m at 140.383 \pm 53.645 μ m). Similarly, it is observed that the number of fibroblasts is reduced (***, 66 \pm 9 to 36 \pm 12) in the skin equivalent prepared with old fibroblasts compared to those with young fibroblasts. These results correspond to a loss of proliferation of fibroblasts during aging observed in normal human skin and in monolayer fibroblasts (17,18).

Our fibroblasts from a single donor collected at different ages have a cumulative population doubling decreased with age (fibroblasts 36 years PDL = 66.5, fibroblasts 72 years PDL =?) and thus a decreased of proliferation capacities (15).

Considering this difference in thickness and cell density in the dermis, the illustration of the expression levels of the different protein by fluorescence intensity relative to the number of fibroblastic nuclei is more appropriate than an illustration by percentage of surface area (19–21); or by qualitative description (14,22). In the dermis, type I, III and IV collagen appear less important in quantity in the skin equivalent prepared with old fibroblasts because the dermis is thinner. But when values are reported to the number of fibroblasts, no significant difference appears (Coll 1: ns, 45023.30 \pm 7334.39 UR versus 52883.93 \pm 10672.31 UR; Coll 3: ns, 46672 \pm 7680.36 UR versus 39718.92 \pm 7055.73 UR; Coll 4: ns, 15082.08 \pm 2862.48 UR versus 11833.21 \pm 2016.74 UR).

On the other hand, we observed an increase in the expression of elastin (**, 7.06 \pm 4.80 UR versus 2.17 \pm 1.91 UR) and fibrillin 1 (**; 126.36 \pm 29.38 UR versus 72.52 \pm 33.38 UR), LOX (),

LOXL1 (), α SMA () in the skin equivalent prepared with old fibroblasts compared to those with young fibroblasts.

To complete the histological analyzes, quantification of the level of expression of the genes encoding elastic fiber proteins in the skin by RT-qPCR is commonly used (22–24). However, molecular biology techniques show only the level of transcription of these different genes, and not the level of elastic fiber maturity, which depends in particular on the degree of crosslinking of tropoelastin. Indeed, several previous studies (13,23,25) report a lack of significant difference in the level of expression of genes related to elastic fibers during aging.

How to explain the increase of elastin and fibrillin-1 in the MEC secreted by our old fibroblast observed in our culture conditions?

Firstly, by the increase of the proportion of myofibroblasts in skin equivalent prepared with old fibroblasts around 10 times compared to those with young fibroblasts (***, $66,594 \pm 12,510\%$ versus $6,047 \pm 3,023\%$). It is commonly admitted that myofibroblasts synthesize more extra cellular matrix than fibroblasts. Our results do not show variations in the collagens expression in skin equivalent prepared with old fibroblasts (26), but variations in elastic tissue proteins.

Considering the decrease in the gene expression of the matrix metalloproteinases observed by the transcriptomic analysis, we evaluate the expression, the quantity and the activity of some actors of matrix remodeling. In particular, MMP2-9 and -14 are secreted by fibroblasts with significant elastase activity (27). Their decrease therefore correlates favorably with the accumulation of elastin and associated proteins in the dermis of our model. Conversely, we have observed that the amount of MMP1 increases with the age of fibroblasts while TIMP1 and to a much lesser extent TIMP2, decrease, explaining that the expression of collagens do not changes between skin equivalent prepared with old and young fibroblasts, despite the greatest proportion of myofibroblasts with age.

It would therefore seem that all these adaptations of the dermal fibroblasts come from a retro control appearing gradually in response to the decrease of the number of fibroblasts to limit the loss of substance in old dermis.

This study model, using the cells of the same donor at different ages, allows observation of a part of the aging process, from adulthood to senior age. This approach is also robust and

validated by the advantages of this model as i) the absence from senescence induced by the prolonged culture; ii) the absence of interindividual variability; and finally iii) the absence of damage due to UV exposure because the fibroblasts come from a healthy Japanese donor protected from UV exposure.

DRAFT

LEGENDES

*Figure 1: influence of fibroblasts' age on dermis reconstruction and senescence. (A) Histology after HPS staining of dermal equivalent after 21 days of culture, counting of the nuclei and quantification of dermal equivalent thickness. (B) Histology of skin equivalent after HPS staining, counting of dermal nuclei and quantification of dermal thickness. (C) Senescence of skin equivalent followed by expression of p16INK4a and quantification in the epidermis and dermis. Results are mean \pm SEM of at least 5 different fields of 3 independent samples. Representative photographs are shown. Scale bar=100 μ m. *** p <0.001.*

*Figure 2: Influence of fibroblasts' age on epidermis homeostasis. (A) Histology after HPS staining of skin equivalent prepared with adult and old fibroblasts from 3 different donors and measurement of epidermal thickness expressed in μ m as a distance between the JDE and the stratum corneum. (B) Immunohistochemical staining of Ki67, filaggrin and loricin to assess balance between epidermal differentiation and proliferation. Quantification of the number of keratinocytes expressing Ki67 and the percentage of area of the living epidermis expressing filaggrin and loricin. Results are mean \pm SEM of at least 5 different fields of 3 independent samples. Representative photographs are shown. Scale bar=100 μ m. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.*

Figure 3: Characterization of collagens in the dermis. Immunofluorescence staining of type I, III and IV collagens and quantification of collagen relative to the number of dermal fibroblasts stained with Hoechst. Results are mean \pm SEM of at least 5 different fields of 3 independent samples. Representative photographs are shown. Scale bar=50 μ m (middle and top panel) 100 μ m (bottom panel).

Figure 4: Characterization of the elastic tissue of the dermis. Immunofluorescence staining of elastin, fibrillin, LOX and LOXL1 and quantification of the amount of dermal fibroblast count after counting Hoechst stained nuclei. Immunofluorescence staining of myofibroblasts expressing α SMA in the dermis and quantification express as the percentage of myofibroblasts to the global population of dermal fibroblasts. Results are mean \pm SEM of at least 5 different

fields of 3 independent samples. Representative photographs are shown. Scale bar=50 μ m (top panel) 100 μ m (bottom panel). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 5: Evaluation of the degradation of the ECM. Analysis of the amount of MMP1 and MMP2 as well as TIMP1 and TIMP2 in the culture media of the skin equivalent expressed in ng/ml by ELISA assay. Visualization of proteolytic activity of MMPs and especially elastinolytic activity by gel zymography.

Figure 6: Zymographic analysis of MMPs. A) Zymographic analysis of conditioned media from 42-days and 48-days reconstructed skins with the young 4-1 and the aged 4-6L2 fibroblast strains. B) Densitometric analysis of reconstructed skin zymography. C) Zymographic analysis of conditioned media from 4-1 and 4-6L2 cell strain cultures grown as monolayers. D) Densitometric analysis of monolayer culture zymography. Control (CTRL) corresponds to HT1080 cell line conditioned medium.

DRAFT

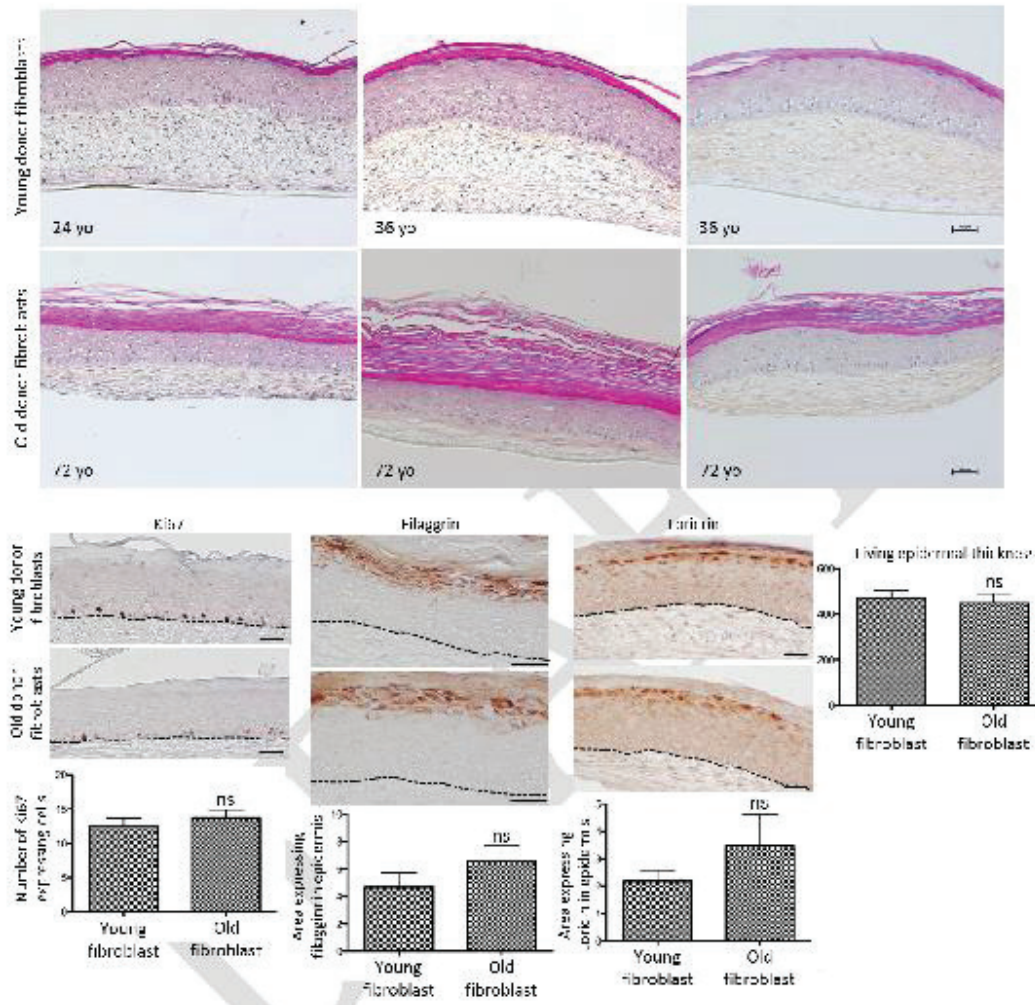
References

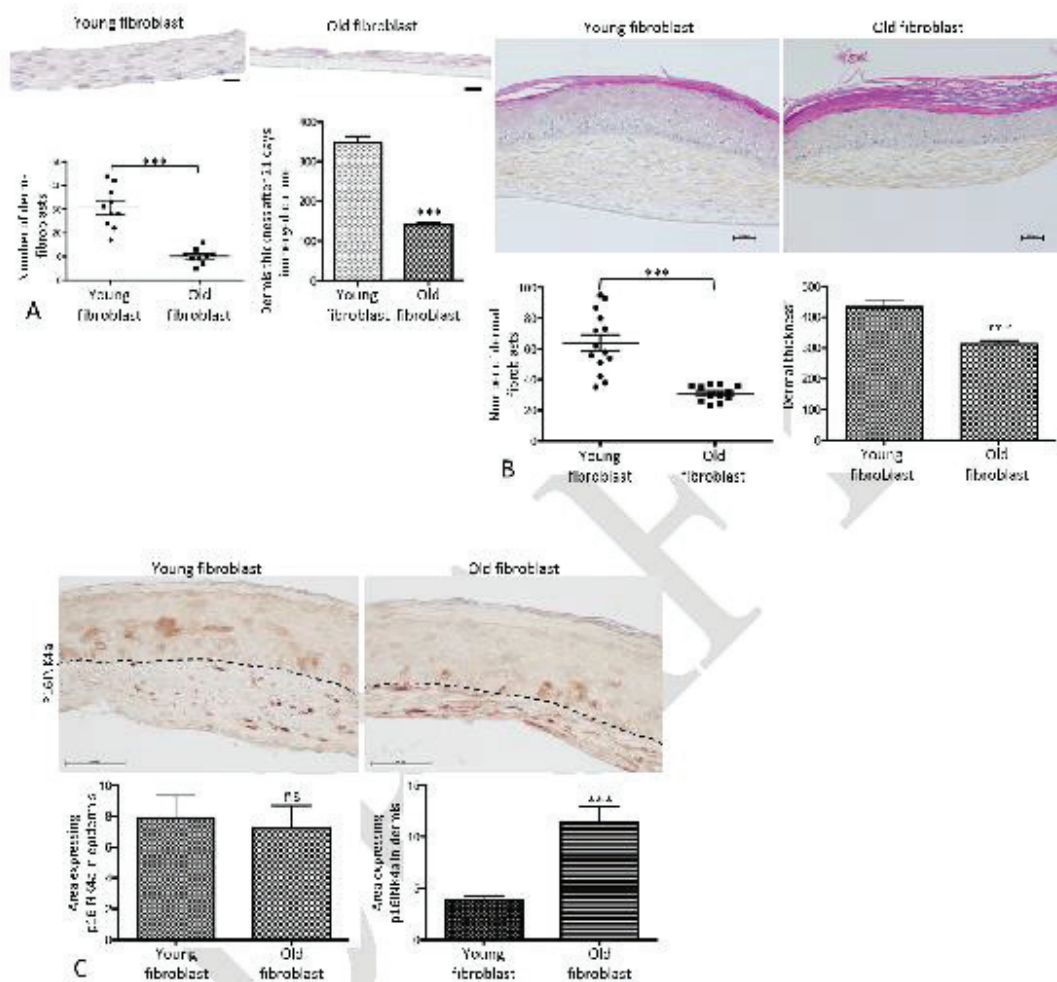
1. Naylor EC, Watson REB, Sherratt MJ. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*. 2011 Jul;69(3):249–56.
2. El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, et al. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol*. 2002;11(5):398–405.
3. Wagenseil JE, Mecham RP. New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*. 2007 Dec 1;81(4):229–40.
4. Frances C, Robert L. Elastin and elastic fibers in normal and pathologic skin. *Int J Dermatol*. 1984;23(3):166–179.
5. Sherratt MJ. Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *Age*. 2009 Dec;31(4):305–25.
6. Werb Z, Banda MJ, McKerrow JH, Sandhaus RA. Elastases and elastin degradation. *J Invest Dermatol*. 1982 Jul;79 Suppl 1:154s-159s.
7. Pasquali-Ronchetti I, Baccarani-Contri M. Elastic fiber during development and aging. *Microsc Res Tech*. 1997;38(4):428–435.
8. Duca L, Floquet N, Alix AJP, Haye B, Debelle L. Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004 Mar;49(3):235–44.
9. Black AF, Bouez C, Perrier E, Schlotmann K, Chapuis F, Damour O. Optimization and Characterization of an Engineered Human Skin Equivalent. *Tissue Eng*. 2005 May 1;11(5–6):723–33.
10. Cenizo V, André V, Reymermier C, Sommer P, Damour O, Perrier E. LOXL as a target to increase the elastin content in adult skin: a dill extract induces the LOXL gene expression. *Exp Dermatol*. 2006 Aug 1;15(8):574–81.
11. Duplan-Perrat F, Damour O, Montrocher C, Peyrol S, Grenier G, Jacob MP, et al. Keratinocytes influence the maturation and organization of the elastin network in a skin equivalent. *J Invest Dermatol*. 2000 Feb;114(2):365–70.
12. Noblesse E, Cenizo V, Bouez C, Borel A, Gleyzal C, Peyrol S, et al. Lysyl oxidase-like and lysyl oxidase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers. *J Invest Dermatol*. 2004;122(3):621–630.
13. Lacroix S, Bouez C, Vidal S, Cenizo V, Reymermier C, Justin V, et al. Supplementation with a complex of active nutrients improved dermal and epidermal characteristics in skin equivalents generated from fibroblasts from young or aged donors. *Biogerontology*. 2007 Mar 19;8(2):97–109.

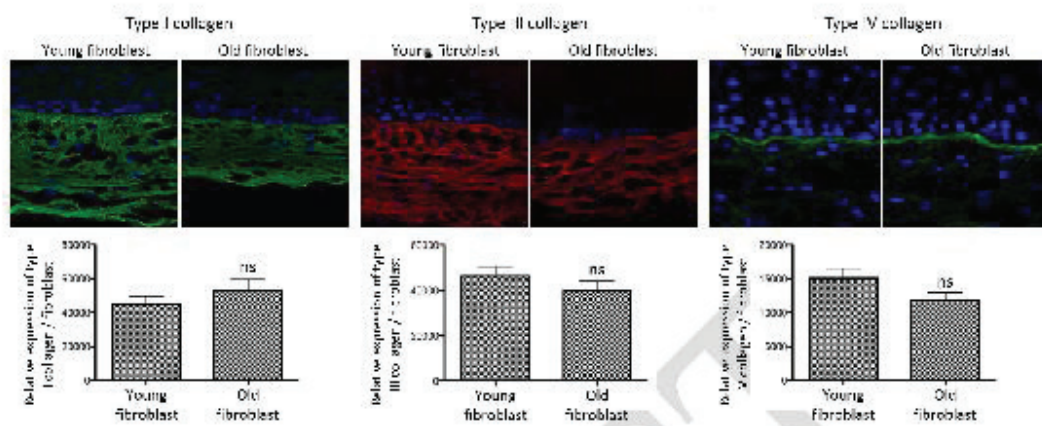
14. Vicanova J, Bouez C, Lacroix S, Lindmark L, Damour O. Epidermal and Dermal Characteristics in Skin Equivalent after Systemic and Topical Application of Skin Care Ingredients. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 May 1;1067(1):337–42.
15. Kaji K, Ohta T, Horie N, Naru E, Hasegawa M, Kanda N. Donor age reflects the replicative lifespan of human fibroblasts in culture. *Hum Cell.* 2009 May;22(2):38–42.
16. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012 Jun 28;9(7):676–82.
17. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961 Dec;25:585–621.
18. Uitto J. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *J Drugs Dermatol JDD.* 2008 Feb;7(2 Suppl):s12-16.
19. Langton A k., Sherratt M j., Sellers W i., Griffiths C e. m., Watson R e. b. Geographical ancestry is a key determinant of epidermal morphology and dermal composition. *Br J Dermatol.* 2014 Aug 1;171(2):274–82.
20. Robert C, Lesty C, Robert AM. Ageing of the skin: study of elastic fiber network modifications by computerized image analysis. *Gerontology.* 1988;34(5–6):291–6.
21. Suwabe H, Serizawa A, Kajiwara H, Ohkido M, Tsutsumi Y. Degenerative processes of elastic fibers in sun-protected and sun-exposed skin: Immunoelectron microscopic observation of elastin, fibrillin-1, amyloid P component, lysozyme and α 1-antitrypsin. *Pathol Int.* 1999 May 1;49(5):391–402.
22. Fantasia J, Lin CB, Wiwi C, Kaur S, Hu YP, Zhang J, et al. Differential levels of elastin fibers and TGF- β signaling in the skin of Caucasians and African Americans. *J Dermatol Sci.* 2013 Jun;70(3):159–65.
23. Bernstein EF, Chen YQ, Tamai K, Shepley KJ, Resnik KS, Zhang H, et al. Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J Invest Dermatol.* 1994 Aug;103(2):182–6.
24. Mewes KR, Raus M, Bernd A, Zöller NN, Sättler A, Graf R. Elastin Expression in a Newly Developed Full-Thickness Skin Equivalent. *Skin Pharmacol Physiol.* 2007;20(2):85–95.
25. Hirano E, Okamoto K, Matsubara Y, Takehana M, Kobayashi S, Tajima S. Elastin expression in cultured human keratinocytes: exon 26A of elastin primary transcript is always included in terminally differentiated keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 2001;293(8):430–433.
26. Vedrenne N, Coulomb B, Danigo A, Bonté F, Desmouliere A. The complex dialogue between (myo) fibroblasts and the extracellular matrix during skin repair processes and ageing. *Pathol Biol.* 2012;60(1):20–27.

27. Van Doren SR. Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biol.* 2015 May 1;44–46:224–31.

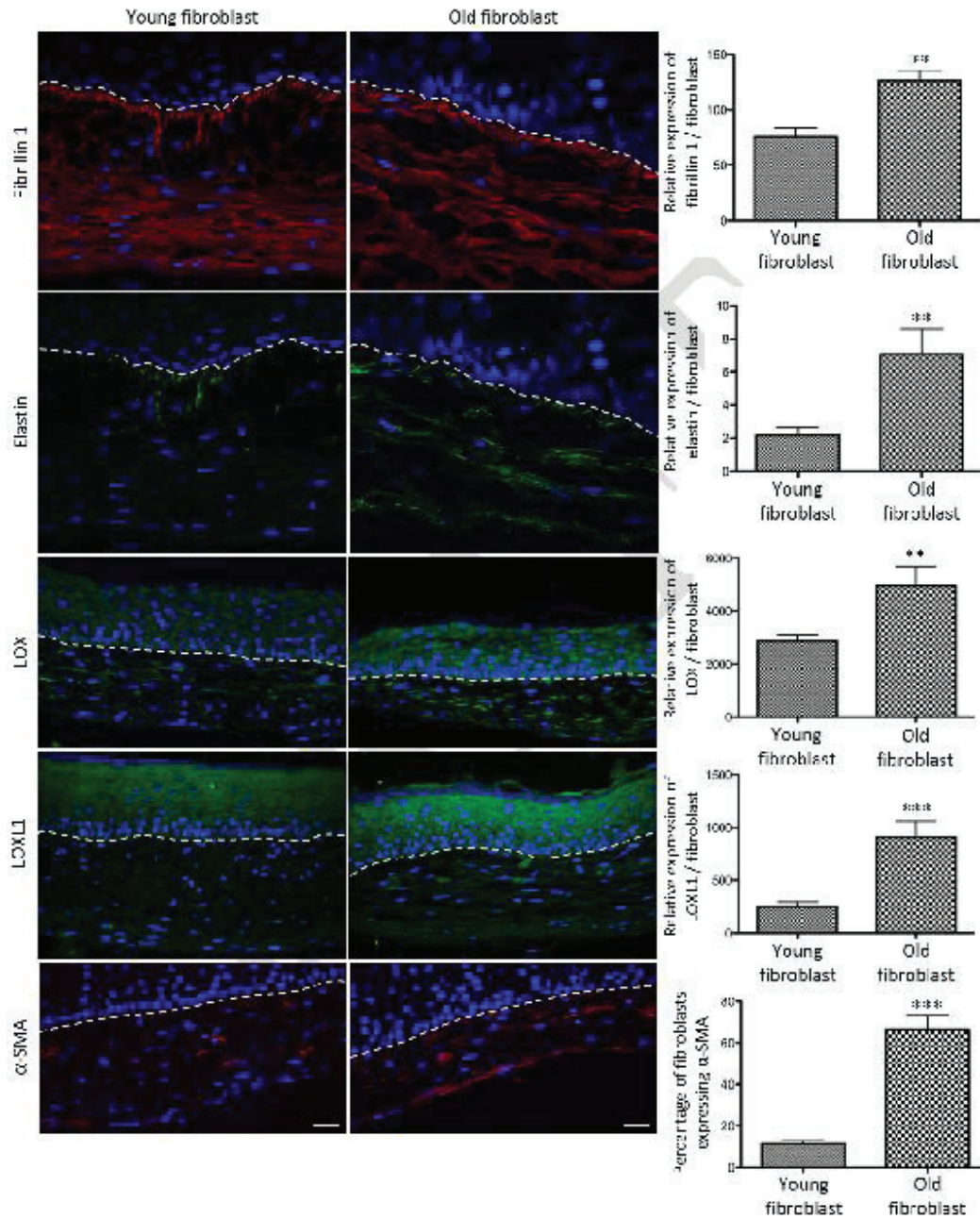
DRAFT

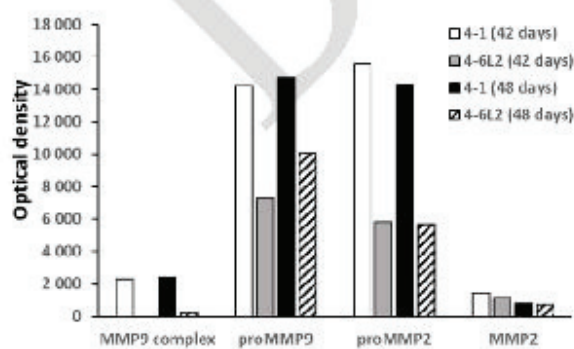
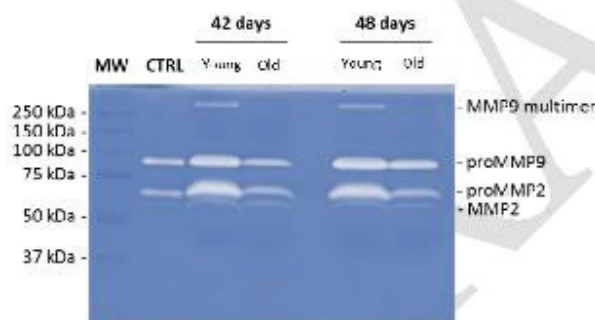
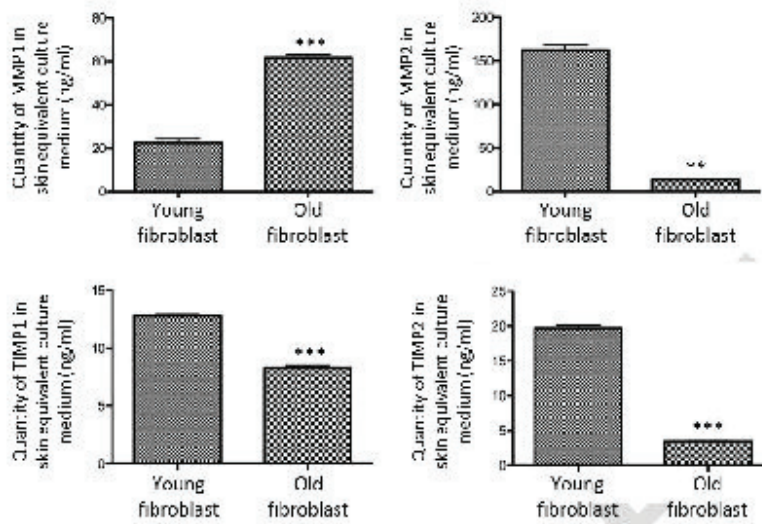






DRAFT





DISCUSSION

Nos résultats montrent que nous avons satisfait aux différents objectifs que nous nous étions fixés à savoir que les modèles de peau reconstruite (PR) *in vitro* étaient de bons outils pour étudier les différents mécanismes du vieillissement. Ainsi, au cours d'un travail collaboratif, nous avons démontré que le microARN miR-30a intervenait comme régulateur de la différenciation épidermique durant le vieillissement (Muther *et al.*, 2017) en utilisant des PR préparées à partir de cellules jeunes et en suivant leur évolution au cours d'une cinétique longue. Avec le même modèle de PR sénescents, nous avons démontré que le sélénium avait une action « anti vieillissement », mais pas par une action antioxydante, hypothèse de départ, mais par une meilleure adhésion des kératinocytes souches de l'épiderme au derme via les intégrines $\beta 1$ et $\alpha 6$ (Jobeili *et al.*, 2017). Enfin, grâce à la mise à disposition de fibroblastes provenant d'un donneur unique extraits à partir de biopsies de peau prélevées à différents âges de sa vie, 36 et 72 ans, nous avons comparé des PR jeunes et âgées pour investiguer la structure du derme, et particulièrement le tissu élastique, en nous affranchissant des variations interindividuelles.

Depuis 1989, notre laboratoire développe des modèles de peau reconstruite (Shahabeddin *et al.*, 1990) qui sont allés jusqu'à la création d'un modèle mimant le vieillissement (Dos Santos *et al.*, 2015). Nous avons utilisé ici, les modèles i) avec et sans support, ii) avec des cellules jeunes en suivant l'évolution de différents paramètres au cours d'une cinétique longue et iii) enfin un modèle comparatif de peaux préparées avec des cellules de donneurs jeunes ou âgés. Des épidermes reconstruits ont aussi été développés par Charlotte Muther et sont complémentaires des peaux reconstruites. Même s'ils s'affranchissent des interactions derme-épiderme, ils nous ont permis de compléter les recherches sur le rôle des microARNs de l'épiderme au cours du vieillissement.

Les microARNs sont de petits ARNs non codants connus pour jouer un rôle clé dans la régulation de nombreux processus biologiques, dont l'homéostasie de l'épiderme. Dans un premier temps, l'équipe du Professeur Jérôme Lamartine suite à un criblage d'expression des microARNs dans des kératinocytes monocouche issus de tissus jeunes versus âgés, a démontré une modulation (sur-expression ou sous-expression) des microARNs miR30c-2-3p, miR30c-5p, miR365a-5p, miR4443 ainsi que miR-30a-3p et -5p dans les kératinocytes issus de peau âgée.

Pour confirmer ces résultats, une étude approfondie du miR-30a a été réalisée avec différents modèles d'épiderme 3-D et de PR. Parmi ces microARNs, nous avons choisi d'étudier plus précisément le miR-30a en raison de son implication dans de nombreux processus biologiques. Si en cancérologie, il possède des rôles différents selon le type de cancer: oncogène ou onco-suppresseur (Yang *et al.*, 2017); en physiologie, il joue un rôle dans l'induction de la différenciation ostéogénique et chondrogénique (Tian *et al.*, 2016), dans le développement neuronal (Mellios *et al.*, 2008) et la transition épithélio-mésenchymateuse, entre autres (Peng *et al.*, 2015). De plus, l'induction de l'expression de miR-30a dans les fibroblastes humains néonataux réprime l'expression de B-Myb, conduisant à l'entrée en sénescence des cellules par la voie de signalisation de p53 (Martinez *et al.*, 2011).

C'est devant la variabilité interindividuelle des échantillons cellulaires, et parce que les kératinocytes provenaient de donneurs de sexes différents (hommes pour les jeunes et femmes pour les donneurs âgés) que la collaboration avec l'équipe du professeur Jérôme Lamartine a été initiée. Nous avons préparé des PR à partir de cellules jeunes selon modèle de vieillissement afin de valider les marqueurs microARN. Les échantillons ont été récoltés 6 fois entre J35 et J100, ce dernier temps étant celui où la sénescence suivie par l'analyse histologique est maximale. Les signes de sénescence observables dans ce modèle sont la diminution de l'épaisseur de l'épiderme lié à une diminution des cellules prolifératives ainsi qu'à une augmentation du nombre de cellules exprimant p16INK4a, marqueur de sénescence ; accompagnée d'une diminution des marqueurs de différenciation terminale tels que l'involucrine et la loricine (Dos Santos *et al.*, 2015). Nos résultats montrent qu'à J100 l'expression du miR-30a apparaît significativement augmentée d'environ 2.5 à 3 fois par rapport à J35.

L'influence de miR-30a sur le vieillissement a été confirmée dans des épidermes 3-D préparés avec des kératinocytes sur-exprimant ce microRNA de façon stable via un gène rapporteur inducible, montrant une diminution d'expression de la cytokératine 1, la loricine et l'involucrine. Cette altération de la différenciation s'accompagne de graves défauts de la fonction barrière et de l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques (visibles après un test TUNEL mettant en évidence la fragmentation de l'ADN). Ces travaux montrent pour la

première fois que la surexpression du miR-30a impacte la différenciation épidermique et induit une apoptose des kératinocytes. Pour approfondir le mécanisme d'action de ce miR-30a, ses gènes cibles ont été recherchés. Les microARNs sont connus pour être des régulateurs de l'expression génique de par leur séquence courte, qui peut être retrouvée dans la région 3'-UTR des gènes. En s'appariant à l'ARNm de son gène cible le microARN empêche sa traduction et entraîne sa dégradation. Par l'alignement de la séquence du miR-30a, elle a été retrouvée sur plusieurs gènes cibles de l'épiderme tels que les gènes de LOX (codant pour la lysyl oxydase, régulateur de la balance prolifération/différenciation des kératinocytes), IDH1 (codant pour l'isocitrate déshydrogénase, enzyme du métabolisme cellulaire) et AVEN (codant pour un inhibiteur de caspase), leurs expressions dans les épidermes reconstruits ont été recherchées.

Le gène LOX code pour la lysyl oxydase, enzyme extracellulaire impliquée dans la maturation du tissu conjonctif (Noblesse *et al.*, 2004) aussi exprimée dans les kératinocytes humains où elle régule la différenciation de l'épiderme. En effet, il a été démontré que l'inhibition des LOX altère fortement la différenciation terminale dans un modèle d'épiderme reconstruit (Le Provost *et al.*, 2010), perturbation similaire à celle observée lors de la surexpression du miR-30a. On peut donc supposer que l'effet délétère de miR-30a sur la différenciation épidermique pourrait être lié en partie à l'inhibition des LOX.

Concernant le gène AVEN, codant pour un inhibiteur de caspase, il joue un rôle anti-apoptotique en interagissant avec Bcl-XL et Apaf-1. Dans une peau humaine native, le vieillissement s'accompagne d'une diminution de l'expression de AVEN dans l'épiderme (Muther *et al.*, 2017). Dans le modèle d'épiderme reconstruit à partir de kératinocytes jeunes sur-exprimant le miR-30a, une diminution de l'expression de AVEN a été montrée, et s'accompagne de la présence de très nombreuses cellules apoptotiques. Ces résultats suggèrent que la répression de AVEN par miR-30a est directement impliquée dans l'entrée en apoptose des kératinocytes. Dans les peaux reconstruites sénescents, on observe une augmentation de l'expression de miR-30a mais aussi une augmentation du nombre de kératinocytes sénescents, suivie de l'expression de p16INK4a (Ressler *et al.*, 2006; Waaijer *et al.*, 2012).

Enfin, le gène IDH1 codant pour une enzyme impliquée dans le métabolisme cellulaire a un rôle moins évident. IDH1 semble jouer un rôle dans la protection contre le stress oxydatif des

cellules en maintenant le potentiel d'oxydo-réduction (Lee *et al.*, 2002). Les résultats de l'équipe du Professeur Jérôme Lamartine montrent aussi que IDH1 est très fortement réprimé non seulement au niveau de l'épiderme d'une peau native de donneur âgé mais aussi dans les kératinocytes en monocouche d'individus âgés (Muther *et al.*, 2017). De plus, la surexpression du miR-30a dans les épidermes reconstruits induit une répression de IDH1. La répression de IDH1 dans l'épiderme « âgé » pourrait donc contribuer à plusieurs défauts observés dans les tissus vieillissants, notamment des défauts de différenciation et une sensibilité accrue au stress oxydatif.

Ces travaux ont permis d'aboutir à l'identification du miR-30a qui apparait impliqué dans le vieillissement cutané puisque les épidermes reconstruits sur-exprimant miR-30a présentent d'une part une perturbation de la différenciation terminale de l'épiderme (absence d'expression de la loricine et de l'involucrine) accompagnée de la perte de la fonction barrière et d'autre part une augmentation de la proportion de cellules apoptotiques. Le miR-30a se présente comme une cible pour le développement de nouvelles stratégies anti-âge focalisées sur l'épiderme.

Pour investiguer le vieillissement de la partie dermique, le modèle sur support poreux n'a pu être utilisé pour préparer les peaux reconstruites avec les fibroblastes adultes et âgés provenant d'un même donneur. En effet, les fibroblastes jeunes ne produisaient pas suffisamment de matrice extra cellulaire (MEC) pour combler les pores du substrat dermique. Conséquemment, les kératinocytes tombaient dans les pores et s'y développaient plutôt qu'en surface. Les fibroblastes du même donneur (Kaji *et al.*, 2009), fournis par KOSE, société Japonaise, ont toujours été utilisés en passage précoce (PDL autour de 14-18) pour limiter la sénescence induite par la culture, ce qui peut expliquer que les fibroblastes jeunes encore très prolifératifs ne synthétisent pas suffisamment de MEC dans ces conditions de culture. C'est pourquoi, nous avons utilisé le modèle sans support, nommé auto-assemblé, dans lequel les fibroblastes sont maintenus en feuillet grâce à la MEC néosynthétisée, ce qui évite la formation d'espaces vides ou lacunaires dans la structure (Bell *et al.*, 1983; L'Heureux *et al.*, 1999). Certes, le modèle de feuillet est plus fin et fragile que le substrat dermique usuel et donc plus difficile à manipuler mais il s'est imposé comme le seul modèle utilisable pour cette étude comparative. En ce qui

concerne les âges testés, nous avons pu approcher réellement l'effet du vieillissement chronologique puisque les fibroblastes ont été prélevés entre 36 ans (adulte jeune) et 72ans (adulte âgé). En effet, avant la maturité, l'élastogénèse est encore active et après 25 ans environ le tissu élastique mature ne se renouvelle que très peu (Frances and Robert, 1984; Sherratt, 2009; Wagenseil and Mecham, 2007). Dans ces conditions, nous avons démontré une diminution drastique de l'épaisseur du derme avec l'âge des fibroblastes, et ce dès la reconstruction du derme seul (***, 140µm pour les PR « âgées » versus 340µm pour les PR « jeunes »). Après ensemencement des kératinocytes, cette différence d'épaisseur du derme persiste (***, 280µm versus 480µm). De même on observe que le nombre de fibroblastes est très diminué dans les PR « âgées » par rapport aux PR « jeunes » (2 à 3 fois moins de fibroblastes âgés). Ces résultats correspondent à une perte de la prolifération des fibroblastes lors du vieillissement, également observée lors de la sénescence *in vitro* (Uitto, 2008) et déjà publiée avec les fibroblastes de notre donneur (doublement de population cumulé diminué quand l'âge augmente (Kaji *et al.*, 2009)).

Etant donné la différence d'épaisseur et de densité cellulaire dans le derme, l'illustration des niveaux d'expression des différents marqueurs protéiques par intensité de fluorescence par fibroblaste (après comptage des noyaux) nous a semblé plus appropriée qu'une illustration par pourcentage de surface (Langton *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 1988; Suwabe *et al.*, 1999) ou que par une description qualitative (Fantasia *et al.*, 2013; Vicanova *et al.*, 2006). Dans le derme, le collagène de type I (ns, 11 200 UR versus 14 400 UR) comme de type III (***, 5 770 versus 10 175 UR) apparaissent en valeur absolue moins importants dans les PR « âgées » car le derme est plus fin. Mais lorsque que l'on se rapporte au nombre de fibroblastes, aucune différence n'apparaît. Par contre, et contrairement à nos attentes, nous avons observé une augmentation de l'expression de l'élastine et de la fibrilline 1 dans les peaux « âgées » par rapport aux peaux « jeunes » (élastine : ***, 6 versus 1 unités/fibroblaste ; Fibrilline : * ; 230 versus 100 unités/fibroblaste).

Pour compléter les analyses histologiques, la quantification du niveau d'expression des gènes codant pour les protéines des fibres élastiques dans la peau par RT qPCR est souvent utilisée (Bernstein *et al.*, 1994; Fantasia *et al.*, 2013; Mewes *et al.*, 2007). Cependant, les techniques de

biologie moléculaire montrent seulement le niveau de transcription de ces différents gènes, et non le niveau de maturité des fibres élastiques, qui dépend notamment du degré de réticulation de la tropoélastine. En effet, plusieurs études antérieures (Bernstein et al., 1994; Hirano et al., 2001; Lacroix et al., 2007) relatent une absence de différence significative du niveau d'expression des gènes liés aux fibres élastiques au cours du vieillissement. Ces résultats contradictoires avec nos observations peuvent être liés aux limitations de cette méthode d'analyse et à son absence de corrélation avec la résultante observable au niveau protéique pour ce type de complexes macromoléculaires qui s'établissent progressivement dans le temps et l'espace. D'autres techniques d'analyses protéiques telles que le western blot sont également très difficiles à mettre en place pour les fibres élastiques dans la mesure où ces structures protéiques polymérisées, de grandes tailles, sont d'une part insolubles et nécessitent des méthodes d'extraction spécifique, généralement en présence d'urée. Les éléments ainsi re-solubilisés restent néanmoins difficilement quantifiables. La méthode de choix pour la quantification de l'élastine reste le dosage radio-immunologique des desmosines. Bien que fiable, cette technique est toutefois très lourde à mettre en place en raison de l'utilisation d'éléments radioactifs, et nécessite une grande quantité de matériel (Starcher and Mecham, 1981). D'autres techniques basées sur la microscopie bi-photonique sont en plein essor et devraient permettre dans un futur proche de quantifier les éléments matriciels du derme de façon non-invasive (Shirshin et al., 2017).

Comment expliquer cette augmentation de dépôt d'élastine et de fibrilline dans la MEC sécrétée par un fibroblaste « âgé » ? D'une part, dans nos conditions de culture, la proportion de myofibroblastes dans les PR « âgées » est plus importante que dans les PR « jeunes » (***, 50% versus 20%) et il est admis que les myofibroblastes synthétisent plus de MEC que les fibroblastes (Vedrenne et al., 2012). D'autre part, nos résultats montrent une diminution sélective de la MMP2 libérée par les fibroblastes « âgés » dans les milieux de culture des PR « âgées » ; or, la MMP2 est dotée d'une activité élastinolytique non négligeable (Van Doren, 2015). Sa diminution corrèlerait donc favorablement avec l'accumulation d'élastine dans le derme. A l'inverse, la quantité de MMP1 augmente avec l'âge des fibroblastes alors que le TIMP1 et dans une bien moindre mesure le TIMP2, diminuent, expliquant que l'expression des

collagènes ne change peu entre les PR « âgées » et « jeunes », malgré une proportion plus importante de myofibroblastes avec l'âge. A ce stade nous pouvons dresser l'hypothèse que toutes ces adaptations/modifications des fibroblastes dermiques viennent d'un rétrocontrôle s'instaurant progressivement pour pallier la diminution du nombre de cellules afin de limiter la perte de substance des dermes âgés.

Brièvement, concernant l'épiderme, les résultats histologiques confirment l'influence des fibroblastes sur la reconstruction de l'épiderme. En effet, les épidermes des PR « âgées » sont moins épais que les épidermes des PR « jeunes » (**, 200µm versus 300µm) avec un nombre de kératinocytes basaux prolifératifs exprimant Ki67 significativement diminué (***, 0.5 versus 1 UR). Enfin, la différenciation épidermique est aussi plus précoce avec une expression plus importante de la filaggrine dans les PR « âgées » (***, 5.5 versus 0.5% de surface marquée).

Ce choix de modèle d'étude, utilisant les cellules d'un même donneur à différents âges, permet l'observation d'une partie du processus de vieillissement, de l'âge adulte au vieillissement avancé. Cette approche est d'ailleurs validée par les avantages du modèle utilisé ici à savoir i) l'affranchissement de la sénescence induite par la culture prolongée ii) les variabilités interindividuelles, ainsi que iii) le photovieillissement. En effet, pour ce dernier point, les cellules proviennent d'un donneur japonais en bonne santé qui s'est protégé du soleil tout au long de sa vie. Dans le temps qui nous a été imparti, nous n'avons pas encore tous les résultats pour expliquer toutes nos observations. Une meilleure compréhension de l'évolution des fibres élastiques dans le vieillissement de la peau pourra alors permettre le développement molécules ou produits finis pour lutter contre le relâchement de la peau induit par la diminution de la quantité globale et de la fonctionnalité des fibres élastiques.

La recherche de cibles pour le développement de produits anti-âge est un problème de santé publique au centre de préoccupations sociétales et cosmétiques. Ces recherches sont alimentées par l'augmentation constante de l'espérance de vie des populations. En réponse à l'interdiction de l'expérimentation animale pour évaluer la sécurité et l'efficacité des actifs comme des produits finis, les modèles de PR ont été largement utilisés (Augustin et al., 1998).

Outre le fait que les PR utilisent des cellules humaines, elles permettent une approche mécanistique pour identifier les cibles afin de comprendre l'efficacité des produits.

C'est avec le modèle de sénescence utilisant des PR sur support poreux que nous avons démontré que le sélénite de sodium, utilisé à très faible dose (30 nM), a un effet retardateur du vieillissement par la préservation de l'homéostasie épidermique. Pour cela nous avons sélectionné la concentration de 30 nM sur des cultures de kératinocytes et de fibroblastes en monocouche. Cette concentration déjà utilisée comme agent photoprotecteur et génoprotecteur sur des kératinocytes primaires (Favrot et al., *in press*) ou pour retarder la sénescence répliquative de fibroblastes humains WI-38 (Legrain et al., 2014). Du fait que la préservation des cellules souches kératinocytaires (KSC), *in vivo*, passe par leur fort ancrage à la membrane basale, nous avons étudié l'influence du sélénium sur leur adhésion. Ajouté dans le milieu de culture, le sélénium permet d'accroître la proportion d'holoclones générés par les KSC, lors d'un ensemencement à faible densité cellulaire (CFE augmenté de 50%). Il retarde aussi l'entrée en sénescence répliquative des kératinocytes primaires, indépendamment de l'âge du donneur de peau (34, 42 et 65 ans) dont les cellules ont été extraites (PDL à 88.106 ± 15.118 lorsque la culture est supplémentée par rapport à 57.666 ± 15.489 en conditions normales). Nos résultats montrent que la proportion de kératinocytes adhérents à la laminine 3.3.2 et au collagène de type IV, deux composés de la membrane basale, est augmentée de $133.1 \pm 12.4\%$ to $157.4 \pm 22.9\%$ respectivement lorsque les kératinocytes sont supplémentés en sélénium. Le sélénium donc a un rôle sur la préservation du pool des KSC via le maintien de leurs propriétés d'adhésion à la laminine 3.3.2 et au collagène de type IV, deux composés de la niche des KSC, via un enrichissement de l'expression des intégrines $\beta 1$ et $\alpha 6$. (Jones and Watt, 1993; Levy *et al.*, 2000; Rodius *et al.*, 2007)

Le modèle de PR est d'un grand intérêt car il est plus proche de la peau native que la culture en monocouche, et parce que la présence d'un derme équivalent vivant permet une culture longue mimant le vieillissement cutané. Les PR ont été supplémentées ou non avec le sélénium et récoltées à différents temps de culture pour analyses. Dans les PR supplémentées par rapport aux PR contrôles, on remarque une augmentation du nombre de cellules prolifératives (3 fois plus d'expression de Ki67 et 2 fois plus d'expression de k15) associée à un épiderme plus épais,

une diminution de 50% de cellules sénescents (exprimant P16INK4a) ainsi que le maintien de l'expression de la filaggrine, protéine impliquée dans la différenciation terminale des kératinocytes. La présence d'une JDE bien développée et organisée (Black *et al.*, 2005) nous a permis de rechercher les principaux marqueurs d'adhésion : intégrines $\beta 1$ et $\alpha 6$, laminine 3.3.2 et collagène de type IV. Après quantification de la fluorescence, on observe une diminution significative de l'expression des intégrines dans les PR sénescents, alors que les profils d'expression sont maintenus au cours du temps lorsque les peaux ont été supplémentées avec du sélénium. Le maintien de l'expression des intégrines $\beta 1$ et $\alpha 6$ par le sélénium protégerait les KSC de la différenciation en les maintenant fermement accrochés à la membrane basale. Par contre, nous n'avons pas pu observer de différence d'expression significative au niveau du collagène de type IV ni de la laminine 3.3.2.

Nos résultats sont en adéquation avec ceux de Sengupta *et al.* qui montrent le rôle primordial des sélénoenzymes sur le développement de l'épiderme et sur l'adhésion de ce dernier au derme (Sengupta *et al.*, 2010). En effet, des souris présentant un KO conditionnel pour l'expression des sélénoenzymes dans les kératinocytes présentent des peaux prématurément vieilles avec des zones de disjonction au niveau de la JDE.

Aussi bien en monocouche qu'en 3-D, le sélénium a montré un effet retardateur significatif contre le vieillissement cutané chronologique, via le maintien des capacités d'adhésion des KSC par les intégrines $\beta 1$ et $\alpha 6$. D'autres hypothèses pour expliquer le rôle anti-vieillesse du sélénium ont été soulevées au vu de la littérature.

Connaissant le rôle du sélénium comme cofacteur indispensable des sélénoenzymes antioxydantes, dont la glutathion peroxydase (Arthur, 2000; Flohe *et al.*, 1973; Lu and Holmgren, 2009; Mangiapane *et al.*, 2014), nous avons quantifié l'expression de 5 sélénoenzymes : la GPX1, la GPX2, la GPX4, la TR1 et la SELP dans les peaux reconstruites supplémentées ou non par PCR quantitative (FIGURE 48). Cependant, l'expression des différentes sélénoenzymes n'est pas apparue significativement différente, probablement à cause d'une variation inter-échantillon.

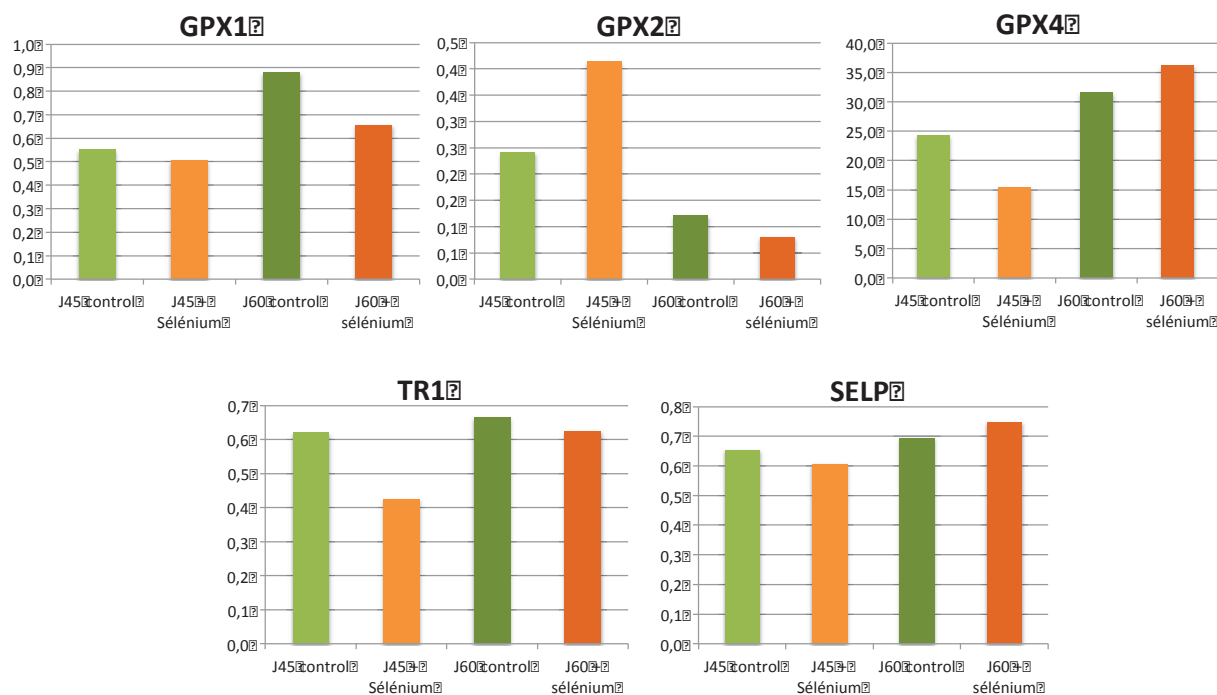


Figure 46: expression des sélénocoenzymes dans les peaux reconstruites supplémentées ou non avec 30nM de sélénium

En supplément du temps qu'il nous était imparti pour ce projet, nous aurions pu rechercher dans nos cultures monocouche et 3-D i) des marqueurs du stress oxydant, connu pour induire une sénescence cellulaire et un vieillissement prématuré de la peau (Poljšak *et al.*, 2012) via la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO); et ii) la réduction des dommages de l'ADN associée à l'amélioration des systèmes de réparation induits par le sélénium (Bera *et al.*, 2013; de Rosa *et al.*, 2012).

Enfin, une meilleure caractérisation de la sénescence de nos cultures après supplémentation en sélénium pourrait être envisagée via l'analyse de i) la sélénocoenzyme SelH, connue pour son rôle protecteur vis-à-vis de l'entrée en sénescence cellulaire de fibroblastes (Wu *et al.*, 2014). Elle permet de détoxifier le noyau cellulaire des ERO, d'augmenter directement l'expression du glutathion et indirectement des autres enzymes antioxydantes qui conduisent à la suppression d'accumulation de dommages oxydatifs sur l'ADN; ii) d'autres marqueurs moléculaires de la sénescence tels que l'accumulation de protéines oxydées, le raccourcissement des télomères et

l'augmentation du nombre de cellules SABG (senescence associated β Galactosidase) et SAHF (senescence associated heterochromatin foci) positives, ou l'augmentation des voies de signalisation p53 et p21 (Hornsby and Harris, 1987; Legrain *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014).

Tous ces modèles de peaux ont permis d'explorer différentes voies conduisant au vieillissement de la peau (la régulation génique par les microARN, l'évolution des fibres élastiques ainsi que la protection de la niche des kératinocytes souches), et ainsi ouvrir des pistes pour le développement d'application cosmétiques.

CONCLUSION

Les mécanismes qui favorisent le vieillissement cutané ne sont pas totalement élucidés et les modèles expérimentaux dont nous disposons restent perfectibles. Nos objectifs étaient simultanément de i) mieux comprendre les mécanismes du vieillissement cutané en utilisant les modèles de peaux reconstruites développés dans notre laboratoire, ii) de les faire évoluer en utilisant un modèle sur support poreux ou auto-assemblé et surtout avec des fibroblastes du même donneur prélevés à des âges différents et enfin iii) de les utiliser pour démontrer l'efficacité et le mécanisme d'action du sélénium comme « anti âge ». La *FIGURE 48* résume les objectifs, les modèles utilisés ainsi que les résultats obtenus.

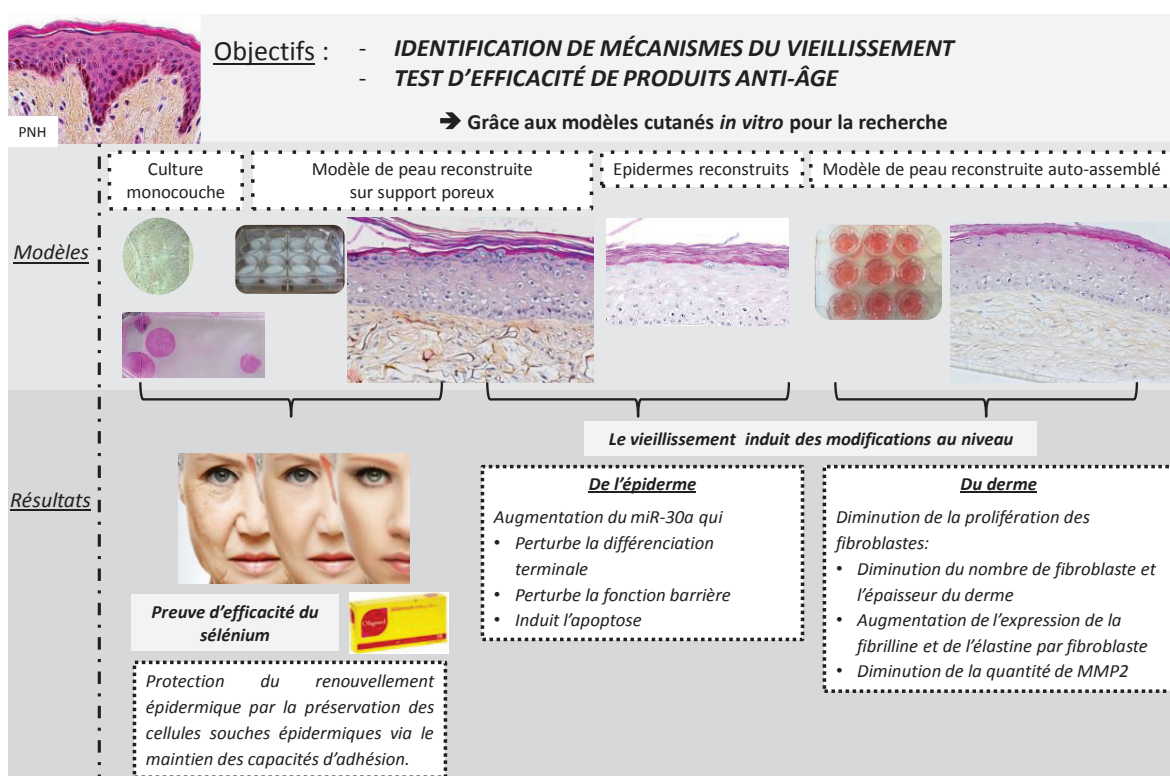


Figure 47: Evolution de modèles tridimensionnels de peau reconstruite pour approfondir la connaissance des mécanismes du vieillissement cutané et validation de l'efficacité « anti-âge » du sélénium.

Ainsi, grâce au modèle de PR sénescents, nous avons confirmé l'identification d'un microARN impliqué dans le vieillissement cutané, le miR-30a ([ARTICLE 1](#)). Il pourrait être une nouvelle cible pour le développement de stratégies anti-âge. La surexpression du miR-30a au cours du vieillissement a été mise en évidence dans les kératinocytes provenant de donneurs jeunes et âgés par l'équipe du Professeur Jérôme Lamartine et confirmée dans notre modèle dermo-épidermique sénescents. Nos résultats montrent en outre que ce microARN modulerait directement des gènes impliqués dans la différenciation de l'épiderme. En effet, sa surexpression conditionnelle conduit à une altération de la fonction barrière et à une différenciation terminale perturbée.

Nos résultats ont aussi permis de valider l'effet du sélénium comme potentiel agent « anti-âge » et ont conduit à la mise en évidence d'un mécanisme d'action ([ARTICLE 2](#)). Après avoir sélectionné la concentration optimale de sélénium (30nM) sur la capacité de croissance de fibroblastes et de kératinocytes primaires en monocouche, nous avons démontré le maintien des cellules souches de l'épiderme, les KSC, lors de passages successifs ainsi que dans notre modèle organotypique de peau. Ce maintien des KSC passe par leur meilleure adhésion à la membrane basale *via* une augmentation des intégrines $\alpha 6$ et $\beta 1$, mécanisme d'action validé par des tests d'adhésion des kératinocytes supplémentés en sélénium réalisés en collaboration avec Docteur Patricia Rousselle.

Dans ces modèles, les fibroblastes provenaient de donneurs différents et la variabilité génique interindividuelle reste un facteur non contrôlable. C'est pourquoi la mise à disposition par KOSE, industriel cosmétique Japonais, de fibroblastes d'âges différents (36 et 72 ans) provenant d'un donneur unique pour préparer des PR « jeunes » et « âgées » a été une opportunité exceptionnelle ([ARTICLE 3 – EN COURS](#)). Nous avons suivi l'évolution du tissu élastique dans ces PR « jeunes » et « âgées » et avons été surpris d'observer que les PR « âgées » utilisant le modèle poreux comme dans le modèle auto-assemblé, l'élastine et la fibrilline apparaissaient significativement augmentées après quantification des images d'immunofluorescence par Image J. De plus, la diminution de la quantité et de l'activité élastinolytique de la MMP2 et

MMP9 pourrait expliquer l'adaptation du fibroblaste pour pallier la perte de substance avec l'âge.

Tous ces modèles de peaux ont permis d'explorer différentes voies conduisant au vieillissement de la peau (la régulation génique par les microARN, l'évolution des fibres élastiques avec l'âge ainsi que la protection de la niche des kératinocytes souches), et ainsi d'ouvrir des pistes pour le développement d'application cosmétiques.

ANNEXES

I. MATERIEL ET METHODES SUPPLEMENTAIRES

A. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

1. EXTRACTION DES ARNS

Les peaux reconstruites sont fixées dans environ 5 volumes de RNA later (Sigma) et sont conservées au congélateur -80°C avant l'extraction des ARNs.

Après rinçage des PR dans du PBS, les ARNs totaux sont extraits à l'aide du kit mirVana (applied biosystems) selon le protocole suivant :

- Broyage des PR à l'aide d'un piston en plastique
- Ajout 500µl du tampon de lyse
- Ajout de 50µl d'additif d'homogénéisation puis vortexer le tube
- Incubation 10min sur glace
- Ajout de 500µl de phénol/chloroforme
- Agitation 1 min des tubes puis centrifugation 5min à 10 000g
- Récupération de 400µl de la phase supérieure aqueuse et transfert dans un nouveau tube
- Ajout de 500µl d'éthanol absolu
- Agitation par aspiration refoulement
- Passage des ARNs précipités dans l'éthanol sur une colonne fournie dans le kit après centrifugation à 9 000 g durant 30 secondes et élimination du surnageant
- Rinçage de la colonne avec 600µl de tampon de lavage n°1 puis centrifugation à 9 000g durant 30 secondes et élimination le surnageant
- Rinçage de la colonne avec 400µl de tampon de lavage n°2/3 puis centrifuger à 9 000g durant 30 secondes et éliminer le surnageant. Répéter cette opération 2 fois
- Centrifugation de la colonne à 12 000g durant 2 min pour éliminer toute trace d'alcool
- Transfert de la colonne sur un nouveau tube
- Ajout 80µl d'eau DEPC au milieu de la colonne et patienter 1 minuter
- Elution les ARNs totaux en centrifugeant la colonne à 12 000g durant 1 minute

La qualité des ARNs ainsi que leur concentration est évaluée par spectrophotométrie à l'aide d'un nanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific). Le ratio d'absorbance à 260 et 280 nm permet d'évaluer l'absence de protéine contaminant. Il doit être supérieur ou égal à 1,8. Le ratio d'absorbance à 260 et 230 nm permet de vérifier l'absence de contamination par des molécules organiques. Il doit être supérieur ou égal à 1,6.

2. RT q PCR

a) ARN messagers

Rétro-transcription : 500 ng des ARN totaux sont utilisés pour la rétro-transcription. Elle est réalisée en suivant le protocole du kit PrimeScript™ Rt Reagent kit (Clontech). Pour chaque échantillon, les tubes sont placés dans le thermo-cycleur après les avoir mélangés les différents composants suivant :

- 5X primeScript Buffer : 2 µl
- PrimeScript RT Enzyme Mix1 : 0.5 µl
- Oligo dT primer à 50 mM : 0.5 µl
- Random 6mers à 100 mM : 0.5 µl
- ARNs totaux : 500 ng
- Eau DEPC : qsp 10µl

Et selon le programme suivant:

- 15 min à 37°C
- 5 secondes à 85°C
- Maintient à 4°C

Polymérisation en chaîne : La réaction de polymérisation en chaîne en temps réel est réalisée à la suite de la rétro-transcription. Les ADNc sont dilués au 1/10^{ème} dans l'eau DEPC pour avoir une concentration de 5 ng/µl. Parallèlement, une gamme d'ADN de 5 points (de « 5000 » à « 8 ») est réalisée à partir d'une dilution au 1/100^{ème} d'ADNc suivie de dilutions en série d'un facteur 5. La réaction de PCR est réalisée avec le kit TAKARA en suivant le mélange suivant :

- Amorces reverse et forward diluées au 1/33^{ème} : 1µl
- Mix TAKARA + SYBR green : 5µl
- Eau : 2µl
- ANDc dilués: 2µl

Chaque échantillon est déposé en duplicata dans une plaque 96 puits, ainsi que un point par valeur de la gamme. Un contrôle négatif est réalisé en remplaçant l'ADNc par de l'eau. Le programme d'amplification de la machine AriaMx (Agilent) détaillé *TABLEAU* suivant :

	Durée	Température	Nombre de cycle
Dénaturation	30 secondes	95°C	1
Amplification	5 secondes	95°C	40
	30 secondes	60°C	
	30 secondes	72°C	
Melting curve	1 minute	95°C	1
	30 secondes	60°C	
	30 secondes	95°C	

Analyse des résultats

L'intégrité de l'amplification est vérifiée par la présence d'un pic unique (melt peak) pour chaque échantillon.

L'efficacité d'une réaction de PCR correspond au doublement de la quantité d'ADN à chaque cycle. L'efficacité est vérifiée pour chaque couple d'amorce via l'analyse de l'amplification de la gamme de dilution. Il est possible de tracer une droite $Ct=f(\log \text{ concentration})$ ou Ct est le nombre de cycle nécessaire pour obtenir un signal fluorescent significativement supérieur au bruit de fond. L'efficacité est calculée via la formule $E=10^{(-1/\text{pente})}$.

Le rapport d'expression (R) est calculé selon la formule suivante

$$R = E^{-(Ct \text{ gène cible échantillon d'intérêt} - Ct \text{ gène cible échantillon référence}) - (Ct \text{ gène de référence échantillon d'intérêt} - Ct \text{ gène de référence échantillon référence})}$$

Pour une efficacité de 100% $E=2$.

b) Micro ARN

Rétro transcription : La rétro-transcription pour les microARN est réalisée sur 50 ng d'ARN

totaux pour chaque microARN d'intérêt en suivant les recommandations détaillés ci-dessous du kit TaqMan microRNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific) :

Réactifs	Quantité
10X RT buffer	1.5 µl
dNTP 100 mM	0.15µl
RNAse inhibitor 20U/µl	0.19µl
MultiScribe TM revercer transcriptase 50U/µl	1µl
Amorces	3µl
ARN	50 ng
Eau DEPC	Qsp 15 µl

Le programme de température est le suivant :

- 30 min à 16°C
- 30 min à 42°C
- 5 min à 85°C
- Maintient à 4°C

Polymérisation en chaîne : La réaction de PCR est réalisée à l'aide d'amorces spécifiques TaqMan microARN assays (ThermoFisher Scientific) et au mix TaqMan Universal PCR Master Mix sur les ADNc non dilués selon le mix suivant :

- Master Mix : 10 µl
- Amorces : 1 µl
- ADNc : 1.33 µl
- Eau : 7.67 µl

Chaque échantillon déposé en duplicata subit le cycle suivant :

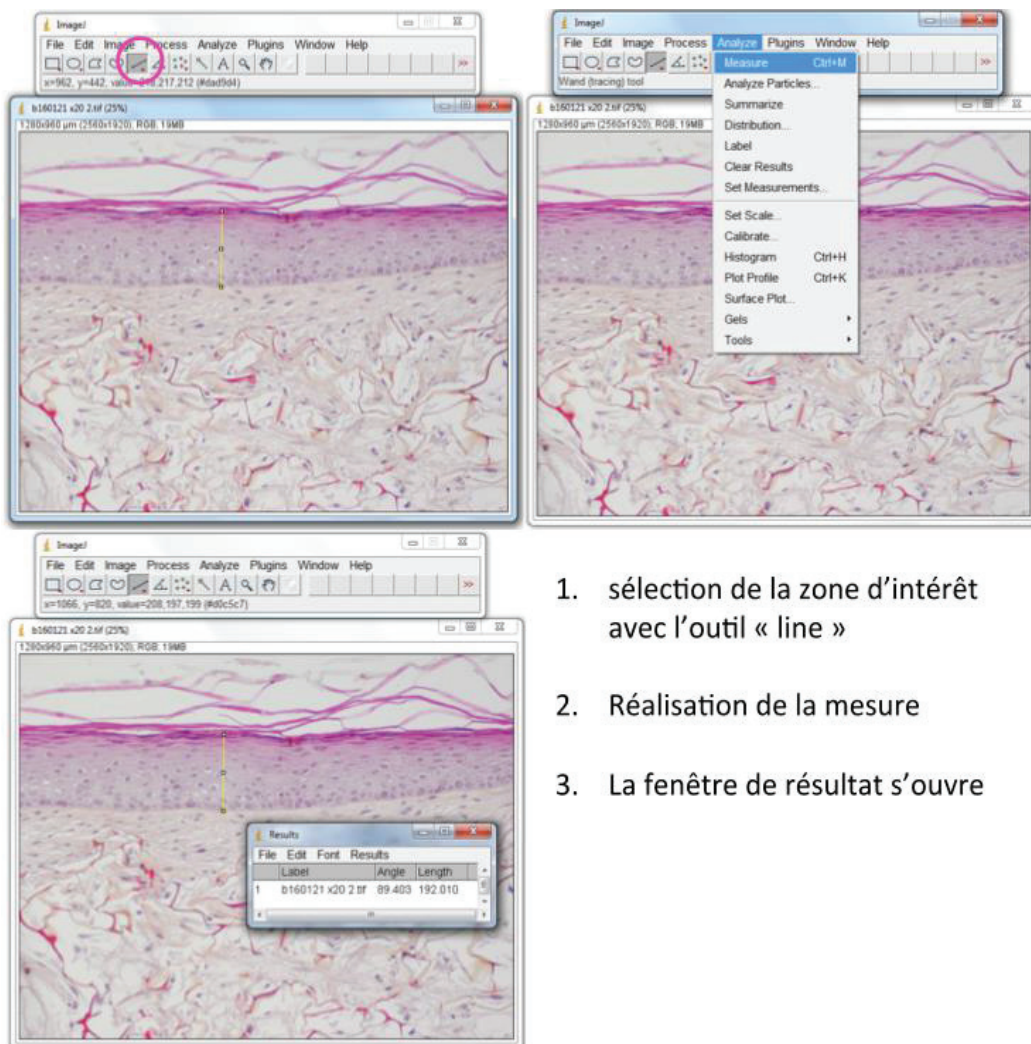
	Durée	Température	Nombre de cycle
Dénaturation	10 minutes	95°C	1
Amplification	15 secondes	95°C	40
	1 minute	60°C	

B. FICHES TECHNIQUES ANALYSE D'IMAGE

1. FICHE TECHNIQUE N°1 : MESURE D'ÉPAISSEUR DU DERME OU DE L'ÉPIDERME

Cette première fiche technique synthétise les étapes pour l'analyse de l'épaisseur de l'épiderme, dont le procédé est le même pour le derme.

Lorsque l'image est calibrée (taille exprimée en μm), les mesures sont exprimées en μm .

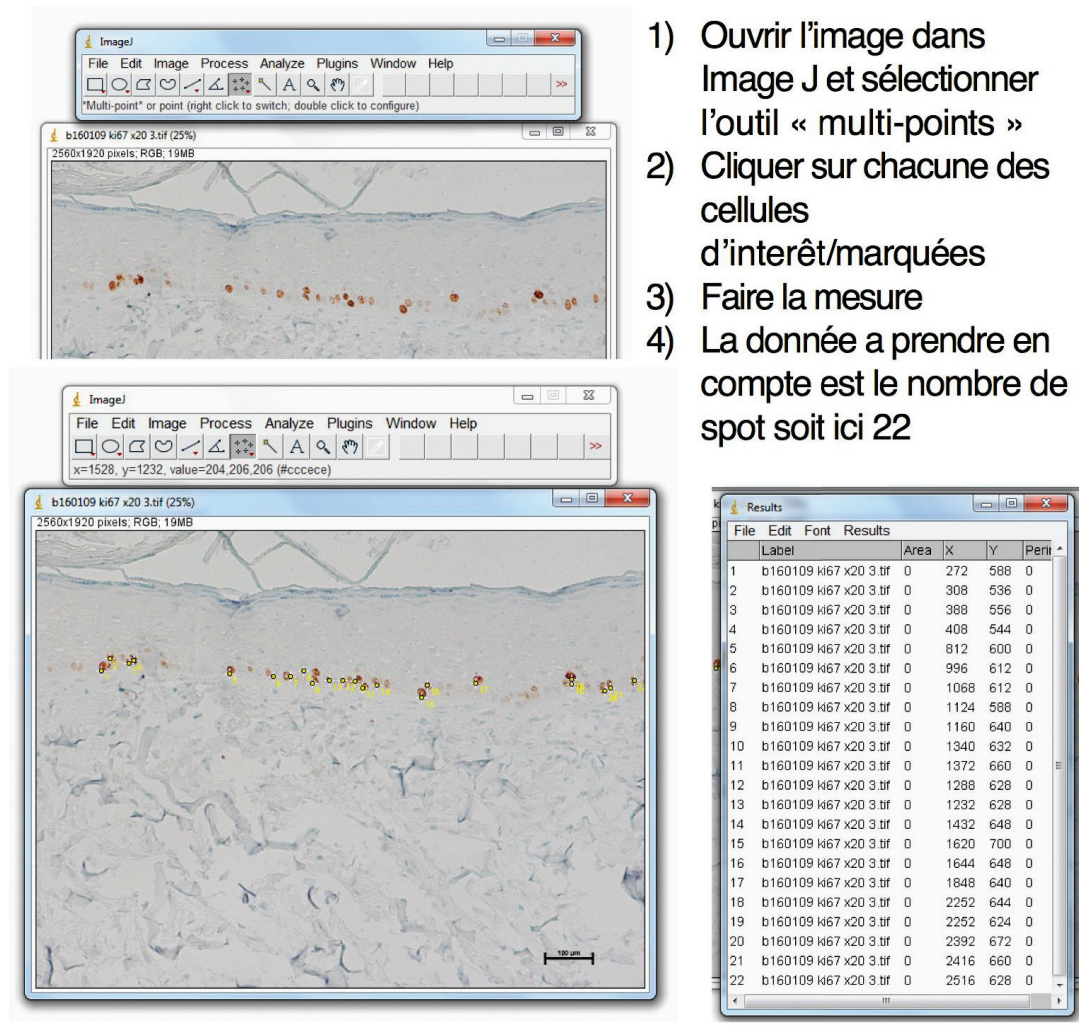


1. sélection de la zone d'intérêt avec l'outil « line »
2. Réalisation de la mesure
3. La fenêtre de résultat s'ouvre

Figure 48: illustration du processus de quantification d'épaisseur de tissu

2. FICHE TECHNIQUE N°2 : COMPTAGE DE CELLULES MARQUEES POSITIVEMENT

Cette deuxième fiche technique synthétise le procédé manuel de comptage de cellules exprimant un marqueur, ici Ki67.



Enregistrer les données bruts : Results + File + Save As

Figure 49: illustration du procédé de comptage des noyaux de cellules exprimant Ki67

NB : le comptage aura pu être fait de façon semi-automatique après segmentation de l'image sur la couleur (bleu et marron)

3. FICHE TECHNIQUE N°3 : QUANTIFICATION DE LA COLORATION A LA DAB APRES MARQUAGE EPIDERMIQUE

Içi est présenté le procédé de quantification d'une surface exprimant une protéine répartie dans une zone anatomique du tissu lors d'une révélation à la DAB (*FIGURE 51-A*). La zone d'intérêt (*FIGURE 51-B*) est isolée de l'image afin éviter les artéfacts (type : marquage non spécifique, insert de culture etc)

Deux manières de sélectionner la zone d'intérêt: via une segmentation HSB (Hue Saturation Brillance) (*FIGURE 51-D*) ou via une segmentation « color deconvolution » où l'opérateur est libre de délimiter les zones de couleurs d'intérêt (*FIGURE 51-E*). L'analyse est réalisée après application d'un seuil qui ne sélectionne que les pixels d'intérêt (*FIGURE 51-G*). La dernière mesure correspond à la surface de l'épiderme vivant, sélectionnée à façon.

Les résultats finaux sont exprimés comme un pourcentage de surface exprimant l'antigène par rapport à la surface de l'épiderme.

Pour exemple, le marquage de la filaggrine. Le procédé de segmentation et d'analyse est identique aux autres marquages dermiques ou épidermiques révélés en DAB (*TABLEAU 10 PAGE 151*).

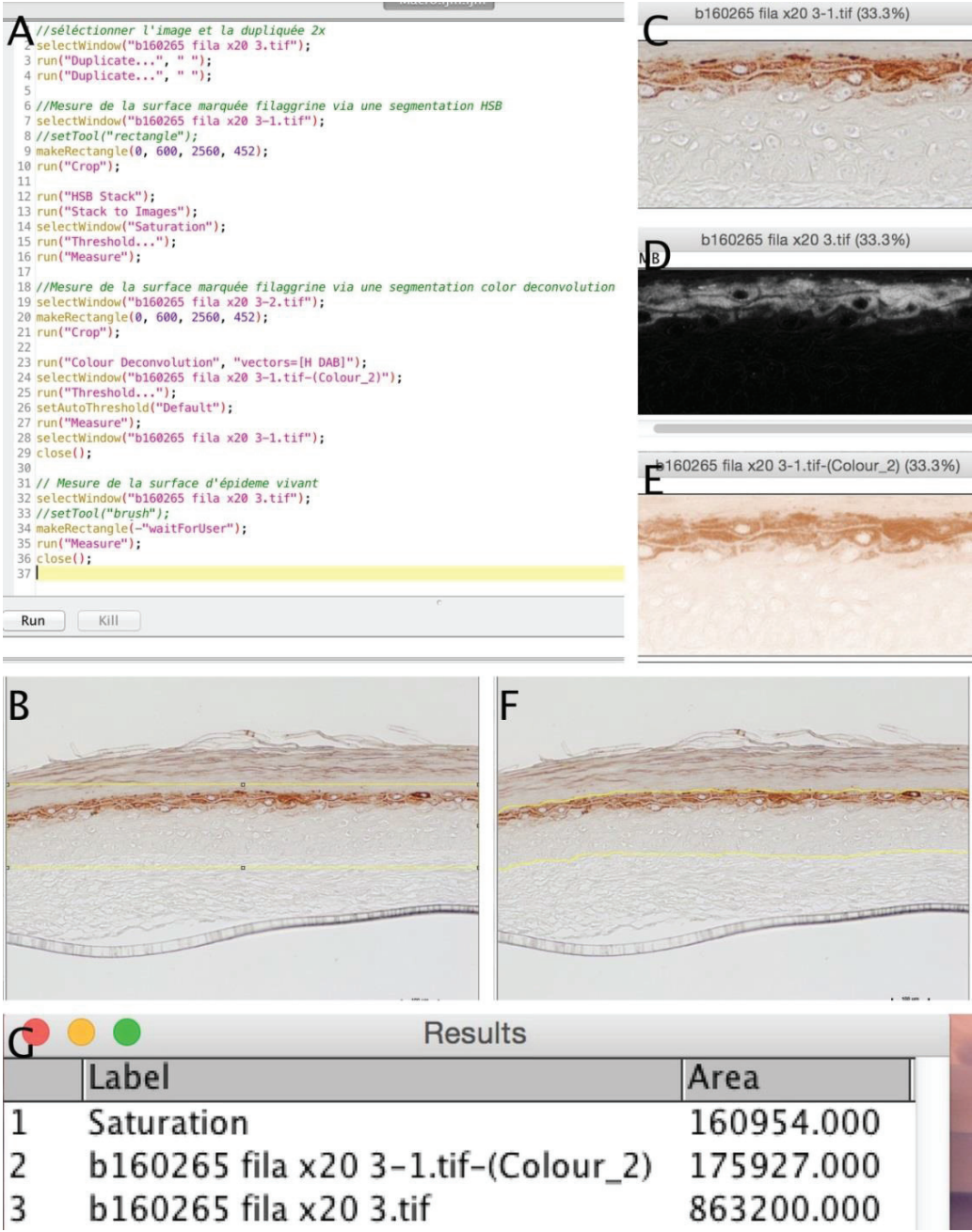


Figure 50: illustration des étapes pour l'analyse d'un marquage en révélation DAB dans le visible

4. FICHE TECHNIQUE N°4 : QUANTIFICATION DE LA FLUORESCENCE APRES MARQUAGE D'UNE PROTEINE RAPPORTE AU NOMBRE DE NOYAU COLORES PAR LE HOESCH

L'analyse à lieu dans la même zone de l'image

1. image avec les 2 canaux colorés compilées
2. image séparée : canal vert en nuance de gris
3. image séparée : canal bleu en nuance de gris
4. Délimitation à façon de la surface de derme
5. Comptage des noyaux via l'outil « find maxima »
6. Fenêtre « find maxima » avec l'application d'un seuil (Noise Tolerance) et le résultat de la détection (61 Maxima)
7. Suivi de la succession des étapes
8. Application du seuil sur l'image en B pour la mesure de la surface et de l'intensité
9. Résultats obtenus. 1^{ère} ligne : Surface totale du derme comme définie en D. Dernière ligne : surface du marquage et de l' « Integrated density » après application du seuil.

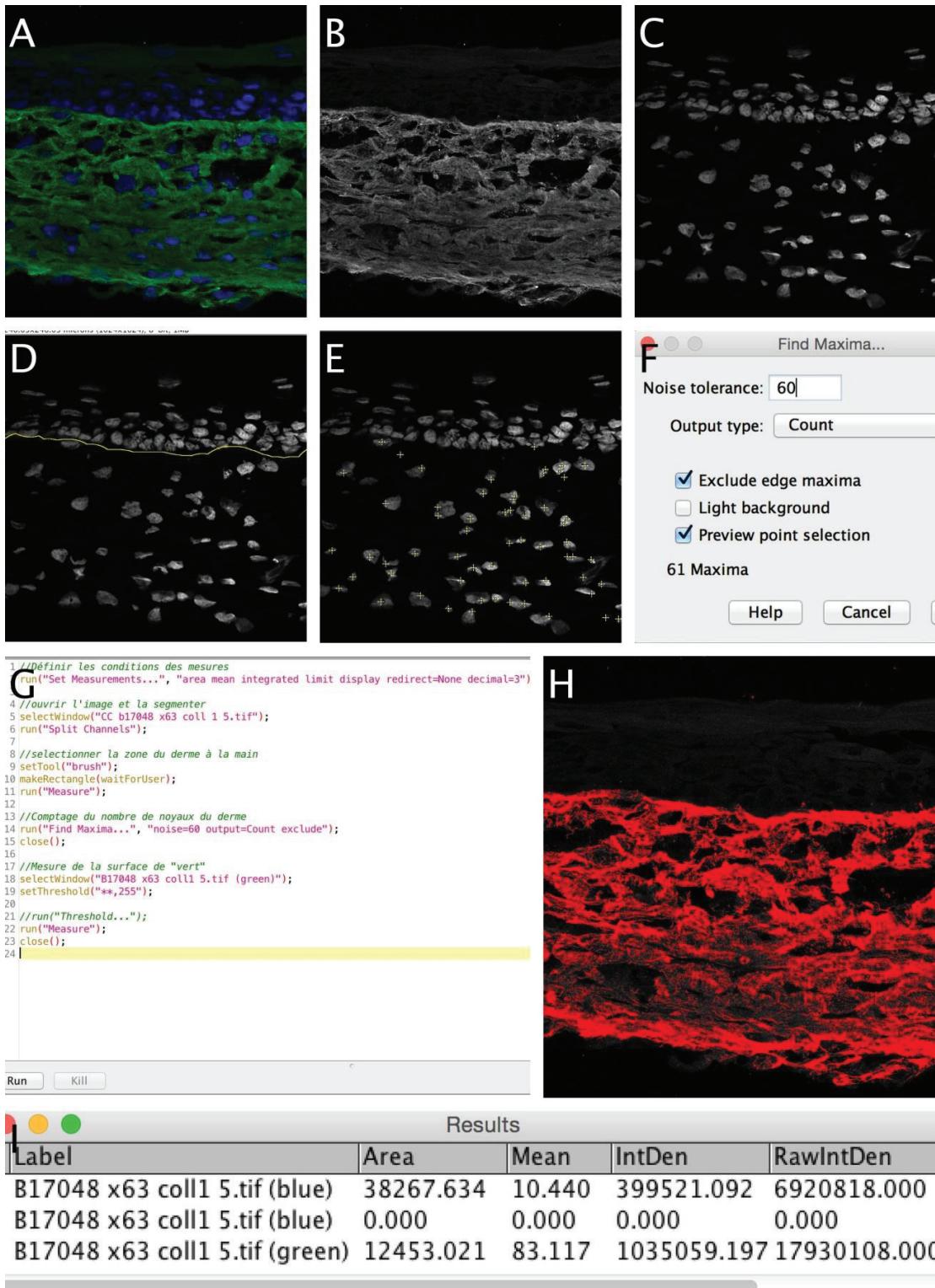


Figure 51 : illustration des étapes pour l'analyse d'un marquage en révélation fluorescent

5. *FICHE TECHNIQUE N°5 : QUANTIFICATION DE LA FLUORESCENCE
EXPRIMEE APRES MARQUAGE D'UNE PROTEINE DE LA JONCTION DERMO-
EPIDERMIQUE*

L'expression est rapportée à la longueur de la jonction dermo-épidermique

1. Suivi des étapes de l'analyse sous la forme d'une macro
2. Réglage des paramètres analysés
3. image avec les 2 canaux colorés compilés
4. image séparée : canal rouge en nuance de gris avec en surbrillance rouge les pixels inclus dans le seuil
5. détermination du seuil : sélection des pixels d'intérêt et exclusion des pixels non spécifique. Le seuil est appliqué de façon rigoureusement identique pour chaque image
6. Mesure de la longueur de la JDE
7. Les mesures comprenant le marquage dans le rouge : surface et « integrated density » ainsi que la longueur de la JDE (length)

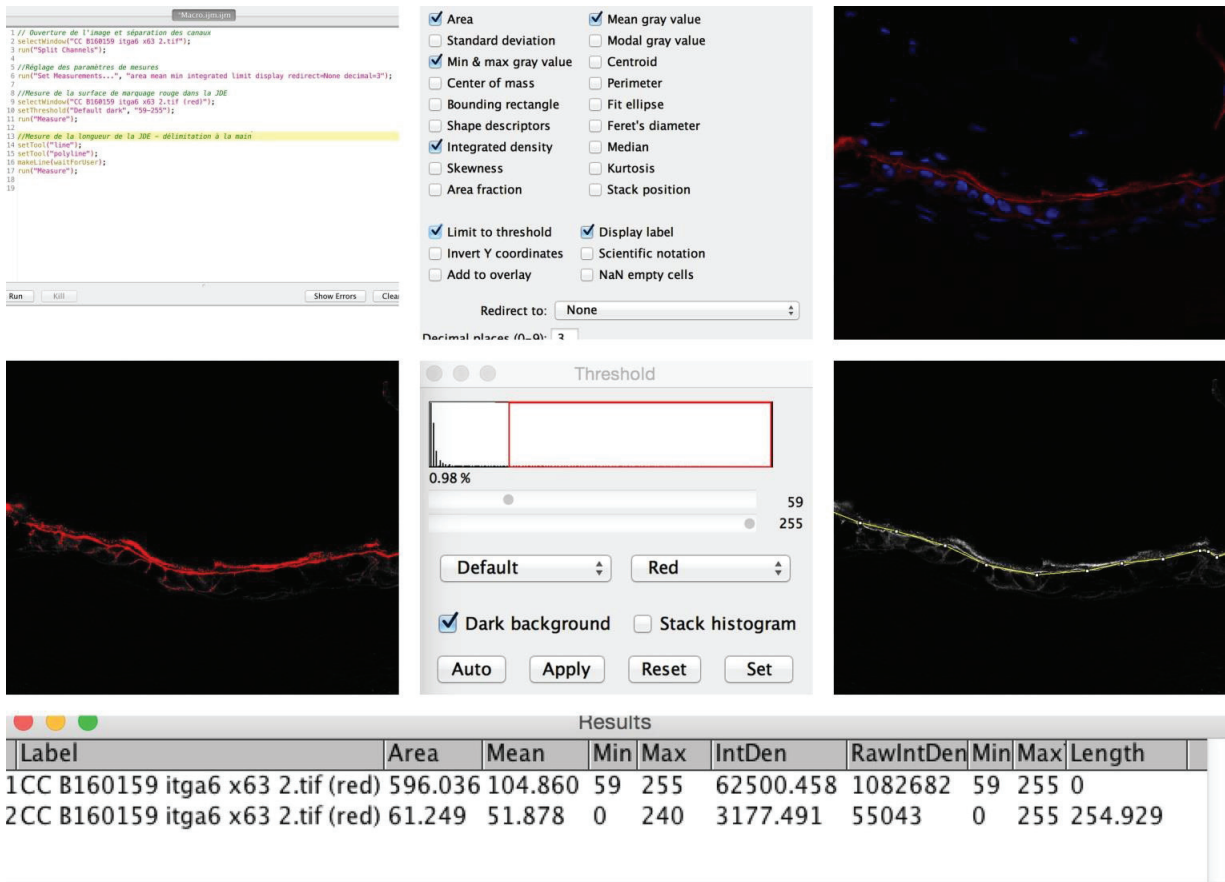


Figure 52: Illustration des étapes du procédé d'analyse d'un marquage de la jonction dermo-épidermique

V. ENCADREMENT TECHNIQUE D'ETUDIANTS

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de travailler avec 2 étudiantes en 5^{ème} année hospitalo-universitaire de pharmacie. Avec Virginie Pernot nous avons mis au point les tests de cytotoxicité du sélénium sur fibroblastes et kératinocytes et l'établissement d'une gamme de concentration non toxique.

Avec Sabine Benosmane nous avons validé qu'une longue conservation de fibroblastes à l'azote liquide (jusqu'à 23 ans) n'induisait pas de conséquence sur les capacités de synthèse de matrice extra cellulaire, en peau reconstruite et après irradiation afin d'obtenir la couche nouricière nécessaire à la culture de kératinocytes.

Ces deux étudiantes ont fait leur thèse d'exercice sur ces projets, les pages d'accueil et conclusion de ces thèses sont jointes ci-dessous.

A. THESE DE PHARMACIE DE VIRGINIE PERNOT

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

2015

THESE n°81

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
présentée et soutenue publiquement le 15 septembre 2015

par

Mme PERNOT Virginie

Née le 23 décembre 1992

A Lyon 8^{ème}

EFFET DU SÉLÉNIUM SUR LE VIEILLISSEMENT CUTANÉ

JURY

M. LAWTON Philippe, Professeur

Mme DAMOUR Odile, Docteur en Pharmacie

Mme AUXENFANS Céline, Docteur en Pharmacie

M. NATAF Serge, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

CONCLUSION

ISPB - FACULTE DE PHARMACIE

CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : Mme PERNOT Virginie

Le sélénium est un oligo-élément essentiel car non synthétisé par le corps humain : il doit donc être apporté impérativement par l'alimentation. Actuellement, la supplémentation en sélénium est indiquée lors de certaines affections musculaires et cutanées. L'objectif de cette thèse est d'apporter une preuve que le sélénium peut être indiqué dans la prévention du vieillissement cutané. Cette hypothèse est basée sur le fait que le sélénium permet à notre corps de produire des sélénoprotéines qui ont une action antioxydante, ce qui permet de lutter contre le stress oxydatif qui est connu pour accélérer le vieillissement.

Pour tester cette hypothèse, le modèle de sénescence *in vitro* développé au Laboratoire des Substituts Cutanés a été utilisé : les cellules ont été cultivées avec ce modèle tridimensionnel durant 75 jours. Le sélénium a été rajouté au 28^{ème} jour dans le milieu de culture, au moment du passage à l'interface air/liquide, à la concentration sélectionnée préalablement à l'aide de tests de cytotoxicité et de clonogénicité. Les peaux reconstruites traitées avec du sélénium ont été comparées à des peaux non traitées qui ont été cultivées en parallèle et dans les mêmes conditions. Différents temps de culture ont été étudiés (42, 60 et 75 jours) afin de visualiser la cinétique d'action du sélénium au cours de ce processus de sénescence *in vitro*. Des analyses histologiques aux différents temps ont permis de mesurer l'impact du sélénium sur l'épaisseur et la différenciation de l'épiderme. De plus, des analyses immunohistochimiques ont été utilisées pour visualiser l'expression de marqueurs de prolifération et de différenciation.

A ce jour, dans le temps imparti, 3 séries de test de viabilité cellulaire au Methyl Thiazol Tetrazolium sur des gammes de 8 concentrations d'intervalles de plus en plus réduits nous ont permis de sélectionner la concentration de 0,06 μ M comme concentration la plus élevée non cytotoxique à 72 heures. L'absence de toxicité à long terme et l'efficacité sur le potentiel clonogénique ont ensuite été démontrés par Colony-

Forming Unit / Colony-Forming Efficiency. Cette concentration de 0.06 μ M a été appliquée aux peaux reconstruites et les premiers résultats semblent prometteurs.

Au-delà de cette thèse, des tests complémentaires seront ensuite réalisés afin de déterminer le mécanisme d'action du sélénium.

Le Président de la thèse
Nom : Pr. LAWTON Philippe

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le **20 JUIL. 2015**
Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,

Professeure C. VINCIGUERRA

Pr. Vinciguerra et par délégation
La directrice adjointe
Pr. Stéphanie BRIANCON


B. THESE DE PHARMACIE DE SABRINE BENOSMANE

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

2016

THESE n°96

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
présentée et soutenue publiquement le 29 septembre 2016

par

Mme BENOSMANE Sabine

Née le 9 décembre 1992

À Hammamet Wilaya d'Alger

**Impact de la durée de conservation en azote liquide sur des
cellules**

JURY

Mme BOLZINGER Marie-Alexandrine

Mme DAMOUR Odile

Mme AUXENFANS Céline

Mme PASCAL Pascale

Conclusions

ISPB - FACULTE DE PHARMACIE

CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : Mme BENOSMANE Sabrina

La Banque de Tissus et Cellules des Hospices Civils de Lyon, qui prépare des feuillets épidermiques pour le traitement des grands brûlés depuis 1988, utilise comme couches nourricières des fibroblastes humains irradiés extraits de la peau d'un donneur depuis 1992. Ces cellules sont conservées dans des cuves d'azote liquide sous forme de banques de fibroblastes : une banque de réserve qui donne naissance à une banque de travail constituée et qualifiée selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire. La cryoconservation en azote liquide, considérée comme une méthode efficace pour conserver des cellules sur des durées indéfinies, permet de conserver ces banques immédiatement disponibles pour la fabrication des médicaments de thérapie innovante. Au fur et à mesure de la constitution de chaque nouvelle banque de travail, les contrôles d'efficacité à côté des contrôles de sécurité et des contrôles qualité ont été effectués par rapport à la banque précédente prouvant qu'elles donnent les mêmes spécifications.

Notre but est ici de tester des fibroblastes, provenant de la souche isolée en 1992 correspondant à des Banques de travail différentes, toutes préparées à partir de la même banque de réserve, dont les temps de conservation sont 23 ans, 15 ans et 9 ans, dans une même expérimentation avec les mêmes conditions. Ces banques de travail sont comparées à une banque de fibroblastes préparée récemment, provenant d'une souche extraite en 2012 soit il y a 4 ans et dont la durée de congélation n'est que d'un mois dans l'azote liquide.

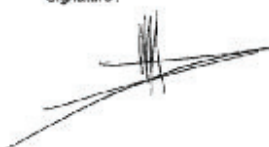
Dans un premier temps, la capacité de ces fibroblastes à préparer des peaux reconstruites a été évaluée. Les différentes souches de fibroblastes ont été cultivées durant 48 jours sur les modèles tridimensionnels développés par le Laboratoire des Substituts Cutanés. Deux temps de culture ont été étudiés (42 et 48 jours) et des analyses histologiques par coloration Hémaroxylène-Phloxine-Safran ont permis de mesurer l'impact de la durée de conservation en azote liquide sur la néosynthèse de matrice extracellulaire de ces fibroblastes composant le derme ainsi que sur le développement et la différenciation des kératinocytes formant l'épiderme. De plus, des marquages immunohistochimiques ont été utilisés pour visualiser l'expression de marqueurs de prolifération et de différenciation. Les premiers résultats ne montrent pas de différence visible entre les dermes obtenus avec les différentes souches de cellules, qu'elles aient eu une conservation en azote liquide de courte ou de longue durée.

Dans un deuxième temps, trois souches de kératinocytes ont étéensemencées sur des couches nourricières irradiées réalisées à partir des souches de fibroblastes d'intérêts. L'impact de la durée de conservation en azote liquide sur le potentiel clonogénique de ces cellules a été évalué par Colony-Forming Unit/Colony-Forming Efficiency.

Au-delà de cette thèse, des tests complémentaires pourront être réalisés comme l'évaluation de la capacité de synthèse des fibroblastes par quantitative reverse transcription polymérase chain reaction.

Le Président de la thèse,
Nom : *BOZIN-BER*

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le **26 JUIL. 2016**
Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et
Biologiques, Faculté de Pharmacie

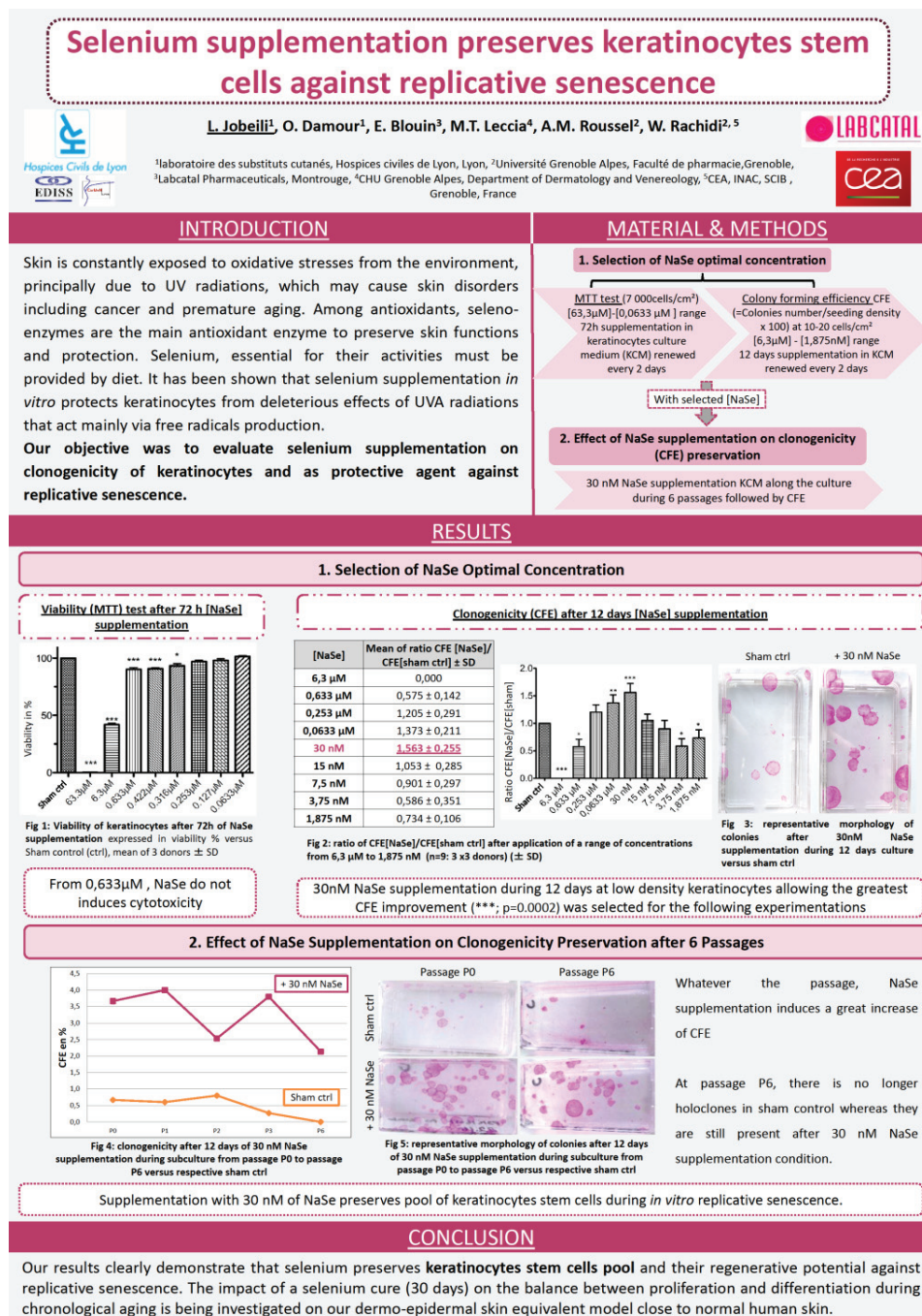
Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,

Professeure C. VINCIGUERRA
Pr. Directrice et par délégation
de la direction adjointe
Pr. Stéphanie BRILAVOIN



VI. COMMUNICATIONS AUTRES

Durant cette thèse j'ai aussi eu l'opportunité de présenter mes résultats lors du CARD de décembre 2016 qui a eu lieu à Paris sous la forme l'un poster.



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abdallah, F., Mijouin, L., and Pichon, C. (2017). Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. *Mediators Inflamm.* 2017, 5095293.

Afanas'ev, I. (2010). Signaling by Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Skin Diseases. *Curr. Drug Metab.* 11, 409–414.

Akbaraly, N.T. (2005). Selenium and Mortality in the Elderly: Results from the EVA Study. *Clin. Chem.* 51, 2117–2123.

Akhurst, R.J., and Hata, A. (2012). Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 886–886.

Albrecht, S., From, L., and Kahn, H.J. (1991). Lysozyme in abnormal dermal elastic fibers of cutaneous aging, solar elastosis and pseudoxanthoma elasticum. *J. Cutan. Pathol.* 18, 75–80.

Aldag, C., Nogueira Teixeira, D., and Leventhal, P.S. (2016). Skin rejuvenation using cosmetic products containing growth factors, cytokines, and matrikines: a review of the literature. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol. Volume 9*, 411–419.

Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W., and Harley, C.B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10114–10118.

Alonso, L., and Fuchs, E. (2003). Stem cells of the skin epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 11830–11835.

Antonicelli, F., Bellon, G., Debelle, L., and Hornebeck, W. (2007). Elastin-elastases and inflamm-aging. *Curr. Top. Dev. Biol.* 79, 99–155.

Armanios, M., Alder, J.K., Parry, E.M., Karim, B., Strong, M.A., and Greider, C.W. (2009). Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. *Am. J. Hum. Genet.* 85, 823–832.

Arnaud, J., Akbaraly, T.N., Akbaraly, N.T., Hininger, I., Roussel, A.-M., and Berr, C. (2007). Factors associated with longitudinal plasma selenium decline in the elderly: the EVA study. *J. Nutr. Biochem.* 18, 482–487.

Arthur, J.R. (2000). The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1825–1835.

Ashworth, J.L., Murphy, G., Rock, M.J., Sherratt, M.J., Shapiro, S.D., Shuttleworth, C.A., and Kielty, C.M. (1999). Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodelling. *Biochem. J.* 340 (Pt 1), 171–181.

Asuncion, L., Fogelgren, B., Fong, K.S., Fong, S.F., Kim, Y., and Csiszar, K. (2001). A novel human lysyl oxidase-like gene (LOXL4) on chromosome 10q24 has an altered scavenger receptor cysteine rich domain. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 20, 487–491.

Atsawasuwan, P., Mochida, Y., Katafuchi, M., Kaku, M., Fong, K.S.K., Csiszar, K., and Yamauchi, M. (2008). Lysyl Oxidase Binds Transforming Growth Factor- β and Regulates Its Signaling via Amine Oxidase Activity. *J. Biol. Chem.* *283*, 34229–34240.

Augustin, C., Collombel, C., and Damour, O. (1998). Use of Dermal Equivalent and Skin Equivalent Models for *in Vitro* Cutaneous Irritation Testing of Cosmetic Products: Comparison with *in Vivo* Human Data. *J. Toxicol. Cutan. Ocul. Toxicol.* *17*, 5–17.

Aumailley, M., and Rousselle, P. (1999). Laminins of the dermo-epidermal junction. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* *18*, 19–28.

Auxenfans, C., Lequeux, C., Perrusel, E., Mojallal, A., Kinikoglu, B., and Damour, O. (2012). Adipose-derived stem cells (ASCs) as a source of endothelial cells in the reconstruction of endothelialized skin equivalents. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* *6*, 512–518.

B

Bailey, A.J. (2001). Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech. Ageing Dev.* *122*, 735–755.

Bandura, L., Drukala, J., Wolnicka-Glubisz, A., Bjørnstedt, M., and Korohoda, W. (2005). Differential effects of selenite and selenate on human melanocytes, keratinocytes, and melanoma cells. *Biochem. Cell Biol.* *83*, 196–211.

Banerjee, J., Chan, Y.C., and Sen, C.K. (2011). MicroRNAs in skin and wound healing. *Physiol. Genomics* *43*, 543–556.

Barrandon, Y., and Green, H. (1987). Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *84*, 2302–2306.

Battie, C., Jitsukawa, S., Bernerd, F., Del Bino, S., Marionnet, C., and Verschoore, M. (2014). New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types. *Exp. Dermatol.* *23*, 7–12.

Beck, M.A. (2001). Antioxidants and viral infections: host immune response and viral pathogenicity. *J. Am. Coll. Nutr.* *20*, 384S–388S; discussion 396S–397S.

Beck, M.A., Nelson, H.K., Shi, Q., Van Dael, P., Schiffrin, E.J., Blum, S., Barclay, D., and Levander, O.A. (2001). Selenium deficiency increases the pathology of an influenza virus infection. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *15*, 1481–1483.

Bedell-Hogan, D., Trackman, P., Abrams, W., Rosenbloom, J., and Kagan, H. (1993). Oxidation, cross-linking, and insolubilization of recombinant tropoelastin by purified lysyl oxidase. *J. Biol. Chem.* *268*, 10345–10350.

Bell, E., Ehrlich, H.P., Sher, S., Merrill, C., Sarber, R., Hull, B., Nakatsuji, T., Church, D., and Buttle, D.J. (1981). Development and use of a living skin equivalent. *Plast. Reconstr. Surg.* *67*, 386–392.

Bell, E., Sher, S., Hull, B., Merrill, C., Rosen, S., Chamson, A., Asselineau, D., Dubertret, L., Coulomb, B., Lapiere, C., et al. (1983). The reconstitution of living skin. *J. Invest. Dermatol.* *81*, 2s–10s.

- Bera, S., Rosa, V.D., Rachidi, W., and Diamond, A.M. (2013). Does a role for selenium in DNA damage repair explain apparent controversies in its use in chemoprevention? *Mutagenesis* 28, 127–134.
- Berk, J.L., Franzblau, C., and Goldstein, R.H. (1991). Recombinant interleukin-1 beta inhibits elastin formation by a neonatal rat lung fibroblast subtype. *J. Biol. Chem.* 266, 3192–3197.
- Bernstein, E.F., Chen, Y.Q., Tamai, K., Shepley, K.J., Resnik, K.S., Zhang, H., Tuan, R., Mauviel, A., and Uitto, J. (1994). Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J. Invest. Dermatol.* 103, 182–186.
- Berr, C., Arnaud, J., and Akbaraly, T.N. (2012). Selenium and cognitive impairment: A brief-review based on results from the EVA study. *BioFactors* 38, 139–144.
- Berthod, F., Sahuc, F., Hayek, D., Damour, O., and Collombel, C. (1996). Deposition of collagen fibril bundles by long-term culture of fibroblasts in a collagen sponge. *J. Biomed. Mater. Res.* 32, 87–93.
- Berton, A., Godeau, G., Emonard, H., Baba, K., Bellon, P., Hornebeck, W., and Bellon, G. (2000). Analysis of the ex vivo specificity of human gelatinases A and B towards skin collagen and elastic fibers by computerized morphometry. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 19, 139–148.
- Black, A.F., Berthod, F., L'heureux, N., Germain, L., and Auger, F.A. (1998). *In vitro* reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 12, 1331–1340.
- Black, A.F., Bouez, C., Perrier, E., Schlotmann, K., Chapuis, F., and Damour, O. (2005). Optimization and Characterization of an Engineered Human Skin Equivalent. *Tissue Eng.* 11, 723–733.
- Blanpain, C., and Fuchs, E. (2007). p63: revving up epithelial stem-cell potential. *Nat. Cell Biol.* 9, 731–733.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349–352.
- Borel, A., Eichenberger, D., Farjanel, J., Kessler, E., Gleyzal, C., Hulmes, D.J.S., Sommer, P., and Font, B. (2001). Lysyl Oxidase-like Protein from Bovine Aorta: ISOLATION AND MATURATION TO AN ACTIVE FORM BY BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-1. *J. Biol. Chem.* 276, 48944–48949.
- Bose, A., Teh, M.-T., Hutchison, I.L., Wan, H., Leigh, I.M., and Waseem, A. (2012). Two Mechanisms Regulate Keratin K15 Expression In Keratinocytes: Role of PKC/AP-1 and FOXM1 Mediated Signalling. *PLoS ONE* 7, e38599.
- Bouissou, H., Pieraggi, M.-T., Julian, M., and Savait, T. (1988). The elastic tissue of the skin. *Int. J. Dermatol.* 27, 327–335.
- Box, N.F., Torchia, E.C., and Roop, D.R. (2010). Are stem cell niches shared for skin cancers? *Pigment Cell Melanoma Res.* 23, 517–520.
- Boyce, S., Michel, S., Reichert, U., Shroot, B., and Schmidt, R. (1990). Reconstructed skin from cultured human keratinocytes and fibroblasts on a collagen-glycosaminoglycan biopolymer substrate. *Skin Pharmacol. Physiol.* 3, 136–143.

Bragulla, H.H., and Homberger, D.G. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J. Anat.* *214*, 516–559.

Briggaman, and Wheeler (1975). The epidermal-dermal junction.

Brigo, F., Storti, M., Lochner, P., Tezzon, F., and Nardone, R. (2014). Selenium supplementation for primary prevention of cardiovascular disease: proof of no effectiveness. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* *24*, e2-3.

Burgeson, R.E. (1987). The collagens of skin. *Curr. Probl. Dermatol.* *17*, 61–75.

C

Cadet, J., Douki, T., and Ravanat, J.-L. (2015). Oxidatively Generated Damage to Cellular DNA by UVB and UVA Radiation. *Photochem. Photobiol.* *91*, 140–155.

Campisi, J. (1998). The role of cellular senescence in skin aging. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* *3*, 1–5.

Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 729–740.

Cantor, J.O., Shteyngart, B., Cerreta, J.M., Ma, S., and Turino, G.M. (2006). Synergistic effect of hydrogen peroxide and elastase on elastic fiber injury in vitro. *Exp. Biol. Med.* *231*, 107–111.

Cattell, M.A., Hasleton, P.S., and Anderson, J.C. (1993). Increased elastin content and decreased elastin concentration may be predisposing factors in dissecting aneurysms of human thoracic aorta. *Cardiovasc. Res.* *27*, 176–181.

Cerimele, D., Celleno, L., and Serri, F. (1990). Physiological changes in ageing skin. *Br. J. Dermatol.* *122 Suppl 35*, 13–20.

Charbonneau, N.L., Ono, R.N., Corson, G.M., Keene, D.R., and Sakai, L.Y. (2004). Fine tuning of growth factor signals depends on fibrillin microfibril networks. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* *72*, 37–50.

Chen, Y., Tsai, Y.-H., and Tseng, S.-H. (2016). Selenite Stimulates the Proliferation of Intestinal Stem Cells With Elevated Antioxidative Activity. *Transplant. Proc.* *48*, 507–511.

Chen, Y.-C., Prabhu, K.S., and Mastro, A.M. (2013). Is selenium a potential treatment for cancer metastasis? *Nutrients* *5*, 1149–1168.

Chen, Z., Shin, M.H., Moon, Y.J., Lee, S.R., Kim, Y.K., Seo, J.-E., Kim, J.E., Kim, K.H., and Chung, J.H. (2009). Modulation of elastin exon 26A mRNA and protein expression in human skin *in vivo*. *Exp. Dermatol.* *18*, 378–386.

Clark, L.C., Combs, G.F., Turnbull, B.W., Slate, E.H., Chalker, D.K., Chow, J., Davis, L.S., Glover, R.A., Graham, G.F., Gross, E.G., et al. (1996). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA* *276*, 1957–1963.

Clayton, E., Doupé, D.P., Klein, A.M., Winton, D.J., Simons, B.D., and Jones, P.H. (2007). A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature* 446, 185–189.

Cohen, B.E., Geronemus, R.G., McDaniel, D.H., and Brauer, J.A. (2017). The Role of Elastic Fibers in Scar Formation and Treatment. *Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg. Al* 43 Suppl 1, S19–S24.

Combs, G.F., and Gray, W.P. (1998). Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol. Ther.* 79, 179–192.

Cotta-Pereira, G., Guerra Rodrigo, F., and Bittencourt-Sampaio, S. (1976). Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. *J. Invest. Dermatol.* 66, 143–148.

Coulomb, B., Dubertret, L., Bell, E., Merrill, C., Fosse, M., Breton-Gorius, J., Prost, C., and Touraine, R. (1983). Endogenous peroxidases in normal human dermis: a marker of fibroblast differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 81, 75–78.

Csiszar, K., Entersz, I., Trackman, P.C., Samid, D., and Boyd, C.D. (1996). Functional analysis of the promoter and first intron of the human lysyl oxidase gene. *Mol. Biol. Rep.* 23, 97–108.

Czekalla, C., Schönborn, K.-H., Döge, N., Jung, S., Darvin, M.E., Lademann, J., and Meinke, M.C. (2017). Impact of Body Site, Age, and Gender on the Collagen/Elastin Index by Noninvasive *in vivo* Vertical Two-Photon Microscopy. *Skin Pharmacol. Physiol.* 30, 260–267.

D

Daugaard, I., and Hansen, T.B. (2017). Biogenesis and Function of Ago-Associated RNAs. *Trends Genet.* 33, 208–219.

Davies, K.J. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61, 1–31.

Davis, C.D., Tsuji, P.A., and Milner, J.A. (2012). Selenoproteins and cancer prevention. *Annu. Rev. Nutr.* 32, 73–95.

Dezutter-Dambuyant, C., Black, A., Bechetoille, N., Bouez, C., Maréchal, S., Auxenfans, C., Cenizo, V., Pascal, P., Perrier, E., and Damour, O. (2006). Evolutionary skin reconstructions: from the dermal collagen-glycosaminoglycan-chitosane substrate to an immunocompetent reconstructed skin. *Biomed. Mater. Eng.* 16, S85-94.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9363–9367.

D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., and Scott, T. (2013). UV Radiation and the Skin. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 12222–12248.

Dos Santos, M., Metral, E., Boher, A., Rousselle, P., Thepot, A., and Damour, O. (2015). *In vitro* 3-D model based on extending time of culture for studying chronological epidermis aging. *Matrix Biol.* 47, 85–97.

Driscoll, D.M., and Chavatte, L. (2004). Finding needles in a haystack. In silico identification of eukaryotic selenoprotein genes. *EMBO Rep.* 5, 140–141.

Duca, L., Floquet, N., Alix, A.J.P., Haye, B., and Debelle, L. (2004). Elastin as a matrikine. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 49, 235–244.

Duntas, L.H., and Benavenga, S. (2015). Selenium: an element for life. *Endocrine* 48, 756–775.

E

Ebersole, G.C., Anderson, P.M., and Powell, H.M. (2010). Epidermal differentiation governs engineered skin biomechanics. *J. Biomech.* 43, 3183–3190.

Echinard, C., Dantzer, E., Poinsignon, F., Damour, O., Vescovali, C., David, M.F., Marchetti, B., Adhoute, H., Sahabeddin, L., and Collombel, C. (1989). [Development of non-cellular dermis: a step towards a total artificial skin]. *Ann. Chir. Plast. Esthet.* 34, 346–352.

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) (2016). Safety and efficacy of selenium compounds (E8) as feed additives for all animal species: sodium selenite, based on a dossier submitted by Retorte GmbH Selenium Chemicals and Metals. *EFSA J.* 14.

Eichner, R., and Rosenbloom, J. (1979). Collagen and elastin synthesis in the developing chick aorta. *Arch. Biochem. Biophys.* 198, 414–423.

El-Domyati, M., Attia, S., Saleh, F., Brown, D., Birk, D.E., Gasparro, F., Ahmad, H., and Uitto, J. (2002). Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp. Dermatol.* 11, 398–405.

Espinoza, S.E., Guo, H., Fedarko, N., DeZern, A., Fried, L.P., Xue, Q.-L., Leng, S., Beamer, B., and Walston, J.D. (2008). Glutathione peroxidase enzyme activity in aging. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 63, 505–509.

Eybl, V., S0ykora, J., and Mertl, F. (1969). [Influence of sodium sulfite, sodium tellurite and sodium selenite on the retention of zinc, cadmium and mercury in the organism]. *Experientia* 25, 504–505.

F

Fairweather-Tait, S.J., Bao, Y., Broadley, M.R., Collings, R., Ford, D., Hesketh, J.E., and Hurst, R. (2011). Selenium in human health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 1337–1383.

Fan, A.M., and Kizer, K.W. (1990). Selenium. Nutritional, toxicologic, and clinical aspects. *West. J. Med.* 153, 160–167.

Fantasia, J., Lin, C.B., Wiwi, C., Kaur, S., Hu, Y.P., Zhang, J., and Southall, M.D. (2013). Differential levels of elastin fibers and TGF- β signaling in the skin of Caucasians and African Americans. *J. Dermatol. Sci.* 70, 159–165.

Faury, G. (2001). Function–structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres. *Pathol. Biol.* 49, 310–325.

FAVROT, C., BEAL, D., BLOUIN, E., LECCIA, M., ROUSSEL, A., and RACHIDI, W. Age-dependent protective effect of selenium against UVA irradiation in primary human keratinocytes and the associated DNA repair signature.

Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 247–254.

Fisher, G.J., and Voorhees, J.J. (1998). Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin *in vivo*. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* *3*, 61–68.

Fleischmajer, R., Schechter, A., Bruns, M., Perlish, J.S., Macdonald, E.D., Pan, T.C., Timpl, R., and Chu, M.L. (1995). Skin fibroblasts are the only source of nidogen during early basal lamina formation *in vitro*. *J. Invest. Dermatol.* *105*, 597–601.

Flohe, L., Günzler, W.A., and Schock, H.H. (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* *32*, 132–134.

Fortunel, N.O. (2003). Long-term expansion of human functional epidermal precursor cells: promotion of extensive amplification by low TGF-1 concentrations. *J. Cell Sci.* *116*, 4043–4052.

Foster, J., Rich, C.B., and Florini, J.R. (1987). Insulin-like growth factor I, somatomedin C, induces the synthesis of tropoelastin in aortic tissue. *Coll. Relat. Res.* *7*, 161–169.

Foster, J.A., Rich, C.B., and Karr, S.R. (1983). Elastin gene expression. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* *10*, 65–95.

Frances, C., and Robert, L. (1984). Elastin and elastic fibers in normal and pathologic skin. *Int. J. Dermatol.* *23*, 166–179.

Fuchs, E. (1995). Keratins and the skin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *11*, 123–154.

Fulop, T., Khalil, A., and Larbi, A. (2012). The role of elastin peptides in modulating the immune response in aging and age-related diseases. *Pathol. Biol. (Paris)* *60*, 28–33.

G

Gallico, G.G.I., O'Connor, N.E., Compton, C.C., Kehinde, O., and Green, H. (1984). Permanent Coverage of Large Burn Wounds with Autologous Cultured Human Epithelium. *N. Engl. J. Med.* *311*, 448–451.

Ghazizadeh, S., and Taichman, L.B. (2001). Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J.* *20*, 1215–1222.

Ghazizadeh, S., and Taichman, L.B. (2005). Organization of stem cells and their progeny in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* *124*, 367–372.

Ghneim, H.K., and Al-Sheikh, Y.A. (2011). Effect of Selenium Supplementation on Glutathione Peroxidase and Catalase Activities in Senescent Cultured Human Fibroblasts. *Ann. Nutr. Metab.* *59*, 127–138.

Giangreco, A., Qin, M., Pinter, J.E., and Watt, F.M. (2008). Epidermal stem cells are retained *in vivo* throughout skin aging. *Aging Cell* 7, 250–259.

Gladyshev, V.N. (2014). The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory! *Antioxid. Redox Signal.* 20, 727–731.

Grant, M.E., and Ayad, S. (1988). The collagens of skin: structure and assembly. *Biochem. Soc. Trans.* 16, 663–666.

Green, H., Rheinwald, J.G., and Sun, T.T. (1977). Properties of an epithelial cell type in culture: the epidermal keratinocyte and its dependence on products of the fibroblast. *Prog. Clin. Biol. Res.* 17, 493–500.

Gu, L.-H., and Coulombe, P.A. (2007). Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 13–23.

H

Han, J. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18, 3016–3027.

Hatfield, D.L., Tsuji, P.A., Carlson, B.A., and Gladyshev, V.N. (2014). Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. *Trends Biochem. Sci.* 39, 112–120.

Hawkes, W.C., and Hornbostel, L. (1996). Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit. *Biol. Psychiatry* 39, 121–128.

Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621.

Hazane-Puch, F., Champelovier, P., Arnaud, J., Trocmé, C., Garrel, C., Faure, P., and Laporte, F. (2014). Six-day selenium supplementation led to either UVA-photoprotection or toxic effects in human fibroblasts depending on the chemical form and dose of Se. *Metallomics* 6, 1683.

Herrera, E., Samper, E., Martín-Caballero, J., Flores, J.M., Lee, H.W., and Blasco, M.A. (1999). Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. *EMBO J.* 18, 2950–2960.

Herter, E.K., and Xu Landén, N. (2017). Non-Coding RNAs: New Players in Skin Wound Healing. *Adv. Wound Care* 6, 93–107.

Hertl, M. (2006). T cell control in autoimmune bullous skin disorders. *J. Clin. Invest.* 116, 1159–1166.

Hildebrand, J., Grundhoff, A., Gallinat, S., Wenck, H., and Knott, A. (2013). MicroRNA profiling during human keratinocyte differentiation using a quantitative real-time PCR method. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 961, 193–200.

Hinek, A., and Rabinovitch, M. (1994). 67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *J. Cell Biol.* 126, 563–574.

Hirano, E., Okamoto, K., Matsubara, Y., Takehana, M., Kobayashi, S., and Tajima, S. (2001). Elastin expression in cultured human keratinocytes: exon 26A of elastin primary transcript is always included in terminally differentiated keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* *293*, 430–433.

Hoffmann, P.R. (2007). Mechanisms by which selenium influences immune responses. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* *55*, 289–297.

Hornsby, P.J., and Harris, S.E. (1987). Oxidative damage to DNA and replicative lifespan in cultured adrenocortical cells. *Exp. Cell Res.* *168*, 203–217.

Horsburgh, S., Fullard, N., Roger, M., Degnan, A., Todryk, S., Przyborski, S., and O'Reilly, S. (2017). MicroRNAs in the skin: role in development, homeostasis and regeneration. *Clin. Sci.* *131*, 1923–1940.

Huang, Z., Rose, A.H., and Hoffmann, P.R. (2012). The Role of Selenium in Inflammation and Immunity: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* *16*, 705–743.

Hudon, V., Berthod, F., Black, A.F., Damour, O., Germain, L., and Auger, F.A. (2003). A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro. *Br. J. Dermatol.* *148*, 1094–1104.

Hull, M.T., and Warfel, K.A. (1983). Age-related changes in the cutaneous basal lamina: scanning electron microscopic study. *J. Invest. Dermatol.* *81*, 378–380.

Hult, A.M., and Goltz, R.W. (1965). THE MEASUREMENT OF ELASTIN IN HUMAN SKIN AND ITS QUANTITY IN RELATION TO AGE. *J. Invest. Dermatol.* *44*, 408–412.

Hunzelmann, N., Nischt, R., Brenneisen, P., Eickert, A., and Krieg, T. (2001). Increased deposition of fibulin-2 in solar elastosis and its colocalization with elastic fibres. *Br. J. Dermatol.* *145*, 217–222.

I

Irons, R., Carlson, B.A., Hatfield, D.L., and Davis, C.D. (2006). Both selenoproteins and low molecular weight selenocompounds reduce colon cancer risk in mice with genetically impaired selenoprotein expression. *J. Nutr.* *136*, 1311–1317.

Isenburg, J.C., Simionescu, D.T., Starcher, B.C., and Vyavahare, N.R. (2007). Elastin Stabilization for Treatment of Abdominal Aortic Aneurysms. *Circulation* *115*, 1729–1737.

J

Jaskelioff, M., Muller, F.L., Paik, J.-H., Thomas, E., Jiang, S., Adams, A.C., Sahin, E., Kost-Alimova, M., Protopopov, A., Cadiñanos, J., et al. (2011). Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature* *469*, 102–106.

Jensen, S.A., Reinhardt, D.P., Gibson, M.A., and Weiss, A.S. (2001). Protein Interaction Studies of MAGP-1 with Tropoelastin and Fibrillin-1. *J. Biol. Chem.* *276*, 39661–39666.

Jensen, S.A., Robertson, I.B., and Handford, P.A. (2012). Dissecting the Fibrillin Microfibril: Structural Insights into Organization and Function. *Structure* *20*, 215–225.

Jensen, U.B., Lowell, S., and Watt, F.M. (1999). The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development* 126, 2409–2418.

Jobeili, L., Rousselle, P., Béal, D., Blouin, E., Roussel, A.-M., Damour, O., and Rachidi, W. (2017). Selenium preserves keratinocyte stemness and delays senescence by maintaining epidermal adhesion. *Aging* 9, 2302.

Jones, P.H., and Watt, F.M. (1993). Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* 73, 713–724.

K

Kadoya, K., Sasaki, T., Kostka, G., Timpl, R., Matsuzaki, K., Kumagai, N., Sakai, L.Y., Nishiyama, T., and Amano, S. (2005). Fibulin-5 deposition in human skin: decrease with ageing and ultraviolet B exposure and increase in solar elastosis: Age-dependent decrease of fibulin-5 deposition. *Br. J. Dermatol.* 153, 607–612.

Kaji, K., Ohta, T., Horie, N., Naru, E., Hasegawa, M., and Kanda, N. (2009). Donor age reflects the replicative lifespan of human fibroblasts in culture. *Hum. Cell* 22, 38–42.

Kanekura, T., Yotsumoto, S., Maeno, N., Kamenosono, A., Saruwatari, H., Uchino, Y., Mera, Y., and Kanzaki, T. (2005). Selenium deficiency: report of a case. *Clin. Exp. Dermatol.* 30, 346–348.

Kaur, P., and Li, A. (2000). Adhesive Properties of Human Basal Epidermal Cells: An Analysis of Keratinocyte Stem Cells, Transit Amplifying Cells, and Postmitotic Differentiating Cells. *J. Invest. Dermatol.* 114, 413–420.

Kazak, L., Reyes, A., and Holt, I.J. (2012). Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 659–671.

Keene, D., Maddox, B., Kuo, H., Sakai, L., and Glanville, R. (1991). Extraction of extendable beaded structures and their identification as fibrillin-containing extracellular matrix microfibrils. *J Histochem Cytochem* 4, 441–449.

Keene, D.R., Engvall, E., and Glanville, R.W. (1988). Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. *J. Cell Biol.* 107, 1995–2006.

Kielty, C.M. (2006). Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev. Mol. Med.* 8, 1–23.

Kielty, C.M., Sherratt, M.J., and Shuttleworth, C.A. (2002). Elastic fibres. *J. Cell Sci.* 115, 2817–2828.

Klein, A.M., Doupé, D.P., Jones, P.H., and Simons, B.D. (2007). Kinetics of cell division in epidermal maintenance. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 76, 021910.

Koide, M., Osaki, K., Konishi, J., Oyamada, K., Katakura, T., Takahashi, A., and Yoshizato, K. (1993). A new type of biomaterial for artificial skin: dehydrothermally cross-linked composites of fibrillar and denatured collagens. *J. Biomed. Mater. Res.* 27, 79–87.

Koster, M.I., Dai, D., Marinari, B., Sano, Y., Costanzo, A., Karin, M., and Roop, D.R. (2007). p63 induces key target genes required for epidermal morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 3255–3260.

Kryukov, G.V., Castellano, S., Novoselov, S.V., Lobanov, A.V., Zehtab, O., Guigó, R., and Gladyshev, V.N. (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* *300*, 1439–1443.

Kucich, U., Rosenbloom, J.C., Abrams, W.R., and Rosenbloom, J. (2002). Transforming growth factor- β stabilizes elastin mRNA by a pathway requiring active Smads, protein kinase C- δ , and p38. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *26*, 183–188.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* *133*, 1019–1031.

Kurokawa, S., and Berry, M.J. (2013). Selenium. Role of the Essential Metalloid in Health. *Met. Ions Life Sci.* *13*, 499–534.

L

Labunskyy, V.M., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2014). Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol. Rev.* *94*, 739–777.

Lacroix, S., Bouez, C., Vidal, S., Cenizo, V., Reymermier, C., Justin, V., Vičanová, J., and Damour, O. (2007). Supplementation with a complex of active nutrients improved dermal and epidermal characteristics in skin equivalents generated from fibroblasts from young or aged donors. *Biogerontology* *8*, 97–109.

Langton, A. k., Sherratt, M. j., Sellers, W. i., Griffiths, C. e. m., and Watson, R. e. b. (2014). Geographical ancestry is a key determinant of epidermal morphology and dermal composition. *Br. J. Dermatol.* *171*, 274–282.

Langton, A.K., Sherratt, M.J., Griffiths, C.E.M., and Watson, R.E.B. (2012). Differential expression of elastic fibre components in intrinsically aged skin. *Biogerontology* *13*, 37–48.

Laverdet, B., Micallef, L., Lebreton, C., Mollard, J., Lataillade, J.-J., Coulomb, B., and Desmoulière, A. (2014). Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration. *Pathol. Biol.* *62*, 108–117.

Le Provost, G.S., Debret, R., Cenizo, V., Aimond, G., Pez, F., Kaniewski, B., André, V., and Sommer, P. (2010). Lysyl oxidase silencing impairs keratinocyte differentiation in a reconstructed-epidermis model. *Exp. Dermatol.* *19*, 1080–1087.

Leblanc, J.-C., Verger, P., Guérin, T., and Volatier, J.L. (2004). Etude de l'alimentation totale française. Mycotoxines Minér. Éléments Traces.

Lechler, T., and Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* *437*, 275–280.

Lee, S.J., Jiko, C., Yamashita, E., and Tsukihara, T. (2011). Selective nuclear export mechanism of small RNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *21*, 101–108.

- Lee, S.M., Koh, H.-J., Park, D.-C., Song, B.J., Huh, T.-L., and Park, J.-W. (2002). Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic. Biol. Med.* *32*, 1185–1196.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* *23*, 4051–4060.
- Legrain, Y., Touat-Hamici, Z., and Chavatte, L. (2014). Interplay between Selenium Levels, Selenoprotein Expression, and Replicative Senescence in WI-38 Human Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *289*, 6299–6310.
- Lemaire, R., Bayle, J., Mecham, R.P., and Lafyatis, R. (2007). Microfibril-associated MAGP-2 Stimulates Elastic Fiber Assembly. *J. Biol. Chem.* *282*, 800–808.
- Lescure, A., Gautheret, D., and Krol, A. (2002). Novel selenoproteins identified from genomic sequence data. *Methods Enzymol.* *347*, 57–70.
- Levy, L., Broad, S., Diekmann, D., Evans, R.D., and Watt, F.M. (2000). β 1 Integrins Regulate Keratinocyte Adhesion and Differentiation by Distinct Mechanisms. *Mol. Biol. Cell* *11*, 453–466.
- Levy, V., Lindon, C., Harfe, B.D., and Morgan, B.A. (2005). Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis. *Dev. Cell* *9*, 855–861.
- L’Heureux, N., Germain, L., and Auger, F.A. (1999). Tissue engineering. *Science* *284*, 1621–1622.
- Li, A., Simmons, P.J., and Kaur, P. (1998). Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 3902–3907.
- Li, A., Pouliot, N., Redvers, R., and Kaur, P. (2004). Extensive tissue-regenerative capacity of neonatal human keratinocyte stem cells and their progeny. *J. Clin. Invest.* *113*, 390–400.
- Li, H., Fu, X., Zhang, L., Sun, T., and Wang, J. (2007). *In vivo* dedifferentiation of human epidermal cells. *Cell Biol. Int.* *31*, 1436–1441.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell* *153*, 1194–1217.
- Lovell, C. r., Smolenski, K. a., Duance, V. c., Light, N. d., Young, S., and Dyson, M. (1987). Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during ageing. *Br. J. Dermatol.* *117*, 419–428.
- Lowell, S., Jones, P., Le Roux, I., Dunne, J., and Watt, F.M. (2000). Stimulation of human epidermal differentiation by Delta–Notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Curr. Biol.* *10*, 491–500.
- Lu, J., and Holmgren, A. (2009). Selenoproteins. *J. Biol. Chem.* *284*, 723–727.
- Lucero, H.A., and Kagan, H.M. (2006). Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell. Mol. Life Sci.* *63*, 2304–2316.

M

- Maclay, J.D., McAllister, D.A., Rabinovich, R., Haq, I., Maxwell, S., Hartland, S., Connell, M., Murchison, J.T., van Beek, E.J., and Gray, R.D. (2012). Systemic elastin degradation in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 67, 606–612.
- Magos, L., and Webb, M. (1980). The interactions of selenium with cadmium and mercury. *Crit. Rev. Toxicol.* 8, 1–42.
- Mäki, J.M., Tikkanen, H., and Kivirikko, K.I. (2001). Cloning and characterization of a fifth human lysyl oxidase isoenzyme: the third member of the lysyl oxidase-related subfamily with four scavenger receptor cysteine-rich domains. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 20, 493–496.
- Makrantonaki, E., and Zouboulis, C.C. (2007). Molecular Mechanisms of Skin Aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1119, 40–50.
- Mangiapane, E., Pessione, A., and Pessione, E. (2014). Selenium and selenoproteins: an overview on different biological systems. *Curr. Protein Pept. Sci.* 15, 598–607.
- Maquart, F.X., and Monboisse, J.C. (2014). Extracellular matrix and wound healing. *Pathol. Biol. (Paris)* 62, 91–95.
- Marinkovich, M.P. (1993). The molecular genetics of basement membrane diseases. *Arch. Dermatol.* 129, 1557–1565.
- Martinez, I., Cazalla, D., Almstead, L.L., Steitz, J.A., and DiMaio, D. (2011). miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 522–527.
- Mellios, N., Huang, H.-S., Grigorenko, A., Rogaev, E., and Akbarian, S. (2008). A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3030–3042.
- Méplan, C., and Hesketh, J. (2014). Selenium and cancer: a story that should not be forgotten—insights from genomics. *Cancer Treat. Res.* 159, 145–166.
- Mera, S. l., Lovell, C. r., Jones, R. russel., and Davies, J. d. (1987). Elastic fibres in normal and sun-damaged skin: an immunohistochemical study. *Br. J. Dermatol.* 117, 21–27.
- Metral, E., Santos, M.D., Thépot, A., Rachidi, W., Mojallal, A., Auxenfans, C., and Damour, O. (2014). Adipose-derived Stem Cells Promote Skin Homeostasis and Prevent its Senescence in an *In vitro* Skin Model. *J. Stem Cell Res. Ther.* 4.
- Mewes, K.R., Raus, M., Bernd, A., Zöller, N.N., Sättler, A., and Graf, R. (2007). Elastin Expression in a Newly Developed Full-Thickness Skin Equivalent. *Skin Pharmacol. Physiol.* 20, 85–95.
- Michel, M., L'Heureux, N., Auger, F.A., and Germain, L. (1997). From newborn to adult: phenotypic and functional properties of skin equivalent and human skin as a function of donor age. *J. Cell. Physiol.* 171, 179–189.
- Milewicz, D.M., Urbán, Z., and Boyd, C. (2000). Genetic disorders of the elastic fiber system. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 19, 471–480.

Mirastschijski, U., Martin, A., Jorgensen, L.N., Sampson, B., and Ågren, M.S. (2013). Zinc, Copper, and Selenium Tissue Levels and Their Relation to Subcutaneous Abscess, Minor Surgery, and Wound Healing in Humans. *Biol. Trace Elem. Res.* *153*, 76–83.

Mithieux, S.M., and Weiss, A.S. (2005). Elastin. *Adv. Protein Chem.* *70*, 437–461.

Moll, R., and Moll, I. (1998). Epidermal adhesion molecules and basement membrane components as target structures of autoimmunity. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* *432*, 487–504.

Moll, R., Franke, W., Schiller, D., Geiger, B., and Krepler, R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells - ScienceDirect.

Molnar, J., Fong, K.S.K., He, Q.P., Hayashi, K., Kim, Y., Fong, S.F.T., Fogelgren, B., Molnarne Szauter, K., Mink, M., and Csiszar, K. (2003). Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* *1647*, 220–224.

MOLOKHIA, A., PORTNOY, B., and DYER, A. (1979). Neutron activation analysis of trace elements in skin. *Br. J. Dermatol.* *101*, 567–572.

Monteys, A.M., Spengler, R.M., Wan, J., Tecedor, L., Lennox, K.A., Xing, Y., and Davidson, B.L. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA* *16*, 495–505.

Mora Huertas, A.C., Schmelzer, C.E.H., Hoehenwarter, W., Heyroth, F., and Heinz, A. (2016). Molecular-level insights into aging processes of skin elastin. *Biochimie* *128–129*, 163–173.

Moskalev, A.A., Shaposhnikov, M.V., Plyusnina, E.N., Zhavoronkov, A., Budovsky, A., Yanai, H., and Fraifeld, V.E. (2013). The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res. Rev.* *12*, 661–684.

Muther, C., Jobeili, L., Garion, M., Heraud, S., Thepot, A., Damour, O., and Lamartine, J. (2017). An expression screen for aged-dependent microRNAs identifies miR-30a as a key regulator of aging features in human epidermis. *Aging* *9*, 2376.

Myriam, M., Sabatier, M., Steiling, H., and Williamson, G. (2006). Skin bioavailability of dietary vitamin E, carotenoids, polyphenols, vitamin C, zinc and selenium. *Br. J. Nutr.* *96*, 227.

N

Nakazawa, K., Nakazawa, H., Sahuc, F., Lepavec, A., Collombel, C., and Damour, O. (1997). Pigmented human skin equivalent: new method of reconstitution by grafting an epithelial sheet onto a non-contractile dermal equivalent. *Pigment Cell Res.* *10*, 382–390.

Nakazawa, K., Kalassy, M., Sahuc, F., Collombel, C., and Damour, O. (1998). Pigmented human skin equivalent--as a model of the mechanisms of control of cell-cell and cell-matrix interactions. *Med. Biol. Eng. Comput.* *36*, 813–820.

Nalvarte, I., Damdimopoulos, A.E., Rüegg, J., and Spyrou, G. (2015). The expression and activity of thioredoxin reductase 1 splice variants v1 and v2 regulate the expression of genes associated with differentiation and adhesion. *Biosci. Rep.* *35*.

Naylor, E.C., Watson, R.E.B., and Sherratt, M.J. (2011). Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* 69, 249–256.

Nève, J. (1996). Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases. *J. Cardiovasc. Risk* 3, 42–47.

Noblesse, E., Cenizo, V., Bouez, C., Borel, A., Gleyzal, C., Peyrol, S., Jacob, M.-P., Sommer, P., and Damour, O. (2004). Lysyl oxidase-like and lysyl oxidase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers. *J. Invest. Dermatol.* 122, 621–630.

Novoselov, S.V., Kryukov, G.V., Xu, X.-M., Carlson, B.A., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2007). Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern. *J. Biol. Chem.* 282, 11960–11968.

O

Ohtani, S., Abe, I., and Yamamoto, T. (2005). An application of D- and L-aspartic acid mixtures as standard specimens for the chronological age estimation. *J. Forensic Sci.* 50, 1298–1302.

Olivieri, O., Stanzial, A.M., Girelli, D., Trevisan, M.T., Guarini, P., Terzi, M., Caffi, S., Fontana, F., Casaril, M., and Ferrari, S. (1994). Selenium status, fatty acids, vitamins A and E, and aging: the Nove Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 60, 510–517.

Owens, D.M., and Watt, F.M. (2003). Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nat. Rev. Cancer* 3, 444–451.

Ozpur, M.A., Guneren, E., Canter, H.I., Karaaltin, M.V., Ovali, E., Yogun, F.N., Baygol, E.G., and Kaplan, S. (2016). Generation of Skin Tissue Using Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 137, 134–143.

P

Partridge, S.M., Elsdon, D.F., Thomas, J., Dorfman, A., Telser, A., and Ho, P.L. (1964). Biosynthesis of the desmosine and isodesmosine cross-bridges in elastin. *Biochem. J.* 93, 30C–33C.

Pasquali-Ronchetti, I., and Baccarani-Contri, M. (1997). Elastic fiber during development and aging. *Microsc. Res. Tech.* 38, 428–435.

Paul, R.G., and Bailey, A.J. (1996). Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28, 1297–1310.

Peinado, H., Moreno-Bueno, G., Hardisson, D., Pérez-Gómez, E., Santos, V., Mendiola, M., Diego, J.I. de, Nistal, M., Quintanilla, M., Portillo, F., et al. (2008). Lysyl Oxidase-Like 2 as a New Poor Prognosis Marker of Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Res.* 68, 4541–4550.

Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin, D., McKeon, F., and De Luca, M. (2001). p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 3156–3161.

Peng, R., Zhou, L., Zhou, Y., Zhao, Y., Li, Q., Ni, D., Hu, Y., Long, Y., Liu, J., Lyu, Z., et al. (2015). MiR-30a Inhibits the Epithelial—Mesenchymal Transition of Podocytes through Downregulation of NFATc3. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 24032–24047.

Pereira, L., Andrikopoulos, K., Tian, J., Lee, S.Y., Keene, D.R., Ono, R., Reinhardt, D.P., Sakai, L.Y., Biery, N.J., Bunton, T., et al. (1997). Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. *Nat. Genet.* *17*, 218.

Pierce, R.A., Kolodziej, M.E., and Parks, W.C. (1992). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 represses tropoelastin expression by a posttranscriptional mechanism. *J. Biol. Chem.* *267*, 11593–11599.

Pierce, R.A., Mariani, T.J., and Senior, R.M. (1995). Elastin in lung development and disease. *Ciba Found. Symp.* *192*, 199-212; discussion 212-214.

Pilecki, B., Holm, A.T., Schlosser, A., Moeller, J.B., Wohl, A.P., Zuk, A.V., Heumüller, S.E., Wallis, R., Moestrup, S.K., Sengle, G., et al. (2016). Characterization of Microfibrillar-associated Protein 4 (MFAP4) as a Tropoelastin- and Fibrillin-binding Protein Involved in Elastic Fiber Formation. *J. Biol. Chem.* *291*, 1103–1114.

Poljšak, B., Dahmane, R.G., and Godić, A. (2012). Intrinsic skin aging: the role of oxidative stress. *Acta Dermatovenerol. Alp. Pannonica Adriat.* *21*, 33–36.

Pontiggia, L., Biedermann, T., Meuli, M., Widmer, D., Böttcher-Haberzeth, S., Schiestl, C., Schneider, J., Braziulis, E., Montano, I., and Meuli-Simmen, C. (2009). Markers to evaluate the quality and self-renewing potential of engineered human skin substitutes *in vitro* and after transplantation. *J. Invest. Dermatol.* *129*, 480–490.

Potten, C.S. (1974). The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. *Cell Tissue Kinet.* *7*, 77–88.

Prost-Squarcioni, C., Fraitag, S., Heller, M., and Boehm, N. (2008). [Functional histology of dermis]. *Ann. Dermatol. Venereol.* *135*, 1S5-20.

Pruniéras, M., Régnier, M., and Woodley, D. (1983). Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.* *81*, 28s–33s.

R

Rafferty, T.S., McKenzie, R.C., Hunter, J.A., Howie, A.F., Arthur, J.R., Nicol, F., and Beckett, G.J. (1998). Differential expression of selenoproteins by human skin cells and protection by selenium from UVB-radiation-induced cell death. *Biochem. J.* *332*, 231–236.

Rafferty, T.S., Beckett, G.J., Walker, C., Bisset, Y.C., and McKenzie, R.C. (2003). Selenium protects primary human keratinocytes from apoptosis induced by exposure to ultraviolet radiation. *Clin. Exp. Dermatol.* *28*, 294–300.

Raghunath, M., Bächli, T., Meuli, M., Altermatt, S., Gobet, R., Bruckner-Tuderman, L., and Steinmann, B. (1996). Fibrillin and elastin expression in skin regenerating from cultured keratinocyte autografts: morphogenesis of microfibrils begins at the dermo-epidermal junction and precedes elastic fiber formation. *J. Invest. Dermatol.* *106*, 1090–1095.

Ray, M., and Gately, L. Basement membrane zone. - PubMed - NCBI.

- Ray, A.L., Semba, R.D., Walston, J., Ferrucci, L., Cappola, A.R., Ricks, M.O., Xue, Q.-L., and Fried, L.P. (2006). Low Serum Selenium and Total Carotenoids Predict Mortality among Older Women Living in the Community: The Women's Health and Aging Studies. *J. Nutr.* *136*, 172–176.
- Rayman, M.P. (2012). Selenium and human health. *The Lancet* *379*, 1256–1268.
- Ressler, S., Bartkova, J., Niederegger, H., Bartek, J., Scharffetter-Kochanek, K., Jansen-Dürr, P., and Wlaschek, M. (2006). p16INK4A is a robust *in vivo* biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* *5*, 379–389.
- Rheinwald, J.G., and Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* *6*, 331–343.
- Rittié, L., and Fisher, G.J. (2002). UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res. Rev.* *1*, 705–720.
- Ritz-Timme, S., and Collins, M.J. (2002). Racemization of aspartic acid in human proteins. *Ageing Res. Rev.* *1*, 43–59.
- Ritz-Timme, S., Laumeier, I., and Collins, M. j. (2003). Aspartic acid racemization: evidence for marked longevity of elastin in human skin. *Br. J. Dermatol.* *149*, 951–959.
- Robert, C., Lesty, C., and Robert, A.M. (1988). Ageing of the skin: study of elastic fiber network modifications by computerized image analysis. *Gerontology* *34*, 291–296.
- Robert, L., Jacob, M.P., Frances, C., Godeau, G., and Hornebeck, W. (1984). Interaction between elastin and elastases and its role in the aging of the arterial wall, skin and other connective tissues. A review. *Mech. Ageing Dev.* *28*, 155–166.
- Robert, L., Robert, A.M., and Fülöp, T. (2008). Rapid increase in human life expectancy: will it soon be limited by the aging of elastin? *Biogerontology* *9*, 119–133.
- Robert, L., Labat-Robert, J., and Robert, A.-M. (2009). Physiology of skin aging. *Pathol. Biol.* *57*, 336–341.
- Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* *192*, 547–556.
- Rodius, S., Indra, G., Thibault, C., Pfister, V., and Georges-Labouesse, E. (2007). Loss of $\alpha 6$ integrins in keratinocytes leads to an increase in TGF β and AP1 signaling and in expression of differentiation genes. *J. Cell. Physiol.* *212*, 439–449.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* *14*, 1902–1910.
- Roman, M., Jitaru, P., and Barbante, C. (2014). Selenium biochemistry and its role for human health. *Met. Integr. Biometal Sci.* *6*, 25–54.
- de Rosa, V., Erkekoğlu, P., Forestier, A., Favier, A., Hincal, F., Diamond, A.M., Douki, T., and Rachidi, W. (2012). Low doses of selenium specifically stimulate the repair of oxidative DNA damage in LNCaP prostate cancer cells. *Free Radic. Res.* *46*, 105–116.

Rosdy, M., and Clauss, L.C. (1990). Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.* *95*, 409–414.

Roskos, K.V., and Guy, R.H. (1989). Assessment of skin barrier function using transepidermal water loss: effect of age. *Pharm. Res.* *6*, 949–953.

Rossetti, D., Kielmanowicz, M.G., Vigodman, S., Hu, Y.P., Chen, N., Nkengne, A., Oddos, T., Fischer, D., Seiberg, M., and Lin, C.B. (2011). A novel anti-ageing mechanism for retinol: induction of dermal elastin synthesis and elastin fibre formation. *Int. J. Cosmet. Sci.* *33*, 62–69.

Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., and Hoekstra, W.G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* *179*, 588–590.

Ruggiero, F., Roulet, M., and Bonod-Bidaud, C. (2005). Les collagènes du derme : au-delà de leurs propriétés structurales. *J. Société Biol.* *199*, 301–311.

S

Sada, A., Jacob, F., Leung, E., Wang, S., White, B.S., Shalloway, D., and Tumber, T. (2016). Defining the cellular lineage hierarchy in the inter-follicular epidermis of adult skin. *Nat. Cell Biol.* *18*, 619–631.

Saito, H., Papaconstantinou, J., Sato, H., and Goldstein, S. (1997). Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence. *J. Biol. Chem.* *272*, 8157–8160.

Sano, T., Kume, T., Fujimura, T., Kawada, H., and Higuchi, K. (2009). Keratin alterations could be an early event of wrinkle formation. *J. Dermatol. Sci.* *53*, 77–79.

Schafer, I.A., Kovach, M., Price, R.L., and Fratianne, R.B. (1991). Human keratinocytes cultured on collagen gels form an epidermis which synthesizes bullous pemphigoid antigens and alpha 2 beta 1 integrins and secretes laminin, type IV collagen, and heparan sulfate proteoglycan at the basal cell surface. *Exp. Cell Res.* *195*, 443–457.

Schlosser, A., Thomsen, T., Shipley, J.M., Hein, P.W., Brasch, F., Tornøe, I., Nielsen, O., Skjødt, K., Palaniyar, N., Steinhilber, W., et al. (2006). Microfibril-associated Protein 4 Binds to Surfactant Protein A (SP-A) and Colocalizes with SP-A in the Extracellular Matrix of the Lung. *Scand. J. Immunol.* *64*, 104–116.

Schrauzer, G.N. (1977). Trace elements, nutrition and cancer: perspectives of prevention. *Adv. Exp. Med. Biol.* *91*, 323–344.

Schrauzer, G.N. (2009). Selenium and selenium-antagonistic elements in nutritional cancer prevention. *Crit. Rev. Biotechnol.* *29*, 10–17.

Segade, F., Trask, B.C., Broekelmann, T.J., Pierce, R.A., and Mecham, R.P. (2002). Identification of a Matrix-binding Domain in MAGP1 and MAGP2 and Intracellular Localization of Alternative Splice Forms. *J. Biol. Chem.* *277*, 11050–11057.

Seite, S., Zucchi, H., Septier, D., Igondjo-Tchen, S., Senni, K., and Godeau, G. (2006). Elastin changes during chronological and photo-ageing: the important role of lysozyme. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* *20*, 980–987.

- Sengupta, A., Lichti, U.F., Carlson, B.A., Ryscavage, A.O., Gladyshev, V.N., Yuspa, S.H., and Hatfield, D.L. (2010). Selenoproteins Are Essential for Proper Keratinocyte Function and Skin Development. *PLoS ONE* 5, e12249.
- Senoo, M., Pinto, F., Crum, C.P., and McKeon, F. (2007). p63 Is Essential for the Proliferative Potential of Stem Cells in Stratified Epithelia. *Cell* 129, 523–536.
- Shabalina, S.A., Ogurtsov, A.Y., Kondrashov, V.A., and Kondrashov, A.S. (2001). Selective constraint in intergenic regions of human and mouse genomes. *Trends Genet.* 17, 373–376.
- Shahabeddin, L., Berthod, F., Damour, O., and Collombel, C. (1990). Characterization of skin reconstructed on a chitosan-cross-linked collagen-glycosaminoglycan matrix. *Skin Pharmacol. Off. J. Skin Pharmacol. Soc.* 3, 107–114.
- Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf links senescence and aging. *Exp. Gerontol.* 39, 1751–1759.
- Shaulian, E., Schreiber, M., Piu, F., Beeche, M., Wagner, E.F., and Karin, M. (2000). The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell* 103, 897–907.
- Sherman, V.R., Yang, W., and Meyers, M.A. (2015). The materials science of collagen. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 52, 22–50.
- Sherratt, M.J. (2009). Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *Age* 31, 305–325.
- Sherratt, M.J., Bayley, C.P., Reilly, S.M., Gibbs, N.K., Griffiths, C.E., and Watson, R.E. (2010). Low-dose ultraviolet radiation selectively degrades chromophore-rich extracellular matrix components. *J. Pathol.* n/a-n/a.
- Shimizu, Y., Mccann, D.S., and Keech, M.K. (1965). THE EFFECT OF ASCORBIC ACID ON HUMAN DERMAL FIBROBLASTS IN MONOLAYER TISSUE CULTURE. *J. Lab. Clin. Med.* 65, 286–306.
- Shirshin, E.A., Gurfinkel, Y.I., Priezzhev, A.V., Fadeev, V.V., Lademann, J., and Darvin, M.E. (2017). Two-photon autofluorescence lifetime imaging of human skin papillary dermis *in vivo*: assessment of blood capillaries and structural proteins localization. *Sci. Rep.* 7, 1171.
- Simpson, C.L., Patel, D.M., and Green, K.J. (2011). Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 565–580.
- Slivka, S.R., Landeen, L.K., Zeigler, F., Zimmer, M.P., and Bartel, R.L. (1993). Characterization, barrier function, and drug metabolism of an *in vitro* skin model. *J. Invest. Dermatol.* 100, 40–46.
- Sohal, R.S., and Orr, W.C. (2012). The redox stress hypothesis of aging. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 539–555.
- Sorrell, J.M., and Caplan, A.I. (2004). Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J. Cell Sci.* 117, 667–675.
- Starcher, B.C., and Mecham, R.P. (1981). Desmosine radioimmunoassay as a means of studying elastogenesis in cell culture. *Connect. Tissue Res.* 8, 255–258.

Strachan, L.R., and Ghadially, R. (2008). Tiers of Clonal Organization in the Epidermis: The Epidermal Proliferation Unit Revisited. *Stem Cell Rev.* 4, 149–157.

Sun, J., and Wu, J. (2015). Expression profiling of long noncoding RNAs in neonatal and adult mouse testis. *Data Brief* 4, 322–327.

Suwabe, H., Serizawa, A., Kajiwara, H., Ohkido, M., and Tsutsumi, Y. (1999). Degenerative processes of elastic fibers in sun-protected and sun-exposed skin: Immunoelectron microscopic observation of elastin, fibrillin-1, amyloid P component, lysozyme and α 1-antitrypsin. *Pathol. Int.* 49, 391–402.

Szauter, K.M., Cao, T., Boyd, C.D., and Csiszar, K. (2005). Lysyl oxidase in development, aging and pathologies of the skin. *Pathol. Biol.* 53, 448–456.

T

Tian, Y., Guo, R., Shi, B., Chen, L., Yang, L., and Fu, Q. (2016). MicroRNA-30a promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells through inhibiting Delta-like 4 expression. *Life Sci.* 148, 220–228.

Tigges, J., Krutmann, J., Fritsche, E., Haendeler, J., Schaal, H., Fischer, J.W., Kalfalah, F., Reinke, H., Reifenberger, G., Stühler, K., et al. (2014). The hallmarks of fibroblast ageing. *Mech. Ageing Dev.* 138, 26–44.

Tinois, E., Tiollier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M., and Thivolet, J. (1991). *In vitro* and post-transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. *Exp. Cell Res.* 193, 310–319.

Tiollier, J., Dumas, H., Tardy, M., and Tayot, J.L. (1990). Fibroblast behavior on gels of type I, III, and IV human placental collagens. *Exp. Cell Res.* 191, 95–104.

Toivanen, J.L. (1987). Effects of selenium, vitamin E and vitamin C on human prostacyclin and thromboxane synthesis in vitro. *Prostaglandins. Leukot. Med.* 26, 265–280.

Toyoshima, T., Yamashita, K., Furuichi, H., Shishibori, T., Itano, T., and Kobayashi, R. (1999). Ultrastructural distribution of 36-kD microfibril-associated glycoprotein (MAGP-36) in human and bovine tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 1049–1056.

Truong, A.B., Kretz, M., Ridky, T.W., Kimmel, R., and Khavari, P.A. (2006). p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes. *Genes Dev.* 20, 3185–3197.

Tsamis, A., Krawiec, J.T., and Vorp, D.A. (2013). Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review. *J. R. Soc. Interface* 10.

TSUJI, T., and HAMADA, T. (1981). Age-related changes in human dermal elastic fibres. *Br. J. Dermatol.* 105, 57–63.

Tumbar, T., Guasch, G., Greco, V., Blanpain, C., Lowry, W.E., Rendl, M., and Fuchs, E. (2004). Defining the Epithelial Stem Cell Niche in Skin. *Science* 303, 359–363.

Turino, G.M., Lin, Y.Y., He, J., Cantor, J.O., and Ma, S. (2012). Elastin Degradation: An Effective Biomarker in COPD. *COPD J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* 9, 435–438.

U

Uitto, J. (1979). Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases. *J. Invest. Dermatol.* 72, 1–10.

Uitto, J. (2008). The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *J. Drugs Dermatol. JDD* 7, s12-16.

Uitto, J., Richard, G., and McGrath, J.A. (2007). Diseases of epidermal keratins and their linker proteins. *Exp. Cell Res.* 313, 1995–2009.

V

Van Doren, S.R. (2015). Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 0, 224–231.

Varlet, B.L., Chaudagne, C., Barré, P., Sauvage, C., Berthouloux, B., Meybeck, A., Dumas, M., Saunois, A., and Bonté, F. (1998). Age-Related Functional and Structural Changes in Human Dermo—Epidermal Junction Components. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 3, 172–179.

Vedrenne, N., Coulomb, B., Danigo, A., Bonté, F., and Desmouliere, A. (2012). The complex dialogue between (myo) fibroblasts and the extracellular matrix during skin repair processes and ageing. *Pathol. Biol.* 60, 20–27.

Vicanova, J., Bouez, C., Lacroix, S., Lindmark, L., and Damour, O. (2006). Epidermal and Dermal Characteristics in Skin Equivalent after Systemic and Topical Application of Skin Care Ingredients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1067, 337–342.

Vinceti, M., Dennert, G., Crespi, C.M., Zwahlen, M., Brinkman, M., Zeegers, M.P., Horneber, M., D'Amico, R., and Del Giovane, C. (2014). Selenium for preventing cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* 3, CD005195.

W

Waaiker, M.E.C., Parish, W.E., Strongitharm, B.H., van Heemst, D., Slagboom, P.E., de Craen, A.J.M., Sedivy, J.M., Westendorp, R.G.J., Gunn, D.A., and Maier, A.B. (2012). The number of p16INK4a positive cells in human skin reflects biological age. *Aging Cell* 11, 722–725.

Wagenseil, J.E., and Mecham, R.P. (2007). New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 81, 229–240.

Waite, E.R., Collins, M.J., Ritz-Timme, S., Schutz, H.W., Cattaneo, C., and Borrman, H.I. (1999). A review of the methodological aspects of aspartic acid racemization analysis for use in forensic science. *Forensic Sci. Int.* 103, 113–124.

Waller, J.M., and Maibach, H.I. (2006). Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. *Skin Res. Technol.* 12, 145–154.

Wang, F., Zieman, A., and Coulombe, P.A. (2016). Skin Keratins. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 303–350.

Wang, T.-W., Sun, J.-S., Huang, Y.-C., Wu, H.-C., Chen, L.-T., and Lin, F.-H. (2006). Skin basement membrane and extracellular matrix proteins characterization and quantification by real time RT-PCR. *Biomaterials* 27, 5059–5068.

Watt, F.M., and Jensen, K.B. (2009). Epidermal stem cell diversity and quiescence: Epidermal stem cells. *EMBO Mol. Med.* 1, 260–267.

Watt, F.M., and Jones, P.H. (1993). Expression and function of the keratinocyte integrins. *Dev. Camb. Engl. Suppl.* 185–192.

Webb, A., Li, A., and Kaur, P. (2004). Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation* 72, 387–395.

Webley, K., Bond, J.A., Jones, C.J., Blaydes, J.P., Craig, A., Hupp, T., and Wynford-Thomas, D. (2000). Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2803–2808.

Weiherrmann, A.C., Lorencini, M., Brohem, C.A., and de Carvalho, C.M. (2017). Elastin structure and its involvement in skin photoageing. *Int. J. Cosmet. Sci.* 39, 241–247.

Werb, Z., Banda, M.J., McKerrow, J.H., and Sandhaus, R.A. (1982). Elastases and elastin degradation. *J. Invest. Dermatol.* 79 Suppl 1, 154s–159s.

Wise, S.G., and Weiss, A.S. (2009). Tropoelastin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 494–497.

Wu, R.T.Y., Cao, L., Chen, B.P.C., and Cheng, W.-H. (2014). Selenoprotein H Suppresses Cellular Senescence through Genome Maintenance and Redox Regulation. *J. Biol. Chem.* 289, 34378–34388.

Wulf-Johansson, H., Lock Johansson, S., Schlosser, A., Trommelholt Holm, A., Melholt Rasmussen, L., Mickley, H., Diederichsen, A.C.P., Munkholm, H., Poulsen, T.S., Tornøe, I., et al. (2013). Localization of Microfibrillar-Associated Protein 4 (MFAP4) in Human Tissues: Clinical Evaluation of Serum MFAP4 and Its Association with Various Cardiovascular Conditions. *PLoS ONE* 8, e82243.

Y

Yanagisawa, H., Schluterman, M.K., and Brekken, R.A. (2009). Fibulin-5, an integrin-binding matricellular protein: its function in development and disease. *J. Cell Commun. Signal.* 3, 337–347.

Yang, X., Chen, Y., and Chen, L. (2017). The Versatile Role of microRNA-30a in Human Cancer. *Cell. Physiol. Biochem.* 41, 1616–1632.

Yannas, I.V., Burke, J.F., Gordon, P.L., Huang, C., and Rubenstein, R.H. (1980). Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *J. Biomed. Mater. Res.* 14, 107–132.

Yi, R., O'Carroll, D., Pasolli, H.A., Zhang, Z., Dietrich, F.S., Tarakhovskiy, A., and Fuchs, E. (2006). Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat. Genet.* 38, 356–362.

Z

Zanetti, M., Braghetta, P., Sabatelli, P., Mura, I., Doliana, R., Colombatti, A., Volpin, D., Bonaldo, P., and Bressan, G.M. (2004). EMILIN-1 Deficiency Induces Elastogenesis and Vascular Cell Defects. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 638–650.

Zheng, Q., Chen, S., Chen, Y., Lyga, J., Wyborksi, R., and Santhanam, U. (2013). Investigation of age-related decline of microfibril-associated glycoprotein-1 in human skin through immunohistochemistry study. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 317.

Zouboulis, C.C., Adjaye, J., Akamatsu, H., Moe-Behrens, G., and Niemann, C. (2008). Human skin stem cells and the ageing process. *Exp. Gerontol.* *43*, 986–997.